

**MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES APLICADOS  
AO MELHORAMENTO INTRAPOPULACIONAL DO  
MARACUJAZEIRO AZEDO**

**RONALDO VIANA DOS REIS**

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

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2010**

**MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES APLICADOS  
AO MELHORAMENTO INTRAPOPULACIONAL DO  
MARACUJAZEIRO AZEDO**

**RONALDO VIANA DOS REIS**

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  
FEVEREIRO – 2010

MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES APLICADOS  
AO MELHORAMENTO INTRAPOPULACIONAL DO  
MARACUJAZEIRO AZEDO

**RONALDO VIANA DOS REIS**

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 19 de fevereiro de 2010.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Messias Gonzaga Pereira (Ph.D., Plant Breeding) - UENF

---

Rogério Figueiredo Daher (DSc., Produção Vegetal) - UENF

---

Dr. Eder Jorge de Oliveira (DSc., Genética e Melhoramento de Plantas) –  
EMBRAPA/CNPMPF

---

Profª. Telma Nair Santana Pereira (Ph. D., Plant Breeding) - UENF  
(Coorientadora)

*Dedico esta vitória a toda minha família, meu pai Geraldo,  
minha mãe Dorita, minhas irmãs Janaina e Clícia e minhas  
sobrinhas, Nathany e Ana Beatriz, por todo o apoio,  
carinho e confiança.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelos ensinamentos e amor e por ter-me dado capacidade para concretizar mais esta etapa na minha caminhada.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), por meio do programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de realização do doutorado.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela concessão da Bolsa.

Ao professor Alexandre Pio Viana, pela orientação, amizade e confiança depositada em mim no desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Messias Gonzaga Pereira, pelos ensinamentos, sugestões e colaborações para o desenvolvimento do trabalho.

À professora Telma Nair Santana Pereira, pelo apoio e sugestões na elaboração do trabalho.

Ao pesquisador Eder Jorge de Oliveira, pela amizade e pelas orientações dadas para a melhoria do trabalho.

A todos os professores da Pós-graduação, pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso.

Aos Técnicos de Laboratório, Raimundo e Vitória, e a todos os colegas de laboratório que conviveram comigo e pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas da UENF, Érica, Roberta, Poliane, Keila, Drieli, Chicão, Silvério, Thiago, Sílvio, Ismael, Kelem, Monique Moulim, Monique Freitas, Marcelo, Leandro, Hildefonso, Marcão, Carolina, Juliana, Tati e Roberto, pelo convívio e amizade.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento profissional e para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Cultura do maracujazeiro .....	4
2.1.1. Origem e classificação botânica.....	4
2.1.2. Importância econômica .....	6
2.1.3. Autoincompatibilidade do maracujazeiro.....	8
2.2. Melhoramento genético do maracujazeiro.....	8
2.2.1. Seleção recorrente.....	11
2.2.2. Melhoramento do maracujazeiro azedo na UENF.....	12
2.3. Marcadores de DNA .....	14
2.3.1. Marcadores moleculares microsatélites .....	15
2.4. Marcadores moleculares em <i>Passiflora</i> .....	17
3. TRABALHOS.....	19
3.1. Variabilidade genética de p de maracujazeiro azedo selecionados em dois ciclos de seleção recorrente estimada via microsatélites.	
3.1.1. RESUMO.....	19
3.1.2. ABSTRACT.....	20
3.1.3. INTRODUÇÃO.....	21

3.1.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1.4.1. Material genético .....	23
3.1.4.2. Iniciadores microssatélites.....	24
3.1.4.3. Extração do DNA e condições de PCR.....	26
3.1.4.4. Análise estatística dos dados .....	28
3.1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
3.1.6. CONCLUSÕES.....	40
3.1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
3.2. Utilização de dados agronômicos e moleculares na seleção de progênies de maracujazeiro azedo no 2º ciclo de seleção recorrente.	
3.2.1. RESUMO.....	46
3.2.2. ABSTRACT.....	47
3.2.3. INTRODUÇÃO.....	48
3.2.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.2.4.1. Material genético.....	50
3.2.4.2. Características agronômicas.....	50
3.2.4.3. Microssatélites.....	55
3.2.4.4. Análise estatística dos dados.....	58
3.2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
3.2.6. CONCLUSÕES.....	67
3.2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	72
... REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75

## RESUMO

REIS, Ronaldo Viana; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Janeiro, 2010. Marcadores moleculares microssatélites aplicados ao melhoramento intrapopulacional do maracujazeiro azedo. Orientador: Alexandre Pio Viana. Conselheiros: Telma Nair Santana Pereira, Messias Gonzaga Pereira e Rogério Figueiredo Daher.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a variabilidade genética de genótipos selecionados, referentes a dois ciclos de seleção recorrentes do programa de melhoramento genético do maracujazeiro azedo. Para tal, foram utilizados 23 pares de iniciadores microssatélites na genotipagem dos 66 genótipos de irmãos completos, 27 referentes ao primeiro ciclo ( $MA_0$ ) e 39, ao segundo ciclo ( $MA_1$ ) cujo DNA genômico foi extraído de folhas jovens, pelo método CTAB. Foram empregadas estatísticas descritivas de diversidade, tais como, heterozigose esperada ( $H_e$ ), heterozigose observada ( $H_o$ ), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e coeficiente de endogamia (F). O número de alelos encontrados nas populações foram 32, sendo que, dos 32 encontrados, 30 foram coincidentes e observados nas duas populações  $MA_0$  e  $MA_1$ ; o número médio de alelos por locos foi de 2,46 na população  $MA_0$  e de 2,30 na população  $MA_1$ . A  $H_e$  na população  $MA_0$  apresentou média de 0,20 por loco, um pouco maior que a  $H_o$  que apresentou média de 0,15 por loco. Os valores de F foram negativos para a maioria dos locos, sugerindo índices altos de heterose nesses locos. A  $H_o$  foi menor que a  $H_e$  na população  $MA_1$ , com média de 0,12. O F da população  $MA_1$  foi de 0,31. O PIC

apresentou média de 0,18 na população MA<sub>0</sub> e de 0,16 na população MA<sub>1</sub>. A distância genética média da população MA<sub>0</sub> foi de 0,21 e de 0,19 na população MA<sub>1</sub>, apresentando uma pequena perda de variabilidade, ainda que essa flutuação seja normal quando se pratica seleção. Em outro momento, analisaram-se 39 progênies selecionadas dentre as 140 progênies referentes ao segundo ciclo de seleção recorrente do maracujazeiro azedo (MA<sub>1</sub>), visando indicar os 25 genótipos mais divergentes para comporem o próximo ciclo de seleção recorrente, com base em características agronômicas e em marcadores moleculares SSR. Os dados agronômicos foram analisados pelo programa *Darvin* 5.0, e foi utilizada a distância de *Manhattan* para indicar a variabilidade dos genótipos avaliados. Para os dados moleculares, a matriz de distância foi calculada via Genes, sendo utilizado o Índice Ponderado. A partir das matrizes dos dados agronômicos e moleculares, obteve-se a matriz conjunta. Posteriormente, usou-se o modelo *Boxplot* para verificar a dispersão dos genótipos selecionados em seis características de maior importância agronômica. Dos 25 genótipos selecionados utilizando os dados agronômicos e os moleculares, 60% destes foram coincidentes. Mesmo com alguns genótipos em comum, a correlação entre esses dados não foi significativa pelo teste Z de Mantel. Os genótipos selecionados pelos dados agronômicos foram mais eficientes em apenas uma das seis características avaliadas (peso do fruto), atingindo uma média de peso de frutos de 174 g. Nas características produtividade, número de frutos e dias para o florescimento, as progênies selecionadas pelos marcadores moleculares apresentaram maiores médias; 21 t/ha, 196 frutos e 117 dias para o florescimento, respectivamente. O F apresentou resultado médio maior na população MA<sub>1</sub>, e a distância genética média decresceu entre os ciclos, mas não apresentou perdas significativas. Os procedimentos de seleção utilizados indicam resultados positivos, sendo que as análises moleculares foram mais eficientes na seleção dos genótipos. Os resultados observados indicam que os genótipos mais produtivos e divergentes para dar continuidade do programa de seleção recorrente do maracujazeiro, além disso, demonstram o sucesso da seleção recorrente para esta cultura e sua viabilidade.

## ABSTRACT

REIS, Ronaldo Viana, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. January, 2010. Microsatellite molecular markers applied to the improvement of intrapopulation passionfruit. Advisor: Alexandre Pio Viana. Directors: Telma Nair Santana Pereira, Messias Gonzaga Pereira, Rogério Figueiredo Daher.

It was made an analysis of genetic variability of selected genotypes, referring to two recurrent selection cycles already made in UENF with the aim at population breeding of passion fruit. To this end, it was used 23 pairs of primers at microsatellite genotyping of 66 genotypes of full sibling, 27 for the MA<sub>0</sub> and 39 cycle, to the MA<sub>1</sub> cycle. Genomic DNA was extracted from young leaves by CTAB method. Diversity descriptive statistics were used, such as expected heterozygosity ( $H_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), polymorphic information content (PIC) and inbreeding coefficient (F), in order to estimate the variability of the progenies of two recurrent selection cycles. The number of alleles found in populations was 32, and that of 32 matches, 30 are coincident and observed in two populations MA<sub>0</sub> and MA<sub>1</sub>, the mean number of alleles per locus was 2.46 in the MA<sub>0</sub> population and 2.30 in MA<sub>1</sub> population. A  $H_e$  in MA<sub>0</sub> population had an average of 0.20 per locus, a little bigger than  $H_o$  which had an average of 0.15 per locus. The indexes of F showed negative values for most loci, suggesting high levels of heterosis in these loci. The  $H_o$  was lower than the  $H_e$  in MA<sub>1</sub> population, with an average of 0.12. The F of MA<sub>1</sub> population was 0.31. The PIC had an average of 0.18 in MA<sub>0</sub> population and 0.16 in MA<sub>1</sub> population. The genetic

distance average of the MA<sub>0</sub> population was 0.21 and 0.19 in the MA<sub>1</sub> population, with a small loss of variability, even if the fluctuation is normal when selection is practiced. Elsewhere, it was analyzed 39 selected progeny among 140 progeny for the second recurrent selection cycle of passion fruit (MA<sub>1</sub>), to indicate the 25 different genotypes to form the next recurrent selection cycle based on agronomic characteristics and molecular markers SSR. The agronomic data were analyzed by Darwin 5.0, when it was used the Manhattan distance to indicate the variability of genotypes. For molecular data, the distance matrix was calculated by the computer application Genes, and used the Weighted Index. From the headquarters of agronomic and molecular data, it was obtained the joint matrix. Later, it was used the Boxplot model to check the spread of selected genotypes in six major characters of agronomic importance. Of the 25 selected genotypes using agronomic and molecular data, 60% of these were coincidental. Even with some genotypes in common, the correlation between these data was not significant by the Z test from Mantel. The selected genotypes for agronomic data were more efficient in only one (fruit weight) of the six evaluated characteristics, reaching an average fruit weight of 174 g. The characteristics yield, fruit number and days to flowering, the selected progenies by molecular markers have the highest mean, 21 t/ha, 196 fruit and 117 days to flowering. The F showed mean score higher in the MA<sub>1</sub> population, and the average genetic distance decreased between the cycles, but no presented significant losses. The selection procedures used show positive results, and the molecular analyses were more efficient in the selection of genotypes. The results indicate the higher grain yield and different for the continuity of the recurrent selection program of passion fruit, moreover, show the success of recurrent selection for this crop and its viability.

## 1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims) é uma frutífera de grande importância no setor agrícola, com frutos de excelentes qualidades e grande aceitação no mercado nacional e internacional (BORGES et al., 2005).

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, sendo o maracujá azedo o mais cultivado, tendo sua produção voltada ao consumo *in natura* e à industrialização. A área cultivada com maracujá no país evoluiu de 25.390 ha, em 1990, para 45.327, em 2006, o que representa aumento de 78% (IBGE, 2008).

Em termos de produção, a região Nordeste contribui com 61% do total ofertado ao mercado interno, e a Bahia lidera a produção nacional, com 34% do volume total. Os patamares de produtividade variam entre as regiões produtoras, sendo de 11,6 t.ha<sup>-1</sup> na região Nordeste e de 19,6 t.ha<sup>-1</sup> na Sudeste, com média nacional de 14 t.ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2008).

Para corrigir os fatores limitantes da cultura, como a baixa produtividade, o melhoramento genético torna-se necessário, visando, principalmente, à obtenção de populações, híbridos e/ou cultivares, mais produtivos e resistentes à maioria das pragas e doenças.

E já existem variedades comerciais melhoradas de maracujá azedo que podem atingir até 45 t.ha<sup>-1</sup>, exemplos disso, são os híbridos IAC-273, IAC-274 e IAC-277, destinados à agroindústria, e o híbrido FB 200, selecionado pela Empresa Flora Brasil, para comercialização, como fruta fresca para a região Sudeste.

Na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), o programa de melhoramento genético do maracujazeiro teve início em 1998, com a coleta inicial de vários genótipos em três regiões produtoras e distintas do estado do Rio de Janeiro (VIANA et al., 2003, 2004). Com base nestes estudos iniciais, procurou-se, em uma segunda fase, realizar uma amostragem mais ampla em áreas comerciais da região Norte Fluminense, onde, por meio de delineamentos genéticos apropriados, como o delineamento I de Comstock & Robinson (1948), obteve-se um maior número de progênies. Assim, com base nos resultados destas análises iniciais, optou-se pela condução de um programa de seleção recorrente intrapopulacional (GONÇALVES, 2005; GONÇALVES et al., 2007, 2008 e 2009).

A seleção recorrente é um método bastante eficaz e pode ser utilizado para a cultura do maracujazeiro. Neste método, busca-se a melhoria do desempenho das populações de forma contínua e progressiva por meio do aumento das frequências dos alelos favoráveis dos caracteres sob seleção, mantendo a variabilidade genética em níveis adequados para permitir ganhos genéticos nos ciclos subsequentes (HULL, 1945; HALLAUER, 1985; SOUZA JÚNIOR, 2001).

No trabalho de GONÇALVES (2005), para uma população de maracujá azedo, a seleção recorrente intrapopulacional foi indicada pela sua maior facilidade de execução e por várias características importantes terem apresentado ação gênica predominantemente aditiva. Nesse trabalho, foram avaliadas 97 progênies de maracujá azedo amostradas ao acaso em área comercial, sendo estas progênies composta pelos seguintes materiais: Maguary, Yellow Master e seleções de São Francisco do Itabapoana, as quais constituíram o ciclo inicial de seleção recorrente. Com base em índices de seleção 27 progênies foram selecionadas e recombinadas constituindo o primeiro ciclo de seleção recorrente aqui definido como Maracujá Amarelo Zero ( $MA_0$ ). Para a recombinação dessas progênies, foram realizados cruzamentos seguindo o Delineamento I, procedimento proposto por COMSTOCK & ROBINSON (1948), formando progênies de irmãos completos.

O segundo ciclo de seleção denominado Maracujá Amarelo Um ( $MA_1$ ) foi conduzido por SILVA (2009), no qual os indivíduos foram obtidos de cruzamentos dirigidos envolvendo 27 progênies selecionadas por GONÇALVES (2005). A recombinação nesse caso foi feita utilizando meio-irmãos maternos, cuja genitor

feminino foi à própria progênie selecionada e o genitor masculino foi à mistura de pólen oriundo de todas as progênies selecionadas. Com a recombinação, foram obtidas 140 progênies de irmãos completos, formando a nova população de trabalho e, utilizando índice de seleção, foram selecionados 30% dessas progênies, obtendo-se um total de 39 genótipos (SILVA et al., 2009).

Considerando que à medida que os ciclos de seleção são realizados é necessário manter a variabilidade genética da população, o melhorista tem que estar atento e monitorar essa variabilidade. Para tal, os marcadores moleculares são de grande ajuda já que os mesmos apresentam várias vantagens, especialmente quando usados em programas de melhoramento de plantas semi perenes ou perenes. O uso dos marcadores moleculares no monitoramento da variabilidade genética em programas de seleção recorrente ainda é um procedimento novo, porém já há alguns resultados com sucesso em programas de seleção recorrente em outras culturas, como o milho, (GABRIEL, 2002; CUNHA, 2010).

Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi estimar e comparar a variabilidade genética de progênies de maracujazeiro entre a população inicial ( $MA_0$ ) em relação à população ( $MA_1$ ) dos dois ciclos de seleção recorrentes do maracujazeiro azedo em trabalhos já realizados na UENF; analisar a divergência genética das progênies obtidas nos dois ciclos de seleção por meio de marcadores SSR; selecionar os genótipos mais divergentes e verificar o impacto dos procedimentos de seleção recorrente na variabilidade genética da população de trabalho via marcadores SSR.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Cultura do maracujazeiro

#### 2.1.1. Origem e classificação botânica

Segundo VANDERPLANK (1996), o maracujazeiro pertence à família Passifloraceae que compreende 18 gêneros e cerca de 630 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais da América, Ásia e África. O gênero *Passiflora*, originário da América do Sul, e cujo centro de distribuição geográfica é o centro-norte do Brasil, possui o maior número de espécies da família, aproximadamente 465.

Devido à relativa complexidade taxonômica do gênero, a literatura apresenta duas classificações baseadas em características morfológicas: a de KILLIP (1938) e a de MACDOUGAL & FEUILLET (2004). O gênero *Passiflora* tem sido pouco estudado citologicamente, pois, dentre as 450 espécies descritas, existem estudos cromossômicos de apenas 30%, que, em sua maioria, restringem-se à contagem do número cromossômico (SOARES-SCOTT, 2005).

Os quatro subgêneros propostos por MACDOUGAL & FEUILLET (2004) apresentam os seguintes números básicos de cromossomos: *Decaloba*  $x = 6$ , *Deidamioides*  $x = 12$ , *Astrophea*  $x = 12$  e *Passiflora*  $x = 9$ . O menor número haploide descrito é  $n = 6$ , fato que sugere a ocorrência de poliploidia durante a evolução do gênero, levando ao surgimento das espécies com número de

cromossomos:  $2n = 18$  (por ex., *Passiflora edulis* e *P. caerulea*),  $2n = 24$  (*P. suberosa*)  $2n = 36$  (*P. incarnata*) e  $2n = 84$  (*P. lutea*). O cariótipo das espécies *P. edulis*, *P. amethystina* e *P. cincinnata* foi detalhadamente descrito por CUCO et al. (2005).

As plantas da família Passifloraceae apresentam-se na forma de trepadeiras vigorosas. As folhas podem ser arredondadas ou partidas, com bordos serrados. Nota-se uma variação muito grande no tamanho e na forma das folhas, sendo as basais bem maiores que as folhas dos ramos terminais e florais (JØRGENSEN et al., 1984). As flores também apresentam tamanho e formas variadas, apresentando-se grandes e em forma de tubo (subgêneros *Passiflora* e *Tacsonia*) ou pequenas (subgênero *Decaloba*). Ainda com relação às flores, estas apresentam uma ampla gama de coloração, podendo ser encontradas em tons de branco, laranja, vermelho, roxo, amarelo e azul. Os frutos são arredondados ou alongados de coloração verde, amarelada, alaranjada ou com manchas verde-claras. As sementes são achatadas e pretas, envolvidas por um arilo gelatinoso de coloração amarelada e translúcida (JØRGENSEN et al., 1984).

Uma característica bastante comum no gênero é a presença de brácteas embaixo de cada flor, podendo ser pequenas e lineares (secções *Decaloba* e *Cieca*) ou grandes e semelhantes às folhas (secções *Passiflora* e *Calopanthus*).

Grande parte dessas espécies está dispersa no território nacional, o que confere ao nosso país a condição de um dos principais centros de diversidade genética do gênero (D'EECKENBRUGGE, 2003), sendo a principal espécie cultivada a *Passiflora edulis* Sims, conhecida como maracujá azedo, uma fruteira de clima tropical com ampla distribuição geográfica (MATTA, 2005).

Segundo BERNACCI et al. (2008), taxonomicamente, a maneira correta de se referir ao maracujá azedo é *Passiflora edulis* Sims. De acordo com os autores, esta classificação pode ser utilizada para toda e qualquer planta e cor de fruto do maracujá azedo. No caso de cultivares, advindos de processo seletivo, deve-se associar à classificação o nome da cultivar, por exemplo: *Passiflora edulis* 'UENF Magnífica'.

### 2.1.2. Importância econômica

Frutífera típica da região Centro-Oeste e Norte do Brasil, até meados de 1960, o maracujá era cultivado apenas em pomares domésticos, não havendo plantios comerciais (MARTINS, 2006). Os primeiros cultivos surgiram no final da década de 1960, e a produção, em torno de  $1.444 \text{ t.ha}^{-1}\text{ano}^{-1}$ , era suficiente apenas para atender às necessidades da propriedade e do pequeno mercado regional (ARAÚJO, 1978).

O Brasil apresenta excelentes condições para o cultivo do maracujazeiro pelo fato de este desenvolver-se bem nas regiões tropicais e subtropicais, sendo, portanto, de clima quente e úmido. As regiões mais indicadas para o plantio são as de altitude entre 100 m a 1.000 m, com umidade relativa do ar em torno de 60% e comprimento do dia acima de 11 horas de luz (LIMA & BORGES, 2004).

Devido às características relatadas acima, a cultura do maracujazeiro expandiu-se em ritmo acelerado desde o início da década de 70. Até então, o Brasil não se apresentava como um dos maiores produtores mundiais, mas, a partir daquele período, houve grande aumento de produção, devido, principalmente à crescente exportação de suco concentrado (SOUZA & MELETTI, 1997).

Entre as espécies de maior importância econômica no Brasil, podemos citar a *Passiflora edulis* e *Passiflora alata*, sendo que a primeira ocupa mais de 90% da área plantada com algumas variedades comerciais, como os acessos FB-100 e FB-200 da Companhia Maguary, e três híbridos intravarietais, o 'IAC-273', o 'IAC-275' e 'IAC-277', desenvolvidos pelo Instituto Agrônomo-IAC. Recentemente, a Embrapa Cerrados lançou três variedades denominadas “BRS Gigante Amarelo”, “BRS Ouro Vermelho” e “BRS Sol do Cerrado”, que têm apresentado boa aceitação por parte dos produtores.

O maracujá é comercializado predominantemente nas formas: fruta fresca para consumo in natura e para produção de sucos, sorvetes, licores e doces por meio da industrialização, tendo-se mantido em terceiro lugar entre os sucos produzidos no Brasil, atrás apenas do suco de laranja e de caju (AGUIAR & SANTOS, 2001).

A cultura caracteriza-se por ser uma atividade desenvolvida em pequenas propriedades, com tamanho entre três e cinco hectares e mão de obra eminentemente familiar, o que representa uma alternativa para os pequenos proprietários, contribuindo para valorizar o trabalho do pequeno agricultor (MELETTI, 2003; NOGUEIRA FILHO et al., 2003).

Hoje, o Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, cuja área cultivada evoluiu de 25.390 ha, em 1990, para 45.327, em 2006, o que representa aumento de 78%, estando a produção de maracujá espalhada praticamente em todos os estados brasileiros, destacando-se os estados: Bahia, Ceará, Sergipe, Pará, Minas Gerais e Espírito Santo (IBGE, 2008).

Apesar do destaque da produção brasileira, a produtividade nacional é muito baixa. Situa-se entre 10 a 15 t.ha<sup>-1</sup> devido, principalmente, ao reduzido uso de tecnologia de produção recomendada para a cultura de sementes melhoradas geneticamente (MELETTI & MAIA, 1999).

STENZEL & SERA (1999) relataram que, do ponto de vista do sistema de produção, a falta de variedades melhoradas constitui um entrave à produção de frutos homogêneos e de qualidade, sendo que a propagação do maracujá tem sido realizada. Isso porque são usadas sementes retiradas de matrizes de plantios comerciais de polinização aberta, onde há grande heterogeneidade entre plantas, tendo em vista ser o maracujazeiro uma planta essencialmente alógama, condicionada pelo fenômeno da autoincompatibilidade, que impede a autofecundação e até mesmo o cruzamento de diferentes plantas com os mesmos alelos de incompatibilidade.

Medidas que visem ao desenvolvimento de variedades com bom potencial de produção, que possuam uniformidade de frutos, menor espessura de casca, alto teor de sólidos solúveis e resistência/tolerância às principais pragas e doenças poderão contribuir, certamente, para garantir uma oferta constante do produto nos mercados e maior interesse pela cultura por parte dos vários setores do agronegócio brasileiro. Com essa perspectiva, o melhoramento genético do maracujazeiro, em muito, pode vir contribuir para o aumento da produtividade e qualidade dos frutos.

### 2.1.3. Autoincompatibilidade do maracujazeiro

O maracujazeiro é uma planta essencialmente alógama, condicionada pelo fenômeno da autoincompatibilidade, que impede a autofecundação e até mesmo o cruzamento de diferentes plantas com os mesmos alelos de incompatibilidade. Neste caso, a autofecundação leva à perda de variabilidade alélica nos locos de incompatibilidade, o que dificulta a obtenção de linhagens.

Segundo DUVICK (1967), a autoincompatibilidade é um mecanismo que induz à alogamia e que mantém alto grau de heterozigose. Este mecanismo pode ser tão eficiente quanto à condição dióica no forçamento à polinização cruzada (ALLARD, 1999).

BRUCKNER et. al. (1995) relataram que a autoincompatibilidade do maracujazeiro é do tipo esporofítica. Entretanto, o mesmo grupo de pesquisadores relata que existe um gene de efeito gametofítico associado ao sistema esporofítico (SUASSUNA et al., 2003). As proteínas responsáveis pela autoincompatibilidade são encontradas no estigma e na parte superior do estilete, a partir de dois dias antes da antese, aumentando gradativamente até esse dia (RÊGO, 1997).

MADUREIRA (2009), em seus resultados, deixou evidente que o sitio da resposta de autoincompatibilidade (AI) em *Passiflora* é a superfície do estigma, característica comum em espécies possuidoras de AI esporofíticas. E, além disso, as suas análises moleculares geraram indícios de que, em *Passiflora edulis*, há genes com alta similaridade com aqueles envolvidos com a AI esporofítica em *Brassica*.

### 2.2. Melhoramento genético do maracujazeiro

O melhoramento do maracujazeiro constitui-se num campo de pesquisa promissor, devido à sua ampla variabilidade genética, ao ciclo de produção relativamente curto e ao interesse crescente pela cultura (OLIVEIRA, 1980). A escolha dos genitores e o planejamento cuidadoso dos cruzamentos aumentam as chances do desenvolvimento de variedades superiores, pois maximiza o uso dos genes desejáveis (BORÉM & MIRANDA, 2005).

Atualmente, busca-se, por meio de pesquisas, selecionar genótipos de maracujá-azedo e maracujá-doce mais produtivos e resistentes a pragas e doenças, sendo a hibridação interespecífica uma das alternativas, ou seja, cruzamentos convencionais de seleção ou cultivares comerciais com espécies silvestres, geralmente, apresentam resistência a doenças. Dessa forma, torna-se essencial conhecer as características agrônômicas, físicas e químicas das espécies nativas utilizadas nos cruzamentos (BRAGA et al., 2005).

Os programas de melhoramento do maracujazeiro devem visar, além da qualidade dos frutos e produtividade, à incorporação de resistência a moléstias nos atuais cultivares, ou desenvolvimento de outras com alguma tolerância a elas.

Entretanto, poucos são os relatos sobre o assunto, embora se saiba que o melhoramento pode contribuir significativamente para o aumento da produtividade da cultura. Sendo uma cultura de importância e cultivo comercial recentes, esta variabilidade ainda está por ser explorada. E para desenvolver um cultivar de maracujá, é preciso, primeiramente, conhecer, explorar e manusear convenientemente a variabilidade genética disponível, dentro de um programa de melhoramento bem conduzido, (MELETTI, 1998).

Vários são os métodos de melhoramento aplicáveis ao maracujazeiro, objetivando o aumento da frequência de alelos favoráveis. Neste caso, deve-se formar uma população-base com genótipos superiores para diversas características de interesse, como, por exemplo, produção, boa qualidade de frutos e resistência a pragas e doenças, sem se esquecer da necessidade de manutenção da variabilidade alélica para os locos de incompatibilidade. Estas populações seriam utilizadas como fontes de germoplasma em programas de melhoramento visando à obtenção de cultivares (BRUCKNER, 2002).

Algumas variedades identificadas com certo tipo de seleção dirigida já estão disponíveis aos produtores brasileiros, dentre elas têm-se os híbridos intravarietais F2 IAC (IAC-273, IAC-275 e IAC-277), lançados em 1999, resultantes de um programa de melhoramento de nove anos, baseado em seleção massal, retrocruzamentos e teste de progênies (MELETTI, SANTOS e MINAMI, 2000). Existem, também, três seleções disponíveis no mercado e conhecidas como 'Maguary', 'Sul-Brasil' e 'Golden Star'.

VIANA et al. (2004) iniciaram um trabalho de avaliação de um conjunto de populações de maracujá azedo visando ao desenvolvimento de variedades. Foi

observada alta variabilidade e herdabilidade para número e comprimento de frutos, indicando a possibilidade de utilização da seleção massal para tais características. Já para percentagem de suco e espessura de casca, observaram-se pequena variabilidade e baixa herdabilidade, justificando a introdução de variabilidade e o uso de métodos de seleção mais elaborados.

MORAES et al. (2005) avaliaram a população derivada do cruzamento entre os acessos IAPAR-123 e IAPAR-06, e observaram um conjunto de plantas com potencial agrônomo para utilização em ciclos de seleção recorrente. Os resultados indicaram que a população apresenta viabilidade para a prática de seleção, e as estimativas de correlação apontaram quais características podem ser selecionadas em conjunto e quais necessitam de metodologias específicas.

NASCIMENTO et al. (2003) citam que o melhoramento da família Passifloraceae deve ser feito visando ao atendimento de mercados distintos. Assim, nesse mesmo trabalho, os autores avaliaram uma série de progênies de maracujazeiro azedo utilizando seleção massal, e destacaram cinco progênies com características desejáveis para o consumo *in natura* e quatro para a indústria de suco concentrado.

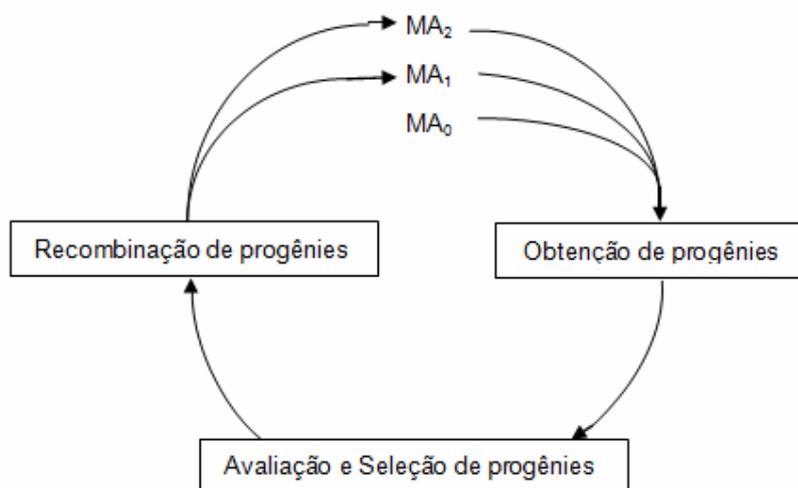
No melhoramento visando à resistência a doenças, atenção especial deve ser dada ao vírus do endurecimento dos frutos (*passionfruit woodness virus* - PWV), à mancha-de-alternaria (*Alternaria* spp.), à verrugose (*Cladosporium herbarium*), à antracnose (*Glomerella cingulata*) e à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*), todas as doenças da parte aérea. Quanto àquelas do sistema radicular, merecem destaque a fusariose, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, e a podridão-do-pé causada por *Phytophthora* spp. (NAKASONE & PAULL, 1998; LIBERATO, 2002; SANTANA & LAU, 2002). Estas doenças causam grandes perdas de produção e depreciação dos frutos, chegando a inviabilizar o plantio em determinadas regiões.

Trabalhos envolvendo o uso de marcadores moleculares e mapeamento de regiões genômicas, associadas à tolerância à bacteriose do maracujazeiro, têm sido desenvolvidos, fornecendo subsídios aos programas de melhoramento (LOPES, 2003; MATTA, 2005).

### 2. 2.1. Seleção recorrente

A seleção recorrente é um método bastante eficaz e pode ser utilizado para a cultura do maracujazeiro. Neste método, busca-se a melhoria do desempenho das populações de forma contínua e progressiva por meio do aumento das frequências dos alelos favoráveis dos caracteres sob seleção, mantendo a variabilidade genética em níveis adequados para permitir ganhos genéticos nos ciclos subsequentes (HULL, 1945; HALLAUER, 1985; SOUZA JÚNIOR, 2001).

SOUZA JÚNIOR (2001) relata que cada ciclo da seleção recorrente é constituído de quatro etapas: obtenção de progênies, avaliação destas em experimento com repetições, seleção das progênies superiores e recombinação destas. Cada ciclo, portanto, só termina com a recombinação das progênies que originarão a nova população. (Figura 1).



**Figura 1.** Representação esquemática da seleção recorrente, onde  $MA_0$ ,  $MA_1$ ,  $MA_2$  .....  $MA_n$  representam os diversos ciclos de seleção (Adaptado de SILVA 2009).

A população inicial, à qual será aplicada a seleção recorrente, pode ser uma variedade de polinização aberta, variedade sintética, híbrido, entretanto, é de fundamental importância que tais populações possuam um elevado comportamento médio e variabilidade genética suficiente para assegurar um progresso contínuo durante os ciclos de seleção (BORÉM, 2001).

Este método de seleção foi primeiramente empregado por HULL em 1945, como sendo uma re-seleção, geração após geração, com intercruzamento entre os tipos selecionados, para obter a recombinação gênica, de modo que se pudesse elevar a frequência de alelos favoráveis e manter a endogamia em baixo nível, a ponto de assegurar um alto grau de variabilidade genética (PINTO, 1995).

Este esquema seletivo vem sendo utilizado em programas de melhoramento delineados para médio e longo prazo, como no milho, por exemplo. Dessa forma, com o passar dos ciclos de seleção, espera-se que o desempenho médio da população melhore, permitindo que cada ciclo possa ser utilizado como fonte de novas linhagens. Essas linhagens desenvolvidas podem ser empregadas para a produção de novos híbridos ou participar do processo de reciclagem de materiais elites (SOUZA JÚNIOR, 2001).

Os esquemas de seleção recorrente são classificados em duas categorias: seleção recorrente intrapopulacional e interpopulacional. Na seleção recorrente intrapopulacional, o objetivo é melhorar as performances *per se* das populações, enquanto na interpopulacional, o objetivo é o melhoramento do cruzamento de duas populações, ou seja, o híbrido interpopulacional (HALLAUER, 1985; SOUZA JÚNIOR, 1993).

BORÉM (2001) ressalta que os métodos intrapopulacionais, em geral, são mais comumente utilizados do que os interpopulacionais, pois são de mais fácil execução e aplicáveis à maioria das características agrônômicas.

O progresso do melhoramento intrapopulacional, sem considerar o método de seleção empregado, depende da magnitude e natureza da variabilidade genética existente na população, (SILVA, 2009).

### **2.2.2. Melhoramento do maracuzajeiro azedo na UENF**

Com o objetivo de desenvolver cultivares mais produtivos e adaptados, a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) deu início a um programa de melhoramento genético do maracujazeiro em 1998, com a coleta inicial de vários genótipos em três regiões produtoras e distintas do estado do Rio de Janeiro (VIANA et al., 2003, 2004). Com base nesses estudos iniciais, procurou-se, em uma segunda fase, realizar uma amostragem mais ampla em áreas comerciais da região Norte Fluminense, onde, por meio de delineamentos

genéticos apropriados, obteve-se um maior número de progênes. Assim, com base nos resultados destas análises iniciais, optou-se pela elaboração de um programa de seleção recorrente intrapopulacional (GONÇALVES, 2005; GONÇALVES et al., 2007, 2008, 2009 e SILVA, 2009).

No trabalho de GONÇALVES (2005), para uma população de maracujá azedo, a seleção recorrente intrapopulacional foi indicada pela sua maior facilidade de execução e por várias características importantes terem apresentado a aditiva, como ação gênica predominante. Nesse trabalho, foram avaliadas 97 progênes de maracujá azedo e selecionados 27 indivíduos, dando início ao primeiro ciclo de seleção recorrente, nomeado Maracujá Amarelo Zero (MA<sub>0</sub>).

Para a obtenção dessas progênes, foram amostradas plantas ao acaso nas linhas de plantio, na área da Empresa Bela Joana em Campos dos Goytacazes-RJ, no período de maio a julho de 2002, sendo esta população composta pelos seguintes materiais: Maguary, Yellow Master e seleções de São Francisco do Itabapoana, com coeficiente de endogamia  $F=0$ . Realizaram-se cruzamentos seguindo o Delineamento I, procedimento proposto por COMSTOCK & ROBINSON (1948), formando progênes de irmãos completos e meios-irmãos. Para tanto, uma planta doadora de grãos de pólen (pai) foi cruzada com um grupo de cinco plantas receptoras (mães), de modo que cada pai foi cruzado com um grupo de mães diferentes, obtendo-se três frutos por mãe.

O segundo ciclo de seleção denominado Maracujá Amarelo Um (MA<sub>1</sub>) foi conduzido por SILVA (2009), no qual os indivíduos selecionados foram obtidos de cruzamentos dirigidos, envolvendo 27 progênes selecionadas por GONÇALVES (2005). A recombinação nesse caso foi feita utilizando meio-irmãos maternos, cuja mãe foi a própria progênie selecionada e o pai foi a mistura de pólen oriundo de todas as progênes selecionadas. Com a recombinação, foram obtidas 140 progênes de irmãos completos, formando a nova população de trabalho e, utilizando índice de seleção, foram selecionados 30% dessas progênes, obtendo-se um total de 39 genótipos (SILVA et al., 2009).

Além disso, não há relatos na literatura a respeito de programas de melhoramentos em Passifloras em que utilizam o método de seleção recorrente. Trata-se, portanto, de uma proposta pioneira em termos de pesquisa, possibilitando a geração de grande volume de conhecimento sobre as

características genéticas dessa fruteira, além de ajustes em métodos de melhoramento que poderão ser aplicados ao maracujazeiro (SILVA, 2009).

### 2.3. Marcadores de DNA

Existem, atualmente, vários tipos de marcadores moleculares, geralmente conhecidos por suas siglas. Geneticamente, pode-se separá-los em dois grupos principais: a) marcadores moleculares loco-específicos codominantes, como o RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism* - (GRODZIKER et al., 1974), os SSR - *Simple Sequence Repeats* - (LITT & LUTTY, 1989) e as isoenzimas; e b) marcadores loco-não-específicos dominantes, como o RAPD - *Random Amplified Polimorphic DNA* - (WILLIAMS et al., 1990) e o AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism* - (VOS et al., 1995).

Os marcadores moleculares de DNA têm contribuído substancialmente para dar suporte aos estudos de genética de populações de diversas espécies e tendem, pouco a pouco, a ser usados para assistir os procedimentos de seleção e melhoramento. Por intermédio deles, é possível analisar a variabilidade genética, identificar genótipos ou genes específicos e detectar possíveis associações entre os marcadores e as características fenotípicas (VIEIRA et al., 2005).

De um modo geral, diversas aplicações de marcadores moleculares em melhoramento genético podem ser distribuídas em ações cujos resultados apresentam expectativas a curto, médio e longo prazo. As aplicações a curto prazo envolvem, basicamente, a identificação e discriminação de genótipos. Nas aplicações analíticas a médio-longo prazo, os marcadores permitem quantificar a variabilidade genética existente no nível de sequência de DNA e correlacioná-la com a expressão fenotípica em procedimentos de mapeamento genético (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores moleculares podem ser eficientemente utilizados nas diferentes etapas ou procedimentos de melhoramento do maracujazeiro-amarelo. Em etapas de pré-melhoramento, tais marcadores são usados na caracterização e na avaliação de bancos de germoplasma, bem como no mapeamento e na análise de genes de interesse. No melhoramento propriamente dito, os marcadores são empregados tanto no melhoramento populacional quanto nos

trabalhos de hibridação, auxiliando a maximização não só dos ganhos genéticos, mas também da heterose. No pós-melhoramento, podem ser utilizados para assegurar a paternidade de cultivares, seminais ou clonais, desenvolvidos, bem como, monitorar a pureza das sementes e os clones produzidos e repassados aos agricultores (PEREIRA et al., 2005).

Dentre as técnicas moleculares, destacam-se os marcadores baseados em hibridação, RFLP ou polimorfismo de tamanho de fragmento, nas quais o genoma é fragmentado por enzima de restrição e observado por hibridização destes fragmentos com sequência homóloga e marcadas radiotivamente (sondas); e os derivados de aplicação da PCR (Polimerase Chain Reaction), como o RAPD ou DNA polimórfico amplificado ao acaso, que, nesta técnica, o segmento de DNA utiliza um iniciador que irá anelar-se arbitrariamente à sequência complementar no DNA. O AFLP, ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados, utiliza ações combinadas de enzimas de restrição e de reação da polimerização em cadeia (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

### **2.3.1. Marcadores moleculares microssatélites**

Os microssatélites ou SSR ou STMS (*Sequence Tagged Microsatellite Sites*) são sequências repetidas de um a seis nucleotídeos, espalhadas pelo genoma de um indivíduo, cujas regiões são delimitadas por sequências conservadas de DNA, para as quais são desenhados iniciadores específicos (GUIMARÃES et al., 2004) e complementares à sequência única que flanqueia o microssatélite e se repetem lado a lado na fita de DNA (Figura 2), no genoma de eucariotos (TAUTZ & RENZ, 1984; LITT & LUTY, 1989).

Regiões contendo essas sequências podem ser amplificadas por PCR, utilizando um par de iniciadores específicos (cerca de 20-25 bases) complementares às sequências conservadas que flanqueiam o microssatélite. Essa técnica revela polimorfismo em um loco, devido a diferenças no número de vezes que o microssatélite (por exemplo, CA, AG, TTG, ATGC) repete-se naquele loco (TAUTZ, 1989; WEBER & MAY 1989; HANCOCK, 1995).

Marcadores SSR caracterizam-se por serem codominantes, abundantes, aparentemente distribuídos por todo o genoma, multialélicos e dependentes de pequena quantidade de DNA dos indivíduos analisados, por serem baseados em

PCR e eletroforese em gel, sendo que, cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco. Assim, essas características fazem, dos microssatélites, os marcadores mais indicados para diversos estudos, incluindo a construção de mapas de ligação (revisto por GUPTA & VARSHNEY, 2000; ELLEGREN, 2004).

Uma vantagem adicional é que esses marcadores apresentam, em geral, alta taxa de transferência entre espécies aparentadas e até mesmo entre gêneros da mesma família (CHOUMANE et al., 2004; GUTIERREZ et al., 2005). Isso ocorre porque, embora as regiões microssatélites estejam sujeitas a altas taxas de mutação, as regiões flanqueadoras são, frequentemente, conservadas entre espécies ou gêneros próximos.

Nos últimos anos, os microssatélites têm atraído a atenção dos pesquisadores devido a sua grande utilização na construção de mapas genéticos (POWELL et al., 1996; CREGAN et al., 1999; SCHULER et al., 1996; KNAPIK et al., 1998); à relação entre instabilidade do número de repetições e doenças genéticas (STALLINGS, 1994; MAHADEVAN et al., 1992), à praticidade e facilidade que proporcionam aos estudos de genética de populações e conservação (TAUTZ, 1989; DAYNADAN et al., 1997; DAYNADAN et al., 1999; COLLEVATTI et al., 1999; GAIOTTO, 2001), e à identificação de indivíduos, genótipos e análise de paternidade (SCHLÖTTERER et al., 2000).

OLIVEIRA et al., (2006), trabalhando com AFLP E SSR, objetivaram integrar os mapas de maracujá azedo, usando a mesma progênie de irmãos completos utilizadas para a construção dos mapas baseados em marcas de RAPD e AFLP (CARNEIRO et al 2002; LOPES et al. 2006), aplicando o método proposto por WU et al. (2002) que incorpora, em suas análises, informações de marcas com diferentes razões genotípicas.

Esses marcadores genéticos, baseados na identificação de polimorfismo de DNA, ainda poderão ser utilizados pelo melhorista para criar um padrão genético (*fingerprinting*) próprio de cada cultivar (STAUB et al., 1996), pois não depende da idade da planta, do ambiente, do estado sanitário e do clima. Assim, a identidade genética do material poderá ser feita em plantas jovens micropropagadas, facilitando sua identificação, comercialização (HINRICHSEN, 1999) e intercâmbio de germoplasma (GHISLAIN et al., 2000), sendo muito importante para assistir os programas de melhoramento.

## 2.4. Marcadores moleculares em *Passiflora*

Os avanços das pesquisas na área da biologia molecular, o desenvolvimento de equipamentos cada vez mais automatizados e na bioinformática têm possibilitado a geração de um número virtualmente ilimitado de marcadores, permitindo a cobertura completa do genoma de interesse. Tais avanços vêm potencializar a incorporação dos marcadores moleculares nas diferentes etapas dos programas de melhoramento genético. Tratando-se de plantas semiperenes, como é o caso do maracujazeiro, a utilização desses marcadores se reveste ainda de maior importância (PEREIRA et al., 2005).

No gênero *Passiflora*, são vários os trabalhos realizados em que se faz uso de marcadores moleculares. Um dos usos mais comuns refere-se ao estudo da variabilidade genética presente (PEREIRA et al., 2005; VIANA et al., 2003; VIEIRA et al., 2005).

OLIVEIRA et al. (2006), trabalhando com AFLP E SSR, tiveram como objetivo de trabalho integrar os mapas de maracujá azedo, usando a mesma progênie de irmãos completos utilizadas para a construção dos mapas baseados em marcas de RAPD e AFLP (CARNEIRO et al., 2002; LOPES et al., 2006), aplicando o método proposto por WU et al. (2002) que incorpora, em suas análises, informações de marcas com diferentes razões genotípicas.

ANGEL et al. (1998); CASSIANO et al. (1998); VIANA et al. (2003); VIEIRA et al. (1997); FALEIRO et al. (2004) e BELLON et al. (2007) realizaram trabalhos referentes à diversidade genética no gênero *Passiflora*, utilizando marcadores RAPD, e observaram variabilidade genética expressiva em diferentes acessos de uma mesma espécie de *Passiflora*.

BELLON et al. (2005), utilizando a técnica de RAPD, observaram grande variabilidade intraespecífica entre os acessos comerciais e silvestres de *P. alata*.

JUNQUEIRA et al. (2005), trabalhando com marcadores RAPD em acessos de *P. nítida*, verificaram uma alta variabilidade, especialmente quando se compararam acessos de procedências diferentes.

Por outro lado, estudos realizados por VIANA et al. (2003) e FALEIRO et al. (2005), utilizando-se de diferentes acessos da espécie comercial *P. edulis*,

não mostraram expressiva variabilidade genética entre esses materiais, indicando um possível estreitamento da base genética entre os cultivares comerciais.

Estudos realizados por JUNQUEIRA et al. (2003) mostraram que essa baixa variabilidade entre os cultivares atuais de maracujazeiro azedo tem contribuído para a redução da resistência a doenças.

GANGA et al. (2004) avaliaram a diversidade genética entre 36 acessos de maracujazeiro azedo, provenientes de 18 estados da federação, utilizando marcadores AFLP, e verificaram uma grande diversidade genética entre os acessos e uma não estruturação geográfica entre aqueles coletados de um mesmo estado ou região. Assim, a diversidade genética revelada por tais marcadores pode auxiliar na definição de estratégias mais eficientes a serem utilizadas em programas de melhoramento de maracujá azedo.

VIANA et al. (2003) avaliaram a diversidade genética entre acessos de várias espécies do gênero *Passiflora*, via RAPD, e observaram grande variabilidade genética entre as espécies *P. foetida*, *P. alata*, *P. gibertii*, *P. suberosa*, *P. cincinnata*, *P. maliformis* e *P. edulis* f. *edulis*, sendo que as espécies *P. edulis* e *P. gibertii* foram as mais distantes entre as espécies estudadas. E *P. cincinnata* e *P. edulis* f. *edulis* formaram um mesmo grupo, sugerindo que elas compartilham uma similaridade genética.

Entretanto, pesquisas que fazem uso de técnicas e ferramentas moleculares como microssatélites - SSR (PADUA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005), são ainda incipientes para o gênero *Passiflora*, visto o grande número de espécies não estudadas e o potencial inexplorado de marcadores SSR. O pequeno volume, até o momento, de pesquisas envolvendo marcadores SSR em *Passifloras*, justifica-se, ao menos em parte, devido ao tempo e aos gastos necessários para gerações destes marcadores. Entretanto, salientam ainda que o grande poder de discriminação destes marcadores justifica o seu uso visando a uma boa representação da diversidade genética existente, conduzindo a estudos de diversidade inter e intraespecífica e promovendo melhor compreensão do seu genoma (GRAPIN et al., 1998).

### **3. TRABALHOS**

#### **3.1. VARIABILIDADE GENÉTICA DE PROGÊNIES DE MARACUJAZEIRO AZEDO SELECIONADOS EM DOIS CICLOS DE SELEÇÃO RECORRENTE ESTIMADA VIA MICROSSATÉLITES**

##### **3.1.1. RESUMO**

Utilizaram-se 23 pares de iniciadores microssatélites na genotipagem dos 66 genótipos de irmãos completos, referentes aos ciclos  $MA_0$  e  $MA_1$  do programa de seleção recorrente do maracujazeiro azedo da UENF. O DNA genômico foi extraído de folhas jovens, com uso do método CTAB. Foram empregadas estatísticas descritivas de diversidade, tais como, heterozigose esperada ( $H_e$ ), heterozigose observada ( $H_o$ ), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e coeficiente de endogamia (F), com o intuito de estimar a variabilidade das progênies dos dois ciclos de seleção recorrente. O número de alelos encontrados nas populações foram 32, sendo que, dos 32 encontrados, 30 são coincidentes e observados nas duas populações  $MA_0$  e  $MA_1$ , o número médio de alelos por locos foi de 2,46, na população  $MA_0$ , e de 2,30, na população  $MA_1$ . A heterozigose esperada ( $H_e$ ) na população  $MA_0$  apresentou média de 0,20 por loco, um pouco maior que a heterozigose observada ( $H_o$ ) que apresentou média de 0,15 por loco.

Os índices de coeficiente de endogamia ( $F$ ) mostraram valores negativos para a maioria dos locos, sugerindo índices altos de heterose nesses locos. A  $H_o$  foi menor que a  $H_e$  na população  $MA_1$ , com média de 0,12. O coeficiente de endogamia médio ( $F$ ) da população  $MA_1$  foi de 0,31. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) apresentou média de 0,18 na população  $MA_0$  e de 0,16 na população  $MA_1$ . Os dendogramas, obtidos pelo índice ponderado e método de agrupamento UPGMA, apresentaram os coeficientes de correlação cofenético ( $r$ ) alto 0,83, para a população  $MA_0$ , e 0,86, para a população  $MA_1$ . A distância genética média da população  $MA_0$  foi de 0,21 e, de 0,19, na população  $MA_1$ , apresentando uma pequena perda de variabilidade, sendo que essa flutuação seja considerada normal quando se pratica seleção. O coeficiente de endogamia apresentou resultado médio maiores na população  $MA_1$ , e a distância genética média decresceu entre os ciclos, ainda que não tenha representado perdas significativas. A população de trabalho  $MA_1$  ainda continuou a possuir variabilidade genética intrapopulacional suficiente para a continuidade do programa de seleção recorrente do maracujazeiro.

### 3.1.2. ABSTRACT

A total of 23 pairs of microsatellite primers in the genotyping of 66 genotypes of full sibling, related to  $MA_0$  and  $MA_1$  of recurrent selection cycles program of the passion fruit UENF were used. Genomic DNA was extracted from young leaves using the CTAB method. Diversity descriptive statistics were used, such as expected heterozygosity ( $H_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), polymorphic information content (PIC) and inbreeding coefficient ( $F$ ), in order to estimate the variability of the progenies of two recurrent selection cycles. The number of alleles found in populations was 32, and that of 32 matches, 30 are coincident and observed in two populations  $MA_0$  and  $MA_1$ , the mean number of alleles per locus was 2.46 in the  $MA_0$  population and 2.30 in  $MA_1$  population. The expected heterozygosity ( $H_e$ ) in the  $MA_0$  population had an average of 0.20 per locus, a little larger than the observed heterozygosity ( $H_o$ ) which had an average of 0.15 per locus. The rates of inbreeding coefficient ( $F$ ) showed negative values for most loci,

suggesting high levels of heterosis in these loci. The  $H_o$  was lower than the  $H_e$  in  $MA_1$  population, with an average of 0.12. The inbreeding coefficient ( $F$ ) average of the population  $MA_1$  was 0.31. The polymorphic information content (PIC) had an average of 0.18 in  $MA_0$  population and 0.16 in  $MA_1$ . The dendograms obtained by the weighted index and UPGMA clustering method, showed the cophenetic correlation coefficient ( $r$ ) high 0.83 for the  $MA_0$  population, and 0.86 for the  $MA_1$  population. The average genetic distance of the  $MA_0$  population was 0.21 and 0.19 in  $MA_1$  population, with a small loss of variability, and this fluctuation is considered normal when selection is practiced. The inbreeding coefficient showed mean higher score in the  $MA_1$ , and the average genetic distance decreased between the cycles, but it has not represented a significant loss. The population of working  $MA_1$  still continued to have sufficient genetic variability for the continuity of the recurrent selection program of passion fruit..

### 3.1.3. INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* é amplamente distribuído na América e possui grande variabilidade genética a ser conservada e utilizada em programas de melhoramento. O interesse econômico pelo gênero é relacionado principalmente à produtividade de frutos, merecendo destaque o maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis*), espécie, deste gênero, mais cultivada no mundo e predominante no mercado brasileiro, (CERQUEIRA et al., 2008).

O Brasil, por ser centro de origem do maracujá, possui ampla variabilidade genética, que é o ponto de partida para qualquer programa de melhoramento genético de uma espécie, e cuja caracterização e avaliação são ferramentas indispensáveis aos trabalhos de fitomelhoramento (GANGA et al., 2004).

Estudos de melhoramento genético, na maioria das vezes, visam ao desenvolvimento de materiais superiores com relação, principalmente, aos caracteres de interesse agrônomo e tendem a utilizar a hibridação intraespecífica para a recombinação de genes de interesse. A hibridação interespecífica é também utilizada, especialmente, em programas que visam à

transferência de genes de resistência a determinadas doenças, encontradas nas espécies silvestres, para as cultivadas. Entretanto, tanto para o melhoramento intraespecífico quanto para o interespecífico, é necessário o conhecimento da variabilidade genética presente nas populações-base (VIANA et al. 2004).

Por se tratar de uma espécie semiperene, o estudo da diversidade genética em *Passiflora spp.* requer tempo e sofre grande influência do ambiente. Neste caso, o uso de marcadores moleculares vem sendo uma ferramenta valiosa, por permitir um rápido, preciso e acurado estudo de variabilidade existente (BELLON et al., 2007).

Avaliações da diversidade genética dos potenciais genitores, por meio de marcadores moleculares, são muitas vezes correlacionados com a resposta heterótica (TOWNSEND et al., 2005). A escolha de genitores mais divergentes pode aumentar o desempenho dos híbridos obtidos ou simplesmente aumentar a chance de obter diferentes combinações gênicas de interesse (PINTO et al., 2003).

Alguns autores realizaram trabalhos referentes à diversidade genética no gênero *Passiflora*, utilizando marcadores RAPD (VIEIRA et al., 1997; ANGEL et al. 1998; CASSIANO et al., 1998; VIANA et al., 2003; FALEIRO et al. 2004; BELLON et al. 2007) e AFLP (GANGA et al. 2004).

Entretanto, pesquisas que fazem uso de técnicas moleculares, como microssatélites - SSR (OLIVEIRA et al., 2005; PADUA et al., 2005), são ainda incipientes para o gênero *Passiflora*, visto o grande número de espécies ainda não estudado e o potencial inexplorado deste tipo de marcador genético.

VIEIRA et al. (2005) relatam que a eficiência de um programa de melhoramento de maracujazeiro será tanto maior quanto mais adequado for o método de seleção adotado e as populações escolhidas para praticar a seleção, sendo que a adoção de técnicas moleculares poderá auxiliar este processo.

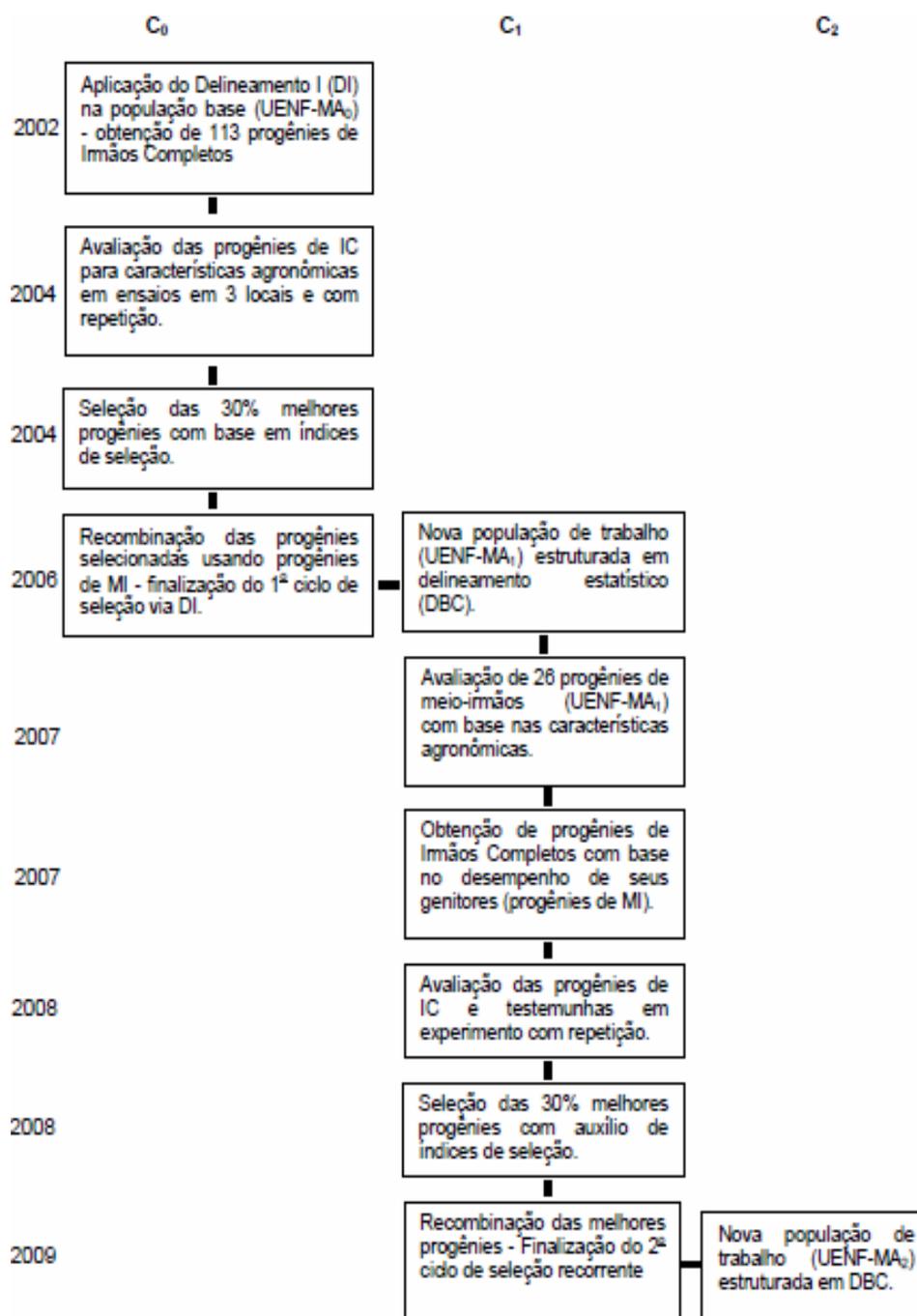
Portanto, conhecendo-se o nível de variabilidade genética da população e sabendo-se quais os indivíduos mais distantes geneticamente, podem-se direcionar os cruzamentos com maior exatidão. Com esse intuito, objetivou-se, nesse trabalho, avaliar a variabilidade genética entre e dentro de duas populações de irmãos completos de maracujazeiro, via marcadores SSR, referentes a dois ciclos de seleção recorrentes realizados; e indicar os genótipos mais divergentes para os próximos ciclos de seleção recorrente a ser conduzido pelo programa de

melhoramento genético desenvolvido pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

### **3.1.4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1.4.1. Material genético**

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Virologia e Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical em Cruz das Almas – BA, em parceria com o Laboratório de Marcadores Moleculares da Universidade Estadual do Norte Fluminense em Campos dos Goytacazes - RJ. Avaliou-se um total de 66 genótipos, 27 indivíduos provenientes do primeiro ciclo de seleção recorrente, nomeado Maracujá Amarelo Zero (MA<sub>0</sub>), cujos genótipos foram selecionados das 113 progênies de maracujá amarelo do trabalho de GONÇALVES (2005). Os outros 39 genótipos foram selecionados por SILVA (2009), sendo advindos de cruzamentos dirigidos, envolvendo 26 progênies selecionadas por GONÇALVES (2005), (Figura 1).



**Figura 1** - Fluxograma do programa de seleção recorrente intrapopulacional do maracujazeiro azedo, SILVA (2009).

### 3.1.4.2. Iniciadores microssatélites

Foram utilizados 23 iniciadores microssatélites pertencentes à série PE, desenvolvidos por OLIVEIRA (2006), (Tabela 1).

**Tabela 1.** Locos microssatélites (SSR), iniciadores (F/R – *forward/reverse*), motivo, classificação (interrompidas, perfeitas ou imperfeitas), tamanho do alelo (pb), mix (2, 4, 5, 7) e temperatura de anelamento (TA), de todos os iniciadores utilizados no trabalho.

<b>Loco</b>	<b>Iniciador <i>forward</i></b>	<b>Iniciador <i>reverse</i></b>	<b>Motivo</b>	<b>Classificação</b>	<b>Alelo (pb)</b>	<b>Mix</b>	<b>TA</b>
PE74	ccctcttatcaatagcgttgg	gcacgagcacgagtatttatt	(ATCACA)5	Interrompido	215	2	TD56
PE08	ccggatacccacgcatta	tctaatgagcggaggaaagc	(GTTGTG)4	Perfeito	282	4	TD56
PE38	gatcggctctcggttagac	agtcacacagcatgagaaatc	(TG)8	Perfeito	215	5	TD56
PE23	caatccctgacccataga	cgccatccttctcctt	(GA)19	Perfeito	206	7	TD56
PE59	gaacacttcgcatggctaga	ttccgaatcaaaccgtaact	(ATCTA)3	Perfeito	276	7	TD56
PE03	gcagcgagggaagaaaaa	tgagacatcgtgcgtgaa	(GA)10	Interrompido	156	2	TD60
PE37	caaaaggataggcctgatgtc	tgcttggtcatccactgaag	(TG)8	Perfeito	232	2	TD60
PE58	gcaatttcaccatcttctgct	ccacggcatggatgttc	(AC)11	Perfeito	243	2	TD60
PE11	gcataagtgtcggcttgg	cctcgaacctctatcatcca	(GT)11	Perfeito	178	4	TD60
PE13	aagcacccaatcgttga	cccctgccacctgagta	(GT)6	Interrompido	172	4	TD60
PE04	atgcttttgaaatccgttt	tgctcatgcaaagtcactgg	(TG)9	Imperfeito	235	5	TD60
PE24	tcaaactgaactcgtaaagg	gtgctgggagactgatgtt	(CA)15	Interrompido	294	5	TD60
PE27	ttgctcattgcactcatcct	gcagacatttctggagca	(GT)7	Perfeito	139	5	TD60
PE41	atcgggggtcgttatttg	cgttcatccttagtgggcta	(TTAA)5	Interrompido	220	5	TD60
PE66	ccatagtccaacaagcatc	gctgtggaccctaactcagtc	(AC)9	Perfeito	165	5	TD60
PE90	tcaggaagattgcatgttagt	ctgggtttgtttatgttc	(AGC)5	Perfeito	245	5	TD60
PE12	cgtaaatattgtttgggcaact	atcatgggcgaactcattt	(TG)8	Perfeito	150	7	60
PE18	ccgtgaaccaaccatttctc	ttgcagcacaacaagtcaa	(TG)9	Perfeito	220	7	TD60
PE20	aggatcaccatagaaaacct	gttaggttggcattgtctt	(AAAC)4	Imperfeito	242	7	TD60
PE35	attatgcctaaaaacccaaa	tgatccagaggttgagagg	(CA)9	Imperfeito	225	7	TD60
PE42	gtcacttcattcttcttcc	ttagcccactcaaacacaa	(GT)8	Perfeito	216	7	TD60
PE75	cacaatcggtgggaaagata	gtagtttgggcagtttgc	(TG)17	Perfeito	178	7	60
PE88	cttcagggtcacacacatt	gttcatccttagtgggct	(TTAA)6	Interrompido	293	7	60

### 3.1.4.3. Extração do DNA e condições de PCR

O DNA genômico total foi extraído a partir de folhas dos genótipos de maracujazeiro, compreendendo os genótipos dos dois ciclos de seleção recorrente (MA<sub>0</sub> e MA<sub>1</sub>), empregando-se o procedimento adaptado de DOYLE & DOYLE (1990).

A avaliação da quantidade e da qualidade do DNA foi realizada, por meio de comparações visuais da intensidade de fluorescência das bandas em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio com aquelas de concentrações conhecidas de DNA do fago  $\lambda$  (Gibco), sob luz ultravioleta (DyNA Quant 2000 Fluorometer, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK), diluídas em água ultrapura e padronizadas em 5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

Foram preparados quatro diferentes *mix* de reação para a otimização das reações de PCR conforme o iniciador (Tabela 2), Os reagentes que variaram entre os *mix* foram a concentração do tampão, o MgCl<sub>2</sub> e o dNTP.

**Tabela 2.** Concentração dos reagentes e relação dos *mix* usados para a otimização das reações de PCR, de acordo com os *primers* de microssatélites de maracujá azedo.

Reagentes	Mix 2	Mix 4	Mix 5	Mix 7
Tampão*	1X	2X	1X	1X
<i>Primer</i> F + R**	0,3 $\mu\text{M}$	0,3 $\mu\text{M}$	0,3 $\mu\text{M}$	0,3 $\mu\text{M}$
DNA	20 ng	20 ng	20 ng	20 ng
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	1,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
dNTP	200 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$	350 $\mu\text{M}$
Taq Polimerase	0,5 U	0,5 U	0,5 U	0,5 U
Água Mili-Q	9,7 $\mu\text{L}$	7,7 $\mu\text{L}$	8,9 $\mu\text{L}$	7,7 $\mu\text{L}$

\* O tampão dos *mix* para a concentração 1X continha 10mM de Tris-HCl pH 8,8; 50 mM de KCl e 0,8% de Nonidet P40;

\*\*F e R - *primers forward* e *reverse*, respectivamente.

As reações de amplificação foram realizadas, conforme descrito por OLIVEIRA (2006), com pequenas modificações ajustadas para cada *mix*. O volume das reações de amplificação foi de 20  $\mu\text{L}$ , contendo 20 ng de DNA

genômico; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 0.1% Triton-X; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 µM de cada dNTPs; 0,2 µM de cada iniciador e 0,5 unidades de Taq polimerase (Life Technologies do Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

As amplificações foram conduzidas em Termociclador Perkin Elmer, modelo 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), sendo utilizadas duas diferentes condições de amplificação em esquema de *touchdown*, com base nos programas TD60 e TD56 (Tabela 3).

Para alguns pares de iniciadores (PE88, PE75 e PE12), a utilização de uma temperatura de anelamento específica produziu melhores resultados, sendo utilizada a temperatura de 60 °C. Assim, o programa básico foi constituído por uma desnaturação inicial de 94 °C, por 5 min; e 30 ciclos de 94 °C, por 40 s (60 °C, de temperatura de anelamento), 72 °C por 50 s e uma extensão final de 5 min a 72 °C.

**Tabela 3** - Condições de amplificação usadas para a otimização das reações de PCR de acordo com os *primers* de microssatélites de maracujá-azedo

Programa TD60			Programa TD56		
Nº de ciclos	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos	Temperatura	Tempo
1	94 °C	5 min	1	94 °C	5 min
8	94 °C	40 s	12	94 °C	40 s
	60°C - 0,5 °C por ciclo	40 s		56°C - 0,5 °C por ciclo	40 s
	72 °C	50 s		72 °C	50 s
24	94 °C	40 s	20	94 °C	40 s
	56 °C	40 s		56 °C	40 s
	72 °C	50 s		72 °C	50 s
1	72 °C	5 min	1	72 °C	5 min
1	8 °C	∞	1	8 °C	∞

Os fragmentos foram separados em géis de poliacrilamida desnaturante (6% poliacrilamida, 8 M de ureia) sob condições padrões, sendo os produtos da amplificação corados com nitrato de prata para visualização dos alelos, utilizando-se o método de CRESTE et al. (2001).

### 3.1.4.4. Análise estatística dos dados

Após a exclusão dos dez marcadores monomórficos (PE08, PE23, PE03, PE13, PE27, PE41, PE12, PE59, PE35 e PE38), foram feitas análises estatísticas utilizando o aplicativo computacional GENES (Cruz, 2006), nos 13 locos que apresentaram polimorfismo (PE04, PE74, PE38, PE37, PE58, PE11, PE24, PE66, PE90, PE18, PE20, PE42 e PE75).

Foram utilizadas estatísticas descritivas, visto estas darem uma idéia inicial do polimorfismo genético de uma população. Diferentes parâmetros foram empregados para quantificar o conteúdo de informação das populações e, assim, caracterizar a variabilidade dentro e entre as populações, conforme descrito a seguir:

a) A frequência alélica foi estimada a partir de ocorrência das diferentes classes genotípicas. Assim, denominando a ocorrência de homozigotos na população de  $n_{ii}$  e de heterozigotos de  $n_{ij}$ , tem-se:

$$p_i = f(A_i) = \frac{2n_{ii} + \sum_{j=1, j \neq i}^a n_{ij}}{2n}$$

Sendo  $a$  o número de alelos apresentados pelo loco estudado e  $n$  o número total de indivíduos da população.

b) Conteúdo médio de informação polimórfica (PIC) foi calculado por meio do *software* NTSYS-pc (ROHLF, 2000), que é dado por:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^a p_i^2 - \sum_{i,j=1(i \neq j)}^a p_i^2 p_j^2$$

Onde:  $p_i$  e  $p_j$  são as frequências do  $i$ ésimo e  $j$ ésimo, alelo de determinados locos com  $t$  alelos na população, respectivamente.

O valor do PIC fornece uma estimativa do poder discriminatório do marcador, por considerar não somente o número de alelos por loco, mas também a frequência relativa desses alelos.

c) Heterozigidade observada que é estimada por:

$$H_o = \frac{\sum_{j=1, j \neq 1}^a n_{ij}}{n}$$

d) Heterozigidade esperada dada por:

$$H_e = 1 - \sum_{j=1}^a p_i^2$$

e) Coeficiente médio de endogamia (F) das populações por meio de:

$$F = 1 - \frac{H_o}{H_e}$$

$H_o$ : frequência de heterozigotos numa população supostamente em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

$H_e$ : frequência de heterozigotos numa população sujeita a acasalamento entre aparentados (dada por  $2pq-2e$ , quando se consideram apenas dois alelos por loco e  $e=pqF$ )

f) Índice Shannon-Wiener.

$$H' = - \sum_{i=1}^c P_i \ln(P_i)$$

Em que:

$c$ : é o número de classes genotípicas para um dado loco,

$P_i$ : é a frequência do  $i$ -ésimo genótipo,

$n$ : o tamanho da amostra ou o número de indivíduos da população  $i$ .

g) O dendograma foi obtido pelo Índice Ponderado, utilizando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average*) e sua correlação cofenética para as matrizes de distância genética.

O Índice Ponderado é dado por:

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

$L$ : número total de locos estudados;

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

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

$a_j$ : número total de alelos do loco  $j$ ;

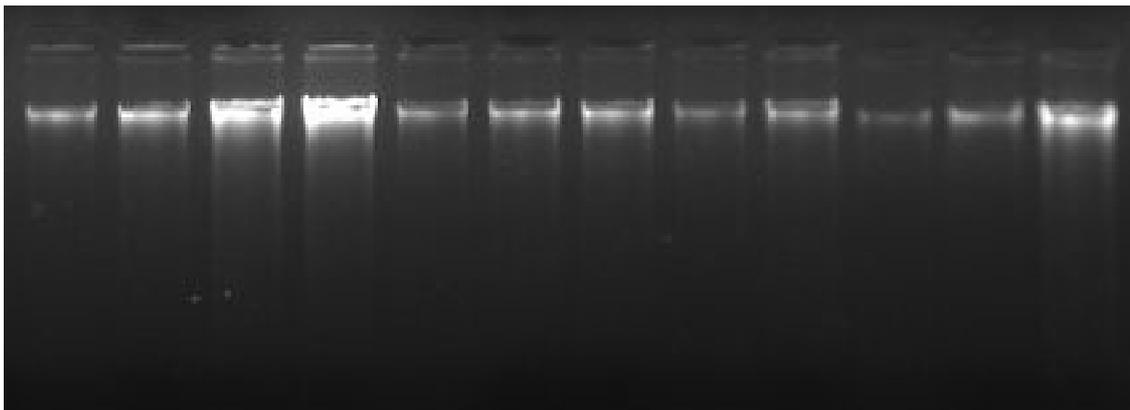
$A$ : número total de alelos estudados

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

### 3.1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1, podem ser observadas a qualidade e a integridade do DNA, quantificado em gel de agarose 0,8%, extraído dos 66 genótipos das duas populações de seleção recorrente ( $MA_0$  e  $MA_1$ ) de maracujazeiro azedo utilizados no trabalho.

A extração do DNA das plantas é o primeiro passo para a posterior utilização do mesmo nas diferentes técnicas moleculares, portanto, esta etapa é muito importante visto que o DNA precisa estar o mais íntegro possível para que os objetivos sejam alcançados com sucesso (ROMANO & BRASILEIRO, 2003).



**Figura 1.** Quantificação de parte das amostras de 66 genótipos de maracujá amarelo em gel de agarose 0,8%, mostrando a integridade do DNA extraído mediante o protocolo adaptado de DOYLE & DOYLE (1990).

O número de alelos total encontrado nas populações foram 32, sendo que, dos 32 encontrados, 30 são coincidentes e observados nas duas populações MA<sub>0</sub> e MA<sub>1</sub> (Tabela 4).

O número de alelos por loco variou de dois alelos, nos locos PE11, PE74, PE20, PE66, PE38, PE90, PE75 e PE78, a quatro alelos, no loco PE04. O número médio de alelos por locos foi de 2,46 na população MA<sub>0</sub> e de 2,31 na população MA<sub>1</sub>. O baixo número de alelos observados, nesse trabalho, pode estar associado aos genitores, visto serem advindos de cultivares recolhidos em áreas comerciais da região Norte Fluminense, os quais passaram por programas de melhoramento e apresentavam um alto nível de seleção.

Resultados semelhantes foram encontrados por VIANA et al. (2003), em um estudo intraespecífico, utilizando o marcador RAPD, sendo que os autores observaram baixo polimorfismo entre os indivíduos das populações de maracujá azedo. Para os 21 genótipos, em todos os iniciadores utilizados, a amplificação foi muito semelhante, com um padrão de bandas semelhante e consistente.

GÓIS et al. (2009), trabalhando com isoenzimas em *Spondias lutea* L., observaram que o número médio de alelos por loco foi de 2,80, e os autores consideraram esse valor alto, quando comparado com os resultados encontrados por BOTREL et al. (2006) em *Calophyllum brasiliense* (1,75) e TEIXEIRA et al. (2004) em *Myrciaria dubia* (1,50).

Na população MA<sub>1</sub>, ocorreu a fixação de um alelo presente no loco PE74, (Tabela 4). Além disso, houve a perda de dois alelos, um no loco PE74 e outro no loco PE42.

São considerados alelos raros aqueles que se apresentam com a frequência abaixo de 0,05%. E, no presente trabalho, foram encontrados 15 alelos raros, oito na população MA<sub>0</sub> e sete na população MA<sub>1</sub>,

Os resultados indicam que um desses alelos raros foi perdido durante o processo de seleção. Ressalta-se que, quando se pratica seleção dirigida em uma população, a variabilidade tende a ter pequenas variações; e perda de alelos, durante esse processo, podem acontecer, como observado por FURLAN et. al. (2007), em que houve uma perda de quatro alelos, durante o processo de seleção recorrente em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. Já no trabalho realizado por GÓIS et al. (2009), com *Spondias lutea* L., não foi detectado nenhum alelo raro ou muito raro. Os alelos que apresentaram menores frequências foram o alelo 1 do loco Est-2; o alelo 3 do loco Est-2 e o alelo 2 do loco Got, todos com frequência igual a 0,0625.

**Tabela 4.** Frequências alélicas dos 13 locos microssatélites polimórficos avaliados em progênes oriundas de dois ciclos de seleção recorrente de maracujazeiro azedo (MA<sub>0</sub> e MA<sub>1</sub>).

Locos- MA <sub>0</sub>	Alelos				Locos- MA <sub>1</sub>	Alelos			
	A1	A2	A3	A4		A1	A2	A3	A4
<b>PE04</b>	0.0370	0.8333	0.0185	0.1111	<b>PE04</b>	0.0513	0.7949	0.0641	0.0897
<b>PE11</b>	0.8333	0.1667			<b>PE11</b>	0.8333	0.1667		
<b>PE74</b>	0.9444	0.0556			<b>PE74</b>	1.0	0.0		
<b>PE37</b>	0.9259	0.0556	0.0185		<b>PE37</b>	0.9487	0.0256	0.0256	
<b>PE20</b>	0.7778	0.2222			<b>PE20</b>	0.7564	0.2436		
<b>PE66</b>	0.0370	0.9630			<b>PE66</b>	0.0256	0.9744		
<b>PE18</b>	0.0370	0.0556	0.9074		<b>PE18</b>	0.0769	0.0385	0.8846	
<b>PE24</b>	0.3333	0.5185	0.1481		<b>PE24</b>	0.2564	0.5897	0.1538	
<b>PE38</b>	0.0741	0.9259			<b>PE38</b>	0.0256	0.9744		
<b>PE42</b>	0.0370	0.9074	0.0556		<b>PE42</b>	0.0513	0.9487	0.0	
<b>PE90</b>	0.0370	0.9630			<b>PE90</b>	0.0256	0.9744		
<b>PE75</b>	0.0185	0.9815			<b>PE75</b>	0.0128	0.9872		
<b>PE58</b>	0.1296	0.8704			<b>PE58</b>	0.1026	0.8974		

A análise descritiva da diversidade genética dos dois ciclos de seleção recorrente de maracujazeiro azedo ( $MA_0$  e  $MA_1$ ) é apresentada na Tabela 5. A heterozigose esperada ( $H_e$ ), na população  $MA_0$ , variou de 0,03, no loco PE75, a 0,59, no loco PE24, com uma média de 0,20 por loco. A heterozigose observada ( $H_o$ ) variou de 0,03, nos locos PE75 e PE37, a 0,40, no loco PE24; e a média foi de 0,15 por loco. Os índices de coeficiente de endogamia (F) foram negativos para os locos PE74, PE66, PE18, PE38, PE42, PE90, PE75 e PE58, sugerindo excesso de heterose nesses locos (Tabela 5). Valores positivos de F foram observados nos locos PE04, PE11, PE37, PE20 e PE24, indicando a existência de endogamia nesses locos.

Para a população  $MA_1$  a  $H_e$ , média foi de 0,17, sendo o menor índice registrado no loco PE74, com valor zero. Isso ocorreu devido à fixação do alelo A1, durante o processo de seleção recorrente do ciclo um ( $MA_0$ ) para o ciclo dois ( $MA_1$ ), e o maior índice foi observado no loco PE24 (0,56). A  $H_o$  foi menor que a  $H_e$  na população  $MA_1$ , com média de 0,12; os locos PE18 e PE24 apresentaram os maiores valores, (0,23 e 0,41, respectivamente).

Em estudo realizado com *Caesalpinia echinata*, GIUDICI NETO et al. (2005) encontraram valores de heterozigosidade de 0,24, semelhantes aos encontrados neste estudo. Já no trabalho realizado por GÓIS, et al. (2009), em *Spondias lutea* L., foram obtidos resultados médios de heterozigosidade de (0,53), maiores do que os encontrados no presente trabalho, no entanto, as *Spondias* spp., de maneira geral, são pouco exploradas em programas de melhoramento e podem apresentar maiores níveis de variabilidade.

O coeficiente de endogamia médio (F) da população  $MA_1$  foi de 0,31, sendo que, nos locos PE11, PE20 e PE74, foram observados índices alto de endogamia, (0,53, 0,79 e 1,0, respectivamente), sendo que o loco PE74 influenciou negativamente esse índice (Tabela 5).

Estimativas do coeficiente F possibilitam mensurar a deficiência ou o excesso de heterozigotos nas populações. A redução dos indivíduos de uma população causa o aumento das taxas de endogamia aleatória e maiores efeitos da deriva genética, levando a perdas de alelos importantes.

OLIVEIRA et al. (2006), em estudo com maracujá azedo, obtiveram valores médios para o coeficiente de endogamia de (F=0,30), sendo o mais elevado de (F=0,78), revelando, portanto, que a maior parte da diversidade

genética encontra-se dentro da população de 160 plantas, oriundas do cruzamento entre os acessos IAPAR-123 x IAPAR-06. Considerando os valores encontrados em tais literaturas, os índices aqui obtidos foram semelhantes, e apresentaram valores altos em alguns locos, embora, na maioria dos locos, os níveis de (F) permaneceram baixos.

AULER (2004), no estudo de dez populações com SSR em *Baccharis trimera*, observou que o coeficiente de endogamia (F) apresentou resultados positivos, ainda que baixos na maioria das populações analisadas.

A intensidade de seleção a ser aplicada é uma decisão importante, uma vez que, se for muito elevada, pode ocorrer deriva genética, devido ao tamanho efetivo reduzido das populações geradas da recombinação das progênies selecionadas.

FALCONER & MACKAY (1996) demonstraram que o coeficiente de endogamia em uma dada geração é função, além de outros fatores, do tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ). Além do mais, a deriva genética pode acarretar perda de alelos favoráveis ou fixação dos alelos desfavoráveis, podendo ocorrer redução acentuada da variabilidade genética, o que pode comprometer os ganhos genéticos (HALLAUER et al., 1988).

O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), que demonstra o poder discriminatório de um marcador, variou de 0,06, nos locos PE66 e PE90, a 0,52, no loco PE24, com uma média de 0,18 na população  $MA_0$ .

Na população  $MA_1$ , os resultados observados do PIC foram de 0,0 no loco PE74, devido à fixação do alelo  $A_1$ , no referido loco, e 0,49, no loco PE24, com uma média de 0,16 (Tabela 5). Portanto, verifica-se que a média para o conteúdo da informação de polimorfismo foi baixa.

Foi realizada a análise da riqueza genética das duas populações  $MA_0$  e  $MA_1$ , utilizando o índice de Shannon-Wiener ( $H'$ ) (Tabela 5). A média observada foi de 0,55 na população  $MA_0$ , os locos que apresentaram maiores valores foram PE04 e PE24 com 0,82 e 1,43, respectivamente. Na população  $MA_1$ , o valor médio do  $H'$  foi de 0,48, cujos locos de maiores valores foram o loco PE04, com 0,96, e o PE24, com valores de 1,47.

**Tabela 5.** Análise descritiva da diversidade genética dos dois ciclos de seleção recorrente de maracujazeiro amarelo (MA<sub>0</sub> e MA<sub>1</sub>), heterozigose esperada (H<sub>e</sub>), heterozigose observada (H<sub>o</sub>), coeficiente de endogamia (F), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e o índice de Shannon-Wiener (H').

População MA <sub>0</sub>					Locos	População MA <sub>1</sub>				
H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	F	PIC	H'		H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	F	PIC	H'
0.2915	0.2593	0.1106	0.2719	0.8257	<b>PE04</b>	0.3534	0.2051	0.4190	0.3346	0.9615
0.2778	0.1111	0.6000	0.2392	0.6837	<b>PE11</b>	0.2778	0.1282	0.5385	0.2392	0.6987
0.1049	0.1111	- 0.0588	0.0994	0.3488	<b>PE74</b>	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0
0.1392	0.0370	0.7340	0.1333	0.3154	<b>PE37</b>	0.0986	0.0513	0.4800	0.0963	0.2023
0.3457	0.0741	0.7857	0.2859	0.7274	<b>PE20</b>	0.3685	0.0769	0.7913	0.3006	0.7601
0.0713	0.0741	- 0.0385	0.0688	0.2641	<b>PE66</b>	0.0500	0.0513	- 0.0263	0.0487	0.2023
0.1722	0.1852	- 0.7570	0.1648	0.6038	<b>PE18</b>	0.2101	0.2308	- 0.0986	0.1985	0.6871
0.5981	0.4074	0.3188	0.5217	1.4324	<b>PE24</b>	0.5628	0.4103	0.2710	0.4975	1.4717
0.1372	0.1481	- 0.0800	0.1278	0.4195	<b>PE38</b>	0.0500	0.0513	- 0.0263	0.0487	0.2023
0.1722	0.1852	- 0.0757	0.1648	0.6038	<b>PE42</b>	0.0973	0.1026	- 0.0541	0.0926	0.3307
0.0713	0.0741	- 0.0385	0.0688	0.2641	<b>PE90</b>	0.0500	0.0513	- 0.0263	0.0487	0.2023
0.0364	0.0370	- 0.0189	0.0357	0.1584	<b>PE75</b>	0.0253	0.0256	- 0.0130	0.0250	0.1192
0.2257	0.2593	- 0.1489	0.2002	0.5723	<b>PE58</b>	0.2051	0.2051	- 0.1143	0.1671	0.5074
<b>0.2033</b>	<b>0.1510</b>	<b>0.2574</b>	<b>0.1833</b>	<b>0.5553</b>	← Médias →	<b>0.1791</b>	<b>0.1223</b>	<b>0.3170</b>	<b>0.1613</b>	<b>0.4881</b>

O índice de Shannon-Wiener considera que, quanto mais próxima de zero, menor é a diversidade e, considerando que as populações sofreram processos de seleção, os valores obtidos são considerados bons. Entretanto, na literatura, encontram-se estimativas bem elevadas, como no trabalho conduzido por MANTOVANI (1996), em que os índices de diversidade de Shannon- Wiener encontrados foram de 2,78 e 2,28 em duas populações, sendo o índice de diversidade total  $H' = 2,97$ .

Em outro estudo, observou-se valores semelhantes ao do presente trabalho, como o descrito por (TOREZAN et al., 2005), em *Aspidosperma polyneur*, obtiveram-se  $H' = 0,41$  para indivíduos adultos.

Os resultados da análise descritiva dos dois ciclos de seleção não mostraram uma expressiva variabilidade genética entre os genótipos avaliados, com base na análise dos marcadores SSR. Esses resultados podem ser explicados pela baixa variabilidade dos genitores selecionados (Maguary, Yellow Master), que são variedades comerciais que já sofreram um grande processo de seleção. Resultados semelhantes aos encontrados, neste trabalho, foram obtidos por vários outros autores como VIANA et al. (2003), e FALEIRO et al. (2005b). Tais autores utilizaram diferentes acessos da espécie comercial de maracujá-azedo (*P. edulis*), e não observaram expressiva variabilidade genética entre esses materiais, indicando um possível estreitamento da base genética entre os cultivares comerciais.

CROCHEMORE et al. (2003) confirmaram estas observações, por meio da caracterização agro-morfológica de 34 acessos de maracujazeiro, provenientes de cinco estados brasileiros (SP, PR, MG, ES e SC). Em outro trabalho, MORAIS et al. (2008) analisaram a divergência genética em maracujá azedo (*Passiflora edulis*), utilizando ISSR, e observaram similaridade média de 62,0. LOSS et al. (2006), estudando populações *P. alata* no estado do Espírito Santo, observaram valores da diversidade genética de 0,09 a 0,15, considerando baixa a variabilidade dessa espécie no estado.

Embora não se tenha observado expressiva variabilidade genética nas populações estudadas, é possível observar uma pequena perda de variabilidade na população  $MA_1$  em relação à população  $MA_0$ , referentes ao primeiro ciclo de seleção recorrente.

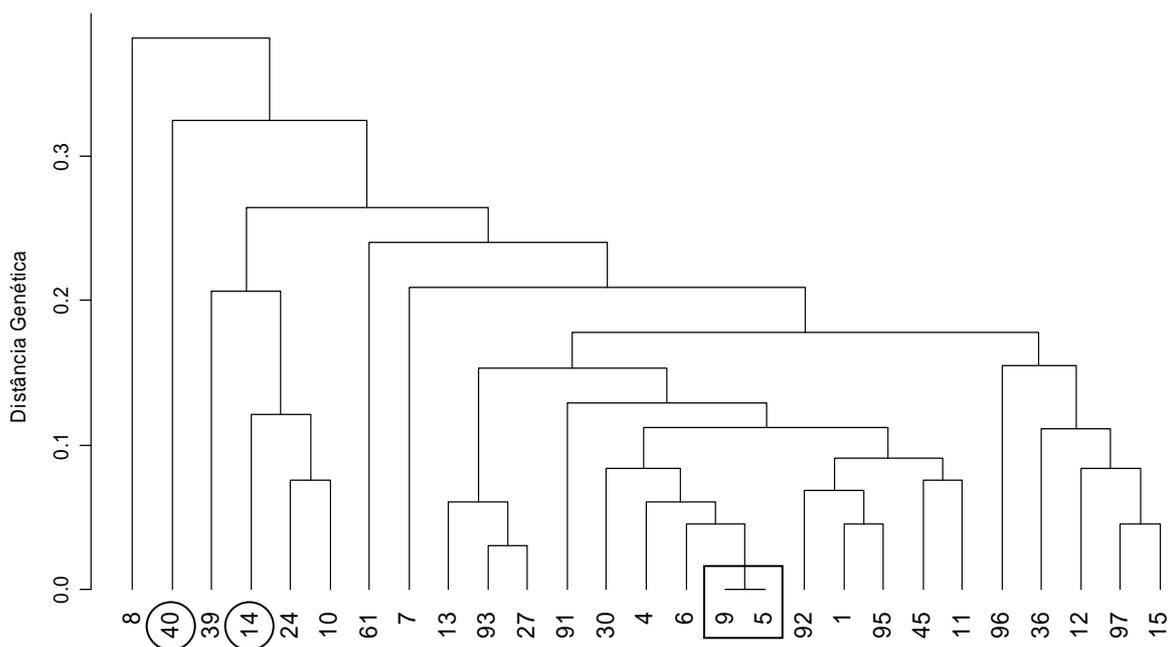
A variação na variabilidade pode ocorrer em programas de seleção recorrente devido ao método de seleção empregado, e pequenas flutuações na variabilidade podem vir a acontecer, como observado por FURLAN et al. (2007), trabalhando com uma população melhorada de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, em que o número médio de alelos por loco decresceu no decorrer de cada etapa de melhoramento, passando de 2,35, na população-base, para 2,25, nas matrizes selecionadas, e 1,875, na população melhorada F<sub>1</sub>, quando constataram que houve uma perda de quatro alelos durante o processo de seleção.

Os dendogramas obtidos pelo Índice Ponderado e pelo método de agrupamento UPGMA das populações de maracujazeiro amarelo que compreende os dois ciclos de seleção recorrente MA<sub>0</sub> e MA<sub>1</sub>, encontra-se na Figura 2 e 3, respectivamente.

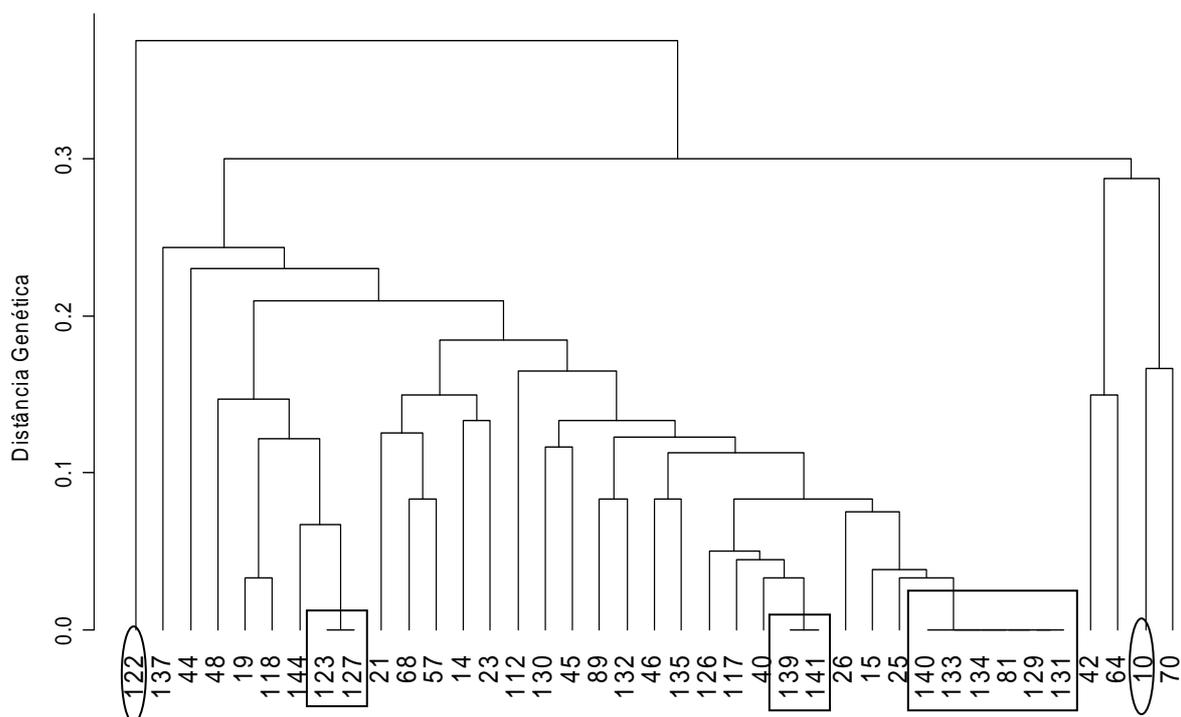
Os coeficientes de correlação cofenético (r) foram altos, 0,83, para a população MA<sub>0</sub>, e 0,86, para a população MA<sub>1</sub>, considerados adequados, já que  $r \geq 0,56$  é considerado ideal e reflete uma boa concordância com os valores de distância genética (VAZ PATTO et al., 2004).

A distância genética média da população MA<sub>0</sub> foi de 0,21 e os indivíduos que apresentaram maior distância entre eles foram os genótipos 14 e 40 (0,54), e os de menor distância foram os genótipos nove e cinco (0,0), (Figura 2). Na população MA<sub>1</sub>, a distância genética média foi de 0,19, e os genótipos que apresentaram maior distância entre eles foram os 122 e 10 (0,58); o número de indivíduos mais próximos geneticamente aumentou, nessa população, abrangendo os genótipos, 123, 127, 139, 141, 140, 133, 134, 81, 129 e 131, observando-se a distância 0,0 (Figura 3).

Resultado semelhante foi encontrado por BELLON (2008), trabalhando com RAPD em acessos *P. alata* obtidos de populações cultivadas e silvestres de maracujazeiro doce, cujas distâncias genéticas variaram entre 0,08 a 0,17, demonstrando a baixa variabilidade intraespecífica dessa espécie.



**Figura 2.** Dendrograma da população MA<sub>0</sub>, obtido pelo Índice ponderado com método e agrupamento UPGMA.



**Figura 3.** Dendrograma da população MA<sub>1</sub>, obtido pelo Índice ponderado com método de agrupamento UPGMA.

### 3.1.6. CONCLUSÕES

Os marcadores SSR permitiram analisar o grau de variabilidade genética das populações MA<sub>0</sub> e MA<sub>1</sub>.

O coeficiente de endogamia apresentou resultado médio maior na população MA<sub>1</sub>, e a distância genética média decresceu entre os ciclos, entretanto, não apresentou perdas significativas.

A população de trabalho MA<sub>1</sub> ainda possui variabilidade genética intrapopulacional suficiente para a continuidade do programa de seleção recorrente.

### 3.1.7. REFERÊNCIAS

- ANGEL, E. O.; FARJADO, D.; GRUM, M.; TOHME, J.; LOBO, M. (1998) Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. *Euphytica*, Dordrecht, v. 101, n. 3, p. 341-347.
- BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SANTOS, E. C.; BRAGA, M. F.; GUIMARÃES, C. T. (2007) Variabilidade genética de acessos silvestres de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v. 29, n. 1, p.1 24-127.
- BELLON, G. (2008) *Variabilidade genética de acessos de maracujazeiro-doce caracterizada por marcadores RAPD e avaliação da resistência à bacteriose e à virose do endurecimento dos frutos*. 101 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade de Brasília, Brasília.
- BOTREL, M. C. G.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D; PINTO, S. I. C.; MOURA, M. C. O.; ESTOPA, R. A. Caracterização genética de *Calophyllum brasiliense*

- Camb. em duas populações de mata ciliar. *Revista Árvore*, Viçosa, v.30, n.5, p.821-827, 2006
- CASSIANO, A. P. A. A.; LEMOS, E. G. M.; OLIVEIRA, J. C. (1998) Avaliação de espécies de *Passiflora* através de marcadores moleculares RAPD. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 21, n. 3, p. 214. Suplemento.
- CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; CARDOSO-SILVA, C. B.; OLIVEIRA, A. C.; SOUZA, M. M.; CORRÊA, R. X. (2008) Amplificação cruzada de marcadores microssatélites (SSR) entre espécies de Maracujazeiro (*Passifloraceae*; *Passiflora*). Anais. 54<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Genética. Salvador-Ba.
- COMSTOCK, R. E. & ROBINSON, H. F. (1948) The components of genetic variance in populations of biparental progenies and their use in estimating the average degree of dominance. *Biometrics*, Washington, v. 4, p. 254-266.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. (2001) Detection of single sequence repeats polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gel by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.19, p.299-306.
- CROCHEMORE, M. L.; MOLINARI, H. B.; STENZEL, N. M. C. (2003) Caracterização agromorfológica do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p.5-10.
- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-15.
- FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. (1996) *Introduction to quantitative genetics*. 4 ed. Harlow: Longman Scientific, 464 p.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BELLON, G.; BORGES, T. A.; ANJOS, J. R. N.; PEIXOTO, J. R.; BRAGA, M. F.; SANTOS, D. G. (2004) Diversidade genética de espécies silvestres de maracujazeiro com resistência múltipla a

doenças com base em marcadores RAPD. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 29, p. S325. Suplemento.

FURLAN, R. A.; MORI, E. S.; TAMBARUSSI, E. V.; MORAES, C. B.; JESUS, F. A.; ZIMBACK, L. (2007) Estrutura genética de populações de melhoramento de *Pinus caribaea* var. *Hondurensis* por meio de marcadores microssatélites. *Bragantia* [online]. 2007, vol.66, n.4, pp. 553-563.

GANGA, R. M. D.; RUGGIERO, C. R.; LEMOS, E. G. M.; GRILI, G. V. G.; GONÇALVES, M. M.; CHADAS, E. A.; WICKERT, E. (2004) Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares fAFLP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 494-498

GIUDICI NETO, J. D.; SEBEN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Diversidade genética de uma população "ex" situ de *Caesalpinia echinata* Lam. *Scientia Forestalis*, Piracicaba, n.69, p125-133, 2005.

GÓIS, I. B.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A. (2009) Variabilidade genética de *Spondias lutea* L. em uma população do baixo São Francisco sergipano, por meio de isoenzimas. *Sci. For.* Piracicaba, v. 37, n. 81, p. 055-060.

GONÇALVES, G. M. (2005) *Estimativas de parâmetros genéticos em características produtivas de maracujazeiro amarelo (Passiflora edulis f. flavicarpa), baseado no delineamento I.* 87 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

HALLAUER, A. R. & MIRANDA, J. B. (1985) Quantitative Genetics in Mayze Breeding. 286p

JUNQUEIRA, N. T. V.; SHARMA, R. D.; RITZINGER, C. H. S. P. (2003) Manejo da bacteriose e de nematóides em maracujazeiro ( compact disc). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., Campos dos Goytacazes *Palestras*. Campo dos Goyatacazes: Cluster Informática.

- LOSS, A. C. C.; LEITE, Y. L. R.; LOURO, I. D.; BATITUCCI, M. C. P. (2006) Diversidade genética de populações de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) no estado do Espírito Santo, Brasil. *Natureza on line* 4(2): 55-61.
- MANTOVANI, W. (1996.) Methods for Assessment of Terrestrial Phanerogams Biodiversity. In: BICUDO, C. E. M.; MENEZES, N. A. (Eds.) *Biodiversity in Brazil: a first approach*. São Paulo: CNPq, p.119-44.
- MORAIS, R. C.; MELO, F. M. R.; SILVA, M. M.; MUSSER, R. S.; RESENDE, L. V. (2008) Diversidade genética em maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) utilizando marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). *Anais. Congresso Brasileiro de Fruticultura*.
- OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. (2005) Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Molecular Ecology Notes*, v.5, n.2, p.331-333.
- OLIVEIRA, E. J. (2006) *Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.)* / ESALQ / USP. Tese de Doutorado - Piracicaba, 152 p. : il.
- PÁDUA, J. G.; OLIVEIRA, E. J.; ZUCCHI, G. M. I.; OLIVEIRA, C. X.; CAMARGO, L. E. A.; VIEIRA, M. L. C. (2005) Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: Passifloraceae). *Molecular Ecology Notes*, v.5, n.4, p.863-865.
- PINTO, R. M. C.; CARLINI-GARCIA, L. A.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA JR, C. L. (2003) Comparação entre diversidade genética molecular e capacidade específica de combinação na alocação de linhagens S3 de milho em grupos heteróticos. *Anais do 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas*. Porto Seguro, Bahia.

- ROHLF, F.J. (2000) *Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. New York: Exeter Software. 38 p. (Version 2.1).
- ROMANO, E & BRASILEIRO, A. C. M. (2003) Extração de DNA de plantas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v. 5, n. 29, p. 40- 43.
- SILVA, M. G. M. (2009) *Seleção recorrente intrapopulacional no maracujazeiro amarelo*. 157 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- TEIXEIRA, A. S.; CHAVES, L. S.; YUYAMA, K. (2004) Esterases no exame da estrutura populacional de Camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh-Myrtaceae). *Acta Amazonica*, Manaus, v.34, n.1, p.75-88.
- TOREZAN, J. M. D. et al. (2005) Genetic variability of pré and post-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.48, n.2, p.171-180.
- TOWNSEND, M, & HENNING, J. A. (2005) Potential heterotic groups in hop as determined by AFLP analysis. *Crop Sci.* v. 45: p.1901-1907.
- VAZ PATTO, M. C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. (2004). Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. *Euphytica*, v.137, p.63-72.
- 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. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 3, p. 489-493.

- VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; SOUZA, M. M.; MALDONADO, J. F. M. (2004) Parâmetros genéticos em populações de maracujazeiro-amarelo. *Revista Ceres*, Viçosa, v.51, p.545-555.
- VIEIRA, M. L. C.; OLIVEIRA, E. J.; MATTA, F. P.; PÁDUA, J. G.; MONTEIRO, M. (2005) Métodos biotecnológicos aplicados ao melhoramento genético de maracujá. In: FALEIRO, F. G, JUNQUEIRA, N. T. V, BRAGA, M. F. *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 411-453.
- VIEIRA, M. L. C.; OLIVEIRA, C. A.; MAYEDA, L. Y; DORNELAS, M. C.; FUNGARO, M. H. P. (1997) Estudo do cariótipo e da variabilidade genética detectada por RAPD em espécies de maracujazeiro (*Passiflora* L.). *Brazilian Journal of Genetics*, Ribeirão Preto, v. 20, n. 3, p. 88. Suplemento.

## 3.2. UTILIZAÇÃO DE DADOS AGRONÔMICOS E MOLECULARES NA SELEÇÃO DE PROGÊNIES DE MARACUJAZEIRO AZEDO NO 2º CICLO DE SELEÇÃO RECORRENTE

### 3.2.1. RESUMO

O objetivo desse trabalho foi analisar 39 progênies selecionadas, das 140 progênies referentes ao segundo ciclo de seleção recorrente do maracujazeiro azedo (MA<sub>1</sub>), visando a indicar os 25 genótipos mais divergentes para comporem o próximo ciclo de seleção recorrente, com base em características agronômicas e em marcadores moleculares SSR. Os dados agronômicos foram analisados pelo programa *Darvin* 5.0, utilizando-se a distância de Manhattan para indicar a variabilidade dos genótipos avaliados. Para os dados moleculares, a matriz de distância foi calculada pelo aplicativo computacional Genes, sendo utilizado o Índice Ponderado. A partir das matrizes dos dados agronômicos e moleculares, obteve-se a matriz conjunta. Posteriormente, foi realizado o agrupamento hierárquico UPGMA e sua correlação cofenética para as matrizes das distâncias de Manhattan, Índice Ponderado e dados conjuntos, utilizando o programa computacional R e, posteriormente, *Boxplot*, para verificar a dispersão dos genótipos selecionados em seis características de maior importância agronômica. Dos 25 genótipos selecionados utilizando os dados agronômicos e os moleculares, 60% destes são coincidentes. Mesmo com alguns genótipos em comum, a correlação entre esses dados não foi significativa pelo teste Z de

Mantel. Os 25 genótipos selecionados, pela análise conjunta dos dados agronômicos e moleculares, apenas 24% dos indivíduos são diferentes dos selecionados pelos dados moleculares, e 16% em relação aos dados agronômicos, e as correlações foram significativas. Os genótipos selecionados pelos dados agronômicos foram mais eficientes em apenas uma (peso do fruto) das seis características avaliadas, atingindo uma média de peso de frutos de 174g superior às outras análises. Seleção de genótipos, utilizando dados agronômicos em programas de melhoramento do maracujazeiro, vem sendo realizada e obtendo ganhos genéticos significativos, selecionando genótipos com potencial agronômico para dar seguimento a programas de melhoramento. Nas características produtividade, número de frutos e dias para o florescimento, as progênies selecionadas pelos marcadores moleculares apresentaram maiores médias de 21 t/ha, 196 frutos e 117 dias para o florescimento. Apresentaram genótipos com maior produtividade e um menor tempo para o florescimento. Os procedimentos de seleção utilizados indicam resultados positivos, sendo que as análises moleculares foram mais eficientes na seleção dos genótipos. Os resultados observados indicam os genótipos mais produtivos e divergentes para dar continuidade ao programa de seleção recorrente do maracujazeiro, além disso, demonstram o sucesso da seleção recorrente para essa cultura e sua viabilidade.

### 3.2.2. ABSTRACT

The aim of this study was to analyze 39 selected progenies of 140 progeny for the second recurrent selection cycle of passion fruit ( $MA_1$ ), to indicate the 25 different genotypes to form the next recurrent selection cycle based on traits and SSR molecular markers. The agronomic data were analyzed by Darvin 5.0, using the Manhattan distance to indicate the variability of genotypes. For molecular data, the distance matrix was calculated by the package Genes, and used the Weighted Index. From the headquarters of agronomic and molecular data, getting the joint matrix. Later it was performed the hierarchical clustering and its correlation UPGMA cophenetic matrices for the distances from Manhattan, the Weighted

Index and data sets, using the software R, and then Boxplot, to verify the dispersion of selected genotypes in six major characteristics of agronomy. From the 25 selected genotypes using data agronomic and molecular, 60% of these are coincident. Even with some genotypes in common, the correlation between these data was not significant by the Z test from Mantel. The 25 genotypes selected for the joint analysis of agronomic and molecular data, only 24% of individuals are different from those selected by molecular data, and 16% for agronomic data, and the correlations were significant. The selected genotypes for agronomic data were more efficient in only one (fruit weight) of the six evaluated characteristics, reaching an average weight of 174g of fruit than the other analysis. Selection of genotypes, using agronomic data in breeding programs of passion fruit, has been carried out and getting significant genetic gains by selecting genotypes with agronomic potential for the continuation of breeding programs. In the characteristics yield, fruit number and days to flowering progenies selected by molecular markers had higher average of 21 t/ha, 196 fruit and 117 days to flowering. It had been presented genotypes with higher productivity and shorter time to flowering. The selection procedures used show positive results, and the molecular analyses were more efficient in the selection of genotypes. The results indicate the higher grain yield and different to continue the recurrent selection program of passion fruit, moreover, show the success of recurrent selection for this crop and its viability.

### 3.2.3. INTRODUÇÃO

O Brasil é terceiro maior produtor mundial de frutas, perdendo somente para China e Índia. Dentro desse cenário, estimativas do IBGE (2008) apontam o Brasil como o maior produtor e consumidor mundial de maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims), sendo produzido no país em torno de 650 mil toneladas. Esta fruteira é cultivada em praticamente todos os estados brasileiros, destacando-se, como principais produtores, os estados da Bahia, Ceará, Espírito Santo, Sergipe, Pará e Minas Gerais, que totalizam mais de 80% da produção do Brasil.

Apesar do destaque da produção brasileira, a produtividade nacional é muito baixa ainda, situando-se entre 10 a 15 t/ha devido, principalmente, à baixa utilização da tecnologia de produção recomendada para a cultura e à pequena disponibilidade de sementes melhoradas geneticamente (MELETTI & MAIA, 1999).

STENZEL & SERA (1999) relataram que, do ponto de vista do sistema de produção, a falta de variedades melhoradas constitui um entrave à produção de frutos homogêneos e de qualidade. Nesse sentido, o melhoramento do maracujazeiro (*Passiflora edulis Sims*) constitui-se num campo de pesquisa promissor, devido à sua ampla variabilidade genética, ao ciclo de produção relativamente curto e ao interesse crescente pela cultura (OLIVEIRA, 1980). Sendo que a escolha dos genitores e o planejamento cuidadoso dos cruzamentos aumentam as chances do desenvolvimento de variedades superiores, pois maximiza o uso dos genes desejáveis (BORÉM & MIRANDA, 2005).

Dentre os vários métodos de melhoramento genético, destaca-se a seleção recorrente, uma vez que é um método que aumenta gradativamente a frequência de alelos favoráveis, por meio de repetidos ciclos de seleção, sem perder a variabilidade genética da população (PINTO, 1995). A cada ciclo de seleção, o melhorista seleciona os melhores genótipos e os recombina para gerar a população que constituirá o próximo ciclo.

A seleção dos genótipos superiores se dá, regra geral, mediante a avaliação agrônômica, porém, com o advento dos marcadores moleculares, a tendência dos programas de melhoramento genético é integrar as informações obtidas com base nas técnicas clássicas com as técnicas mais modernas da biotecnologia, como os marcadores. Em se tratando de uma espécie semiperene, os marcadores moleculares têm uma importância fundamental, pois auxiliam na identificação dos genótipos mais divergentes que deverão ser recombinados. Deste modo, a tecnologia dos marcadores moleculares pode contribuir significativamente não só para o conhecimento básico da cultura e do caráter estudado, como também para monitorar as populações a serem melhoradas (FERREIRA & GRATAPAGGLIA, 1998).

No caso da seleção recorrente, propõe-se o uso dos marcadores de DNA, nas etapas de avaliação e seleção das progênies. A identificação dos genitores a serem recombinados pode ser feita em duas etapas: a primeira constituída pelo

ensaio de competição, e a segunda constituída pelo uso dos marcadores de DNA. Assim, os progenitores a serem recombinados serão superiores, portadores de maior frequência de alelos favoráveis e divergentes o suficiente para a manutenção da variabilidade genética e maior exploração da heterose durante a condução de ciclos de seleção recorrente.

Segundo VIEIRA et al. (2005), a dissimilaridade genética estimada, por meio de marcadores moleculares, quando acompanhadas de informações fenotípicas, é importante para as seleções de genótipos. Tal expectativa decorre do fato de a heterose depender da existência de dominância no controle do caráter e da dissimilaridade entre os genótipos (FALCONER, 1987).

Em estudos realizados com AFLP e características fenotípicas em milho no programa de Seleção Recorrente Recíproca da UENF, GABRIEL (2006 & 2009) identificou os genótipos mais distantes geneticamente com grande potencial agrônomico. Portanto, este tipo de estudo pode ser aplicado à cultura do maracujazeiro azedo.

Nesse sentido objetivou-se, no presente trabalho, selecionar indivíduos mais divergentes, dentre as 39 progênies selecionadas, das 140 progênies referentes ao segundo ciclo de seleção recorrente do maracujazeiro azedo, utilizando dados agrônomicos, moleculares e análise conjunta desses dados.

### **3.2.4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.2.4.1. Material genético**

Foram avaliadas 39 progênies selecionadas, das 140 progênies referentes ao segundo ciclo de seleção recorrente, denominada Maracujá Amarelo Um (MA<sub>1</sub>), do trabalho conduzido por SILVA (2009).

#### **3.2.4.2 Características agrônômicas**

Foram avaliadas 11 características agrônômicas (Tabela 1), a saber: número de dias para o florescimento (DF); peso de fruto (PF); comprimento de

fruto (CF); largura de fruto (LF); número total de frutos (NF); produção total (PT); peso médio de fruto (PMF); espessura de casca (EC); teor de sólidos solúveis totais (SS); cor da polpa (CP) e peso da polpa (PP), conforme dados obtidos por SILVA (2009).

**Tabela 1.** Médias das 39 progênes selecionadas e testemunhas, obtidas pelo índice proposto por MULAMBA & MOCK (1978), avaliando 11 características, para compor o segundo ciclo de Seleção Recorrente em Campos dos Goytacazes/RJ

Progênes	Médias Características <sup>(1)</sup>										
	DF	PF	CF	LF	EC	SS	CP	PP	NF	PT	PMF
139	103,14	170,41	81,04	75,78	6,92	11,64	4,00	39,44	266,00	29,53	155,41
89	112,92	176,23	84,16	73,62	6,41	12,13	4,50	41,06	203,00	22,63	156,02
14	127,12	189,87	82,53	76,76	6,22	11,39	4,25	49,11	195,50	21,43	153,67
42	111,82	188,02	84,15	75,07	7,19	11,31	4,00	41,79	186,00	21,13	159,06
123	119,10	181,44	88,08	78,55	6,31	10,06	4,25	43,06	185,50	20,35	153,64
140	135,21	172,61	79,53	72,72	7,78	12,49	4,00	39,25	193,00	22,04	159,59
64	125,77	162,28	83,84	75,80	6,15	11,37	4,25	43,29	258,50	25,46	137,85
112	100,94	166,33	81,03	75,33	8,06	11,94	4,00	37,15	230,50	23,80	144,58
127	102,95	172,03	81,91	78,46	6,01	13,00	4,25	44,73	208,50	21,03	141,60
132	118,04	173,09	83,48	74,39	7,27	14,24	4,25	38,89	179,00	19,40	157,67
68	107,05	184,98	79,49	76,30	7,15	11,63	4,25	40,95	186,50	19,74	151,12
144	108,23	168,39	78,24	76,02	6,15	12,68	4,50	40,20	257,00	25,24	137,77
40	125,47	178,02	89,91	76,27	6,98	11,38	4,00	33,40	201,50	20,78	144,10
44	112,25	164,49	80,28	77,80	5,96	12,20	3,00	36,22	235,50	23,40	140,03
141	115,86	157,20	78,44	73,74	6,78	11,78	4,00	35,56	200,00	21,62	151,55
117	123,88	163,02	87,54	74,89	5,89	11,50	4,25	44,28	179,50	19,38	151,04

Tabela 1. Cont.

---

130	114,23	155,77	91,23	76,50	4,85	11,95	4,75	34,49	191,50	20,39	150,37
102	112,85	190,23	89,59	79,26	6,23	12,84	4,25	32,92	159,50	18,72	167,34
129	109,18	162,05	83,70	76,06	5,66	11,20	4,00	44,45	212,00	20,39	139,61
48	127,27	174,59	84,04	73,90	6,35	11,88	4,50	38,47	175,00	19,10	153,89
46	122,47	218,20	86,75	80,66	6,82	12,25	3,75	38,77	155,50	18,34	165,85
25	116,42	147,93	81,69	72,15	5,66	11,34	4,75	35,01	195,00	21,23	152,39
126	114,09	192,68	89,14	78,60	7,76	12,02	4,25	35,41	158,00	18,27	161,68
131	111,74	177,31	80,90	75,29	6,71	12,76	4,00	41,87	168,00	18,26	153,62
57	125,67	167,10	84,97	75,74	6,05	12,64	4,25	38,82	196,50	19,42	137,83
26	119,13	162,28	84,23	76,03	5,36	13,01	4,25	37,91	183,00	18,83	143,69
70	111,26	213,83	82,49	78,51	7,32	12,73	3,50	42,45	142,00	16,94	167,04
134	119,09	144,16	77,43	69,41	5,79	12,03	3,50	40,34	246,00	23,54	136,59
21	105,89	164,28	77,53	73,01	7,19	12,20	4,50	35,24	165,50	18,71	159,47
10	111,09	166,71	76,87	75,45	6,71	12,07	4,25	32,29	242,50	22,56	129,35
15	122,32	150,06	75,00	73,45	5,34	12,30	3,75	47,20	209,50	20,52	137,16
122	101,90	156,09	77,56	76,52	5,60	12,20	4,50	44,13	227,50	20,92	128,74
135	104,79	178,43	83,02	74,41	7,19	12,99	4,00	42,92	147,50	16,79	160,23
19	121,17	178,39	83,24	75,24	7,67	11,50	4,25	37,07	154,00	17,34	157,90

---

Tabela 1. Cont.

81	110,36	161,30	86,22	77,12	6,41	9,68	3,75	35,41	169,50	18,06	149,36
45	116,41	161,14	83,24	71,89	5,83	11,34	3,75	40,03	184,00	18,81	143,14
118	121,44	150,09	85,21	70,99	6,04	11,85	4,00	39,02	197,50	19,53	138,69
23	124,96	160,56	85,99	73,82	5,23	13,31	4,25	36,80	176,50	18,52	145,47
133	125,38	186,86	83,44	74,25	7,31	11,91	3,75	44,08	161,00	17,13	150,32
137	114,64	158,05	76,63	77,61	6,49	11,86	4,50	37,12	172,50	18,28	150,34
T 1 <sup>(2)</sup>	127,96	139,37	77,65	71,82	4,81	11,92	4,25	42,11	143,00	12,56	127,49
T 2	118,59	167,75	88,74	73,64	5,88	11,76	4,50	36,33	89,00	10,24	159,59
T 3	107,31	117,80	74,74	65,31	4,80	12,79	4,25	48,67	215,50	16,23	105,62
T 4	98,44	153,22	85,34	71,17	5,28	11,88	5,00	46,91	120,00	11,26	131,11

<sup>(1)</sup> DF = número de dias para o florescimento; PF = peso de fruto; CF = comprimento de fruto; LF = largura de fruto; EC = espessura de casca; SST = teor de sólidos solúveis totais; CP = cor da polpa; PP = peso da polpa; NF = número total de frutos; PT = produção total em t/ha; PMF = peso médio de fruto. <sup>(2)</sup> Testemunhas utilizadas para comparação.

### 3.2.4.3. Microssatélites

O DNA genômico total foi extraído a partir de folhas dos 39 genótipos de maracujazeiro, compreendendo o segundo ciclo de seleção recorrente (MA<sub>1</sub>), empregando-se o procedimento adaptado de DOYLE & DOYLE (1990).

A avaliação da quantidade e da qualidade do DNA foi realizada por meio de comparações visuais da intensidade de fluorescência das bandas em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, com aquelas de concentrações conhecidas de DNA do fago λ (Gibco), sob luz ultravioleta (DyNA Quant 2000 Fluorometer, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK), e diluídas em água ultrapura e padronizadas em 5 ng μL<sup>-1</sup>.

Foram utilizados 12 iniciadores microssatélites pertencentes à série PE, desenvolvidos por OLIVEIRA (2006) (Tabela 4).

As reações de amplificação foram realizadas, conforme descrito por OLIVEIRA (2006), com pequenas modificações ajustadas para cada *mix*; foram preparados quatro diferentes *mix* de reação para a otimização das reações de PCR, conforme o iniciador (Tabela 2). Os reagentes que variaram entre os *mix* foram a concentração do tampão, o MgCl<sub>2</sub> e o dNTP.

O volume das reações de amplificação foi de 20 μL, contendo 20 ng de DNA genômico; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8); 0.1% Triton-X; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 μM de cada dNTPs; 0,2 μM de cada iniciador e 0,5 unidades de Taq polimerase (Life Technologies do Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

As amplificações foram conduzidas em Termociclador Perkin Elmer, modelo 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Foram utilizadas duas diferentes condições de amplificação em esquema de *touchdown*, com base nos programas TD60 e TD56 (Tabela 3).

Para um par de *primer* o PE75, a utilização de uma temperatura de anelamento específica produziu melhores resultados, sendo utilizada a temperatura de 60 °C. Assim, o programa básico foi constituído por uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 min; e 30 ciclos de 94 °C, por 40 s (60° C temperatura de anelamento); 72 °C, por 50 s; e uma extensão final de 5 min, a 72 °C. Os fragmentos foram separados em géis de poliacrilamida desnaturante (6% poliacrilamida, 8 M de ureia) sob condições padrões, e os produtos da

amplificação foram corados com nitrato de prata para visualização dos alelos, utilizando-se o método de CRESTE et al. (2001).

**Tabela 2.** Concentração dos reagentes e relação dos *mix* usados para a otimização das reações de PCR, de acordo com os *primers* de microssatélites de maracujá-azedo.

Reagentes	Mix 2	Mix 4	Mix 5	Mix 7
Tampão*	1X	2X	1X	1X
Primer F + R**	0,3 µM	0,3 µM	0,3 µM	0,3 µM
DNA	20 ng	20 ng	20 ng	20 ng
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	1,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
dNTP	200 µM	200 µM	200 µM	350 µM
Taq Polimerase	0,5 U	0,5 U	0,5 U	0,5 U
Água Mili-Q	9,7 µL	7,7 µL	8,9 µL	7,7 µL

\* O tampão dos *mix* para a concentração 1X continha 10mM de Tris-HCl pH 8,8; 50 mM de KCl e 0,8% de Nonidet P40;

\*\*F e R - *primers forward* e *reverse*, respectivamente.

**Tabela 3** - Condições de amplificação usadas para a otimização das reações de PCR, de acordo com os *primers* de microssatélites de maracujá azedo.

Programa TD60			Programa TD56		
Nº de ciclos	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos	Temperatura	Tempo
1	94 °C	5 min	1	94 °C	5 min
8	94 °C	40 s	12	94 °C	40 s
	60°C - 0,5 °C por ciclo	40 s		56°C - 0,5 °C por ciclo	40 s
	72 °C	50 s		72 °C	50 s
24	94 °C	40 s	20	94 °C	40 s
	56 °C	40 s		56 °C	40 s
	72 °C	50 s		72 °C	50 s
1	72 °C	5 min	1	72 °C	5 min
1	8 °C	∞	1	8 °C	∞

**Tabela 4.** Locos microssatélites (SSR), sequência repetida (F/R – *forward/reverse*), motivo, tamanho esperado do alelo (pb), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e temperatura de anelamento (TA) de todos os *primers* utilizados no trabalho.

<b>Loco</b>	<b>Primer forward</b>	<b>Primer reverse</b>	<b>Motivo</b>	<b>Alelo (pb)</b>	<b>PIC</b>	<b>TA</b>
PE74	ccctcttatcaatagcggtgg	gcacgagcacgagtatttatt	(ATCACA)5	215	0.3346	TD56
PE38	gatcggctcctcggttagac	agtcacacagcatgagaaatc	(TG)8	215	0.2392	TD56
PE58	gcaattcaccatcttctgct	ccacggcatggatgttc	(AC)11	243	0.0963	TD60
PE11	gcataagttgctcgttctgg	cctcgaacctctatcatcca	(GT)11	178	0.3006	TD60
PE04	atgcttttgaaatccgttt	tgctcatgcaaagtcactgg	(TG)9	235	0.0487	TD60
PE24	tcaaactgaactcgtaaagg	gtgctgggagactgatgtt	(CA)15	294	0.1985	TD60
PE66	ccatagtccaacaagcatc	gctgtggaccctaactcagtc	(AC)9	165	0.4975	TD60
PE90	tcaggaagattgcatgtagt	ctgggttttgttatgttc	(AGC)5	245	0.0487	TD60
PE18	ccgtgaaccaaccatttctc	ttgcagcacaacaagtcaa	(TG)9	220	0.0926	TD60
PE20	aggatcaccatagaaaacat	gtaggttggcattgctctt	(AAAC)4	242	0.0487	TD60
PE42	gtcacttcattcttcttcc	ttagcccactcaaacacaa	(GT)8	216	0.0250	TD60
PE75	cacaatcgggtgggaaagata	gtagtttgggcagtttgc	(TG)17	178	0.1671	60

### 3.2.4.4. Análise estatística dos dados

Os dados agronômicos foram analisados pelo programa Darwin 5.0 (PERRIER & BONNOT, 2003), utilizando a distância de Manhattan para indicar a variabilidade dos genótipos avaliados.

A distância de Manhattan é dada por:

$$d_{ij} = \frac{1}{k} \sum_{k=1}^k \frac{|x_{ik} - x_{jk}|}{\max_k - \min_k}$$

$x_{ik}$ ,  $x_{jk}$ : valores da variável  $k$  para os genótipos  $i$  e  $j$ ;

$\max_k - \min_k$ : amplitude da variável  $k$ ;

$k$ : número de variáveis

Para os dados moleculares, a matriz de distância foi calculada pelo aplicativo computacional GENES (CRUZ, 2006), sendo utilizado o Índice Ponderado que é dado por:

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

$L$ : número total de locos estudados;

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

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

$a_j$ : número total de alelos do loco  $j$ ;

$A$ : número total de alelos estudados

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

A partir das somas das matrizes dos dados agronômicos e moleculares, obteve-se a matriz conjunta, sendo:

$$d_{ii} = \frac{\text{Matriz Índice Ponderado} + \text{Matriz Manhattan}}{2}$$

Posteriormente, foi realizado o agrupamento hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average*) e sua correlação cofenética, para as matrizes das distâncias de Manhattan, índice ponderado e dados conjuntos, utilizou-se o programa computacional R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Também foi realizada a análise dos 25 genótipos mais divergentes a partir das matrizes de Manhattan, índice ponderado e análise conjunta e, posteriormente, Boxplot para verificar a dispersão dos genótipos selecionados em seis características de maior importância agrônômica, sendo elas: produção total (Kg/ha), número de frutos (Unidade), teor de sólidos solúveis totais (Brix<sup>o</sup>), dias para o florescimento, porcentagem de polpa (%) e peso do fruto (g).

### 3.2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando os dados agronômicos, moleculares e a análise dos dados conjuntos, foram selecionados os 25 genótipos mais divergentes entre os 39 selecionados do segundo ciclo de seleção recorrente do maracujazeiro azedo da UENF (Tabela 3), os quais serão utilizados para constituírem o próximo ciclo de seleção.

Dos 25 genótipos selecionados utilizando os dados agronômicos e os moleculares, 60% destes são coincidentes (14, 42, 112, 64, 44, 68, 46, 25, 57, 19, 23, 144, 135, 48 e 122), sendo os demais diferentes (Tabela 5). Mesmo com alguns genótipos em comum, a correlação entre esses dados não foi significativa, a 1% de probabilidade pelo teste de Mantel (10.000 permutações), Segundo DIAS (1994), a quantificação da diversidade entre progênies com o emprego da caracterização morfológica só tem sentido se ela refletir a diversidade genética. Entretanto, os marcadores moleculares normalmente usados encontram-se distribuídos aleatoriamente no genoma e, conseqüentemente, apenas uma

minoria pode estar associada aos genes. Logo, é esperado que esses marcadores não estejam associados à maioria dos caracteres fenotípicos

**Tabela 5.** Genótipos selecionados do segundo ciclo de seleção recorrente do programa de melhoramento do maracujazeiro azedo da UENF, utilizando dados agronômicos, moleculares e análise conjunta dos dados.

Agronômicos	Moleculares	Dados Conjuntos
89	139	89
14	14	14
42	42	42
123	112	123
112	64	112
40	44	40
64	68	64
44	46	44
68	130	68
46	25	46
129	57	129
25	10	10
57	70	70
19	26	26
131	19	131
135	21	25
23	23	23
133	132	133
140	127	140
144	144	144
117	48	48
126	118	118
48	122	122
141	135	135
122	137	137

Atualmente, muitos trabalhos envolvendo espécies perenes buscam explicar o grau de concordância entre essas duas análises (agronômica e molecular), seja por correlação ou pelo teste Z de Mantel, visto ser uma forma de reduzir tempo na identificação de indivíduos desejáveis, para programas de melhoramento genético, e na otimização da conservação de germoplasma em bancos ou coleções (KOEHLER-SANTOS et al., 2003; SOUSA, 2003).

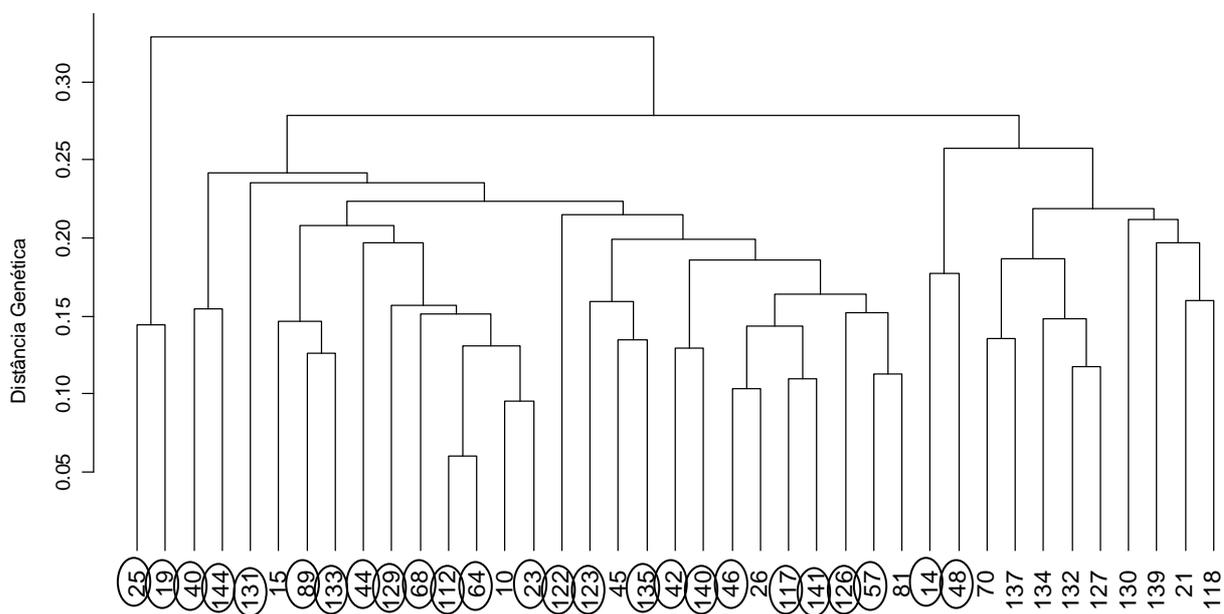
Segundo N'GORAN et al. (1994), a possibilidade de concordância entre a dissimilaridade genética e fenotípica varia com o tamanho da amostra, sendo,

geralmente, reduzida quando a amostra apresenta tamanho pequeno. Porém, a concordância entre elas parece depender também da espécie envolvida e da metodologia empregada. Para diferentes espécies, esta concordância tem-se mostrado variável com a aplicação de metodologias similares. Por exemplo, BARROS (1991) não encontrou concordância entre os dados morfométricos e isoenzimáticos, em acessos de cajueiro. Porém, DAHER (1993) e VEASEY (1998) obtiveram concordâncias, quando compararam os agrupamentos formados por padrões morfológicos e isoenzimáticos, sendo o primeiro em acessos de capim-elefante, e o segundo na separação de espécies anuais e perenes do gênero *Sesbania*.

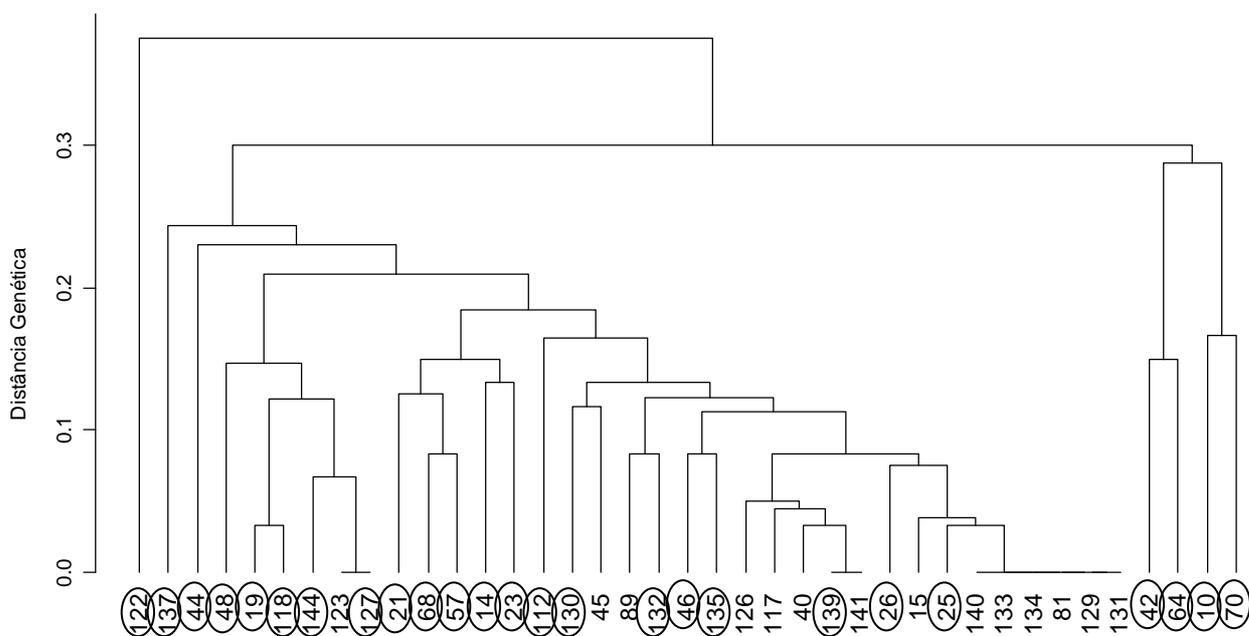
Nos 25 genótipos selecionados por meio da análise conjunta dos dados agronômicos e moleculares, apenas 24% dos indivíduos são discordantes dos selecionados pelos dados moleculares e 16% o são em relação aos dados agronômicos, (Tabela 5). As correlações foram significativas a 1% de probabilidade pelo teste de Mantel (10.000 permutações), quando comparadas aos dados moleculares (0,82) e aos dados agronômicos (0,56), apresentando uma nova alternativa de seleção que pode ser eficiente na seleção de genótipos.

Nas Figuras 1, 2 e 3, são apresentadas as distâncias genéticas dos 39 genótipos, nas quais se pode-se observar que os 25 genótipos selecionados em cada uma das análises que utilizaram os dados agronômicos, moleculares e dados conjuntos, estão distantes em cada dendograma, o que é importante para o processo de seleção, isto porque, além de manter a variabilidade da população, os genótipos selecionados apresentam média superior em relação às das características agronômicas.

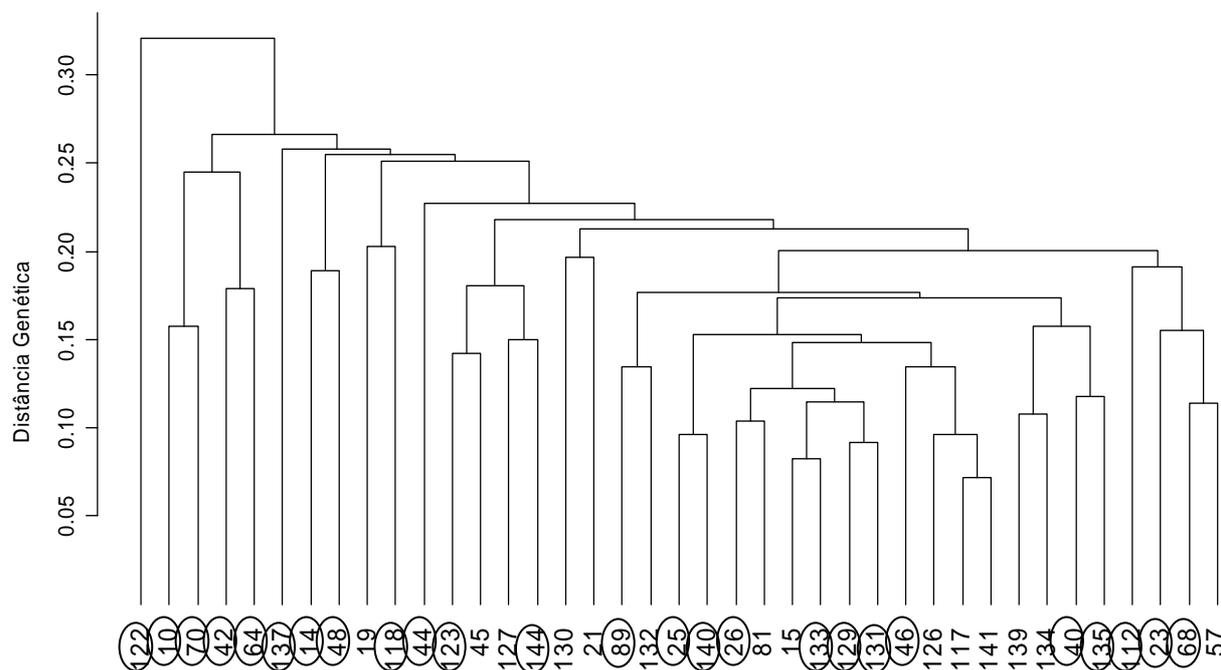
A caracterização e exploração da variabilidade genética de espécies de *Passifloras*, e também, dentro da espécie do maracujazeiro azedo, *P. edulis*, podem revelar recursos genéticos de grande valor, sejam novas variedades para os sistemas de produção ou a utilização em programas de melhoramento genético. Segundo SOUZA & MELETTI (1997), é possível e recomendável utilizar a variabilidade genética natural da espécie comercial do maracujazeiro azedo em programas de melhoramento genético, com significativos ganhos genéticos.



**Figura 1** – Dendrograma dos 39 genótipos obtido por meio dos dados agrônômicos e em detalhe os 25 selecionados.



**Figura 2.** Dendrograma dos 39 genótipos obtido pelos dados dos marcadores moleculares e em detalhe os 25 selecionados.



**FIGURA 3.** Dendrograma dos 39 genótipos obtido pela matriz conjunta dos dados e em detalhe os 25 selecionados.

O coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ) dos dados agronômicos, moleculares e análise conjunta foi de 0,67; 0,86 e 0,77, respectivamente, sendo um coeficiente adequado já que  $r \geq 0,56$  é considerado ideal e reflete uma boa concordância com os valores das matrizes de distâncias genéticas (VAZ PATTO et al., 2004).

Na Figura 4, podem ser observados os Boxplots relativos à variação de seis características agronômicas avaliadas em genótipos de maracujazeiro azedo, utilizando-se os dados agronômicos, moleculares e a análise conjunta desses dados.

Os genótipos selecionados pelos dados agronômicos foram mais eficientes em apenas uma (peso do fruto) das seis características avaliadas, atingindo uma média de peso de frutos de 174 g, superior às outras análises.

Seleção de genótipos, utilizando dados agronômicos em programas de melhoramento do maracujazeiro, vem sendo realizada, com obtenção de ganhos genéticos significativos, como nos trabalhos realizados por GONÇALVES et al., (2007) e SILVA et al., (2009). Estes usaram índices de seleção em características

agronômicas e selecionaram genótipos com potencial agrônômico para dar seguimento ao programa de seleção recorrente.

Nas características produtividade, o número de frutos e dos dias para o florescimento, e as progênies selecionadas pelos marcadores moleculares foram mais eficientes, apresentando médias de 21 t/ha, 196 frutos e 117 dias para o florescimento, respectivamente (Figura 4). Além de apresentar genótipos com maior produtividade e um menor tempo para o florescimento, pode-se observar que estes genótipos são mais divergentes para essas características, embora os dados não apresentem diferenças significativas.

Já na análise conjunta dos dados, é possível observar um equilíbrio, já que, na maioria das características avaliadas, a média das progênies selecionadas permanece próxima das médias das análises com os dados agrônômicos e moleculares. Tal ocorrência já era esperada, porque a análise conjunta apresenta vários genótipos similares aos selecionados pelos dados agrônômicos e moleculares (Figura 4).

Houve uma pequena semelhança entre os procedimentos de seleção, entretanto, os genótipos selecionados pelos marcadores moleculares apresentaram-se com média superior às das demais análises em características agrônômicas importantes para o maracujazeiro, indicando um bom potencial genético para a sequência do programa de melhoramento (Figura 4).

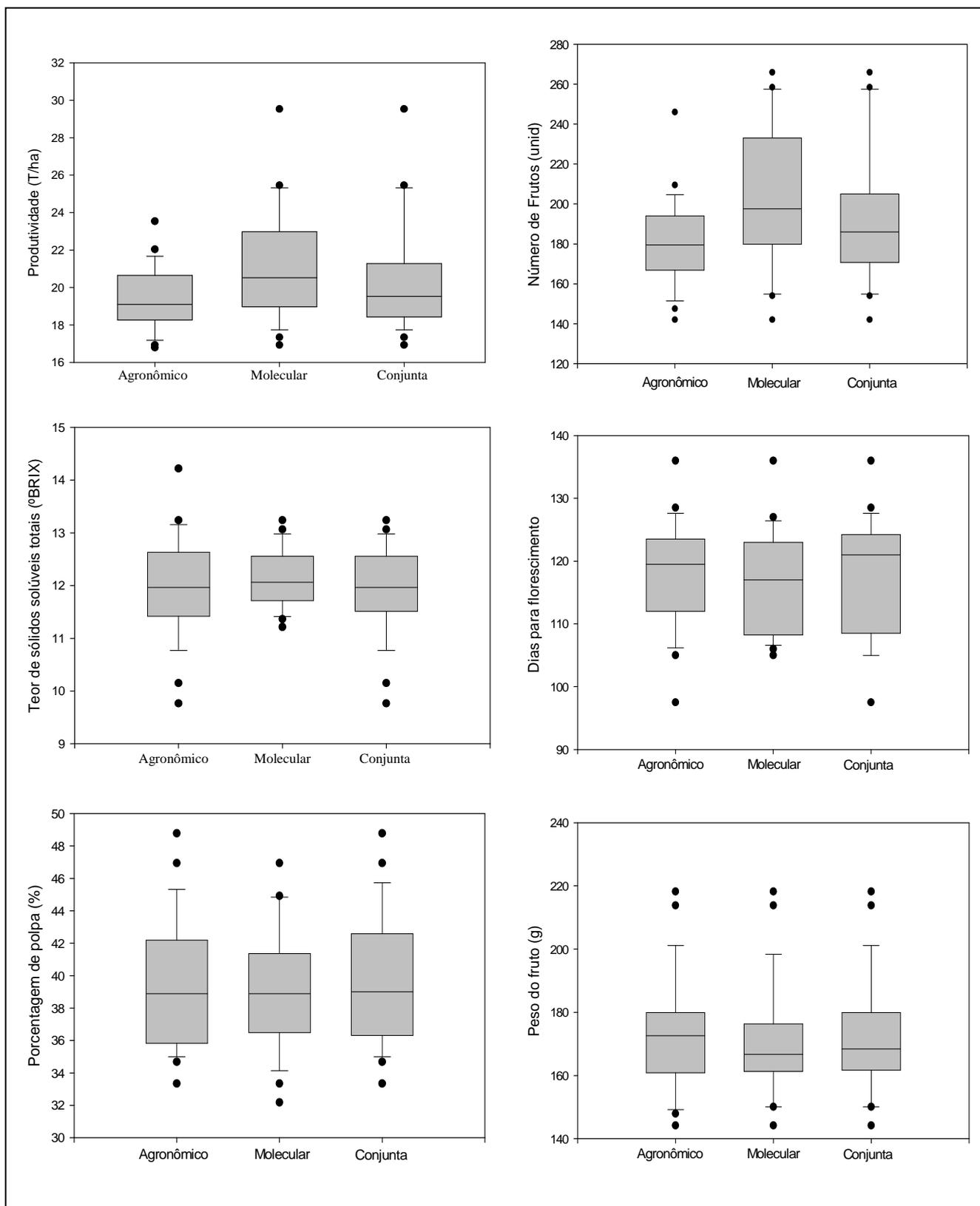
Ressalta-se que a utilização dos dados agrônômicos, para analisar a diversidade genética, certamente, pode maximizar essa divergência, tendo em vista que são analisados os dados extremos, o que contribui para ficar na média dos genótipos analisados, descartando-se os indivíduos centrais. Os marcadores moleculares propiciam valores mais aleatórios dentre os previamente selecionados, visto que tais sequências genéticas encontram-se distribuídas por todo o genoma analisado.

Os resultados observados, neste estudo, indicam os genótipos mais produtivos e divergentes para a continuidade ao programa de seleção recorrente do maracujazeiro, além disso, demonstram o sucesso da seleção recorrente para essa cultura e sua viabilidade.

Os procedimentos de seleção são de fundamental importância dentro de um programa de melhoramento. Assim, a escolha de métodos capazes para a identificação de genótipos mais divergentes e com potencial de produção, dentro

do processo de seleção, torna-se indispensável para a obtenção de ganhos genéticos sem perdas na variabilidade.

VIEIRA (2005) relata que a eficiência de um programa de melhoramento de maracujazeiro será tanto maior quanto mais adequados forem o método adotado e as populações escolhidas para praticar a seleção, sendo que a adoção de técnicas moleculares poderá acelerar este processo.



**Figura 4.** Boxplots relativos à variação de seis características agrônômicas avaliadas em 25 genótipos de maracujazeiro azedo, utilizando dados agrônômicos, moleculares e análise conjunta desses dados.

### 3.2.6. CONCLUSÕES

Os procedimentos de seleção utilizados indicam resultados positivos, sendo que as análises moleculares foram mais eficientes na seleção dos genótipos.

Os resultados observados indicam os genótipos mais produtivos e divergentes para a continuidade ao programa de seleção recorrente do maracujazeiro, além disso, demonstram o sucesso da seleção recorrente para essa cultura e sua viabilidade.

### 3.2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS, L. de M. (1991) *Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (Anacardium occidentale L.), tipos comum e anão precoce, por meio de técnicas multivariadas*. 256 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- BORÉM, A & MIRANDA, G. V. (2005) *Melhoramento de plantas*. 4. ed. Viçosa: Editora UFV, p. 525
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A. & FIGUEIRA, A. (2001) Detection of single sequence repeats polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gel by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.19, p.299-306.
- CRUZ, C. D. (2006) Programa GENES – *Aplicativo computacional em genética e estatística*. Viçosa: UFV
- DAHER, R. F. (1993) *Diversidade morfológica e isoenzimática em capim elefante (Pennisetum purpureum Schum.)*. 110 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

- DIAS, L. A. dos S. (1994) *Divergência genética e fenética multivariada na predição de híbridos e preservação de germoplasma de cacau (Theobroma cacao L.)*. . 94 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba
- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-15.
- FALCONER, D. S. (1987) Introdução à genética quantitativa. Tradução: Silva, M.A, Silva,J.C. Viçosa, MG: Impr. Univ., 279p.
- GABRIEL, A. P. C. (2006) *Seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos em milho (Zea mays L.) assistida por marcadores moleculares*. 112 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- GABRIEL, A. P. C. (2009). *Obtenção do 11º ciclo de seleção recorrente recíproca de famílias de irmãos completos em milho (Zea mays L.) assistida por macadores moleculares e estudo de progresso genético*. Tese (Doutorado em genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- GONÇALVES, G. M. et al. Seleção e herdabilidade na predição de ganhos genéticos em maracujá-amarelo. *Pesq. agropec. bras.*, Fev 2007, vol.42, no.2, p.193-198.
- IBGE *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*: (2008) Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em 20 dez de 2008.
- KOEHLER-SANTOS, P.; DORNELLES, A. L. C.; FREITAS, L. B. (2003) Characterization of mandarin *citrus* germplasm from Southern Brazil by morphological and molecular analyses. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.38, n.7, p. 747-806.

- MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; AZEVEDO FILHO, J. A. (1999) Caracterização de germoplasma de *Passiflora* II - *P. serrato-digitata* e *P. mucronata*. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, 2., Londrina, 1999. *Anais*, Londrina: SBF/IAPAR. p. 85-86
- MULAMBA, N. N.; MOCK, J. J. (1978) Improvement of yield potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. *Egyptian Journal Genetics and Cytology*, Alexandria, v. 7, p. 40-51.
- N'GORAN, J. A. K.; LAURENT, V.; RISTERUCCI, A. M.; LANAUD C. (1994) Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. *Heredity*, Oxford, v.73, n. 6, p. 589-597, Dec.
- OLIVEIRA, E. J. (2006) *Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.)* / Eder Jorge de Oliveira. Tese de Doutorado - Piracicaba, 152 p.: il.
- OLIVEIRA, J. C. de. (1980) *Melhoramento Genético de Passiflora edulis Sims. f. flavicarpa Deg. visando aumento de produtividade*. Jaboticabal. 113p. Tese. (Livre-Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista.
- PERRIER, X.; FLORI, A. & BONNOT, F. (2003). Data analysis methods. In *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants*, pp. 43–76. Edited by P. Hamon, M. Seguin, X. Perrier & J. C. Glaszmann. Enfield, UK: Science Publishers
- PINTO, R. M. C.; CARLINI-GARCIA, L. A.; GARCIA, A. A. F.; SOUJA JR. C. L. (2003) Comparação entre diversidade genética molecular e capacidade específica de combinação na alocação de linhagens S3 de milho em grupos heteróticos. *Anais do 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas*. Porto Seguro, Bahia.

- SILVA, M. G. M. (2009), *Seleção recorrente intrapopulacional no maracujazeiro amarelo*. 157 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- SILVA, M. G. M.; Viana, A. P.; Gonçalves, G. M.; Amaral Junior, A. T. e Pereira, M. G. (2009) Seleção recorrente intrapopulacional no maracujazeiro amarelo: alternativa de capitalização de ganhos genéticos. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 33, p. 170-176.
- SOUSA, N. R. (2003) *Variabilidade genética e estimativas de parâmetros genéticos em germoplasma de guaranazeiro*. 99 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SOUZA, J. S. I. & MELETTI, L. M. M. (1997) *Maracujá: espécies, variedades, cultivo*. Piracicaba: FEALQ. 179 p.
- STENZEL, N. M. C. & SERA, T. (1999) Melhoramento genético de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Paraná. In: Reunião técnica de pesquisa em maracujazeiro, 2., Londrina, 1999. *Anais*, Londrina: IAPAR-SBF, p. 81.
- VAZ PATTO, M. C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S. e FEVEREIRO, P. (2004). Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. *Euphytica*, v.137, p.63-72.
- VEASEY, E. A. (1998) *Variabilidade genética em acessos de espécies de Sesbania Scop. (Leguminosae): caracterização morfológica, agrônômica e isoenzimática*. 142 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.
- VIANA, A.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, M. M.; MALDONADO, J. F. M. e 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. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 3, p. 489-493.

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

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

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Objetivando o melhoramento populacional do maracujazeiro amarelo da UENF, foi feita uma análise de variabilidade dos genótipos selecionados, referentes aos dois ciclos de seleção recorrentes já realizados. Para tanto, 23 pares de *primers* de microssatélites foram utilizados na genotipagem dos 66 genótipos de irmãos completos.

Em um primeiro momento, foram empregadas estatísticas descritivas de diversidade, com o objetivo de estimar a variabilidade das progênies dos dois ciclos de seleção recorrente. O número de alelos total encontrado nas populações foi de 32, sendo que, dos 32 encontrados, 30 são coincidentes e observados nas duas populações MA<sub>0</sub> e MA<sub>1</sub>; o número médio de alelos por locos foi de 2,46; na população MA<sub>0</sub>, e de 2,30, na população MA<sub>1</sub>. A heterozigose esperada (H<sub>e</sub>) na população MA<sub>0</sub> apresentou média de 0,20 por loco, um pouco maior que a heterozigose observada (H<sub>o</sub>), que apresentou média de 0,15 por loco.

Os índices de coeficiente de endogamia (F) mostraram valores negativos para a maioria dos locos, sugerindo índices altos de heterose nesses locos. A H<sub>o</sub> foi menor que a H<sub>e</sub> na população MA<sub>1</sub>, com média de 0,12. O coeficiente de endogamia médio (F) da população MA<sub>1</sub> foi de 0,31. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) apresentou média de 0,18, na população MA<sub>0</sub>, e de 0,16 na população MA<sub>1</sub>. Os dendogramas obtidos pelo índice ponderado e método de agrupamento UPGMA apresentaram os coeficientes de correlação cofenético (r)

alto 0,83, para a população MA<sub>0</sub>, e 0,86, para a população MA<sub>1</sub>. A distância genética média da população MA<sub>0</sub> foi de 0,21, e de 0,19 na população MA<sub>1</sub>, apresentando uma pequena perda de variabilidade, sendo essa flutuação considerada normal quando se pratica seleção.

Também as 39 progênies de maracujazeiro, obtidas no segundo ciclo de seleção, visando a indicar os genótipos mais divergentes para comporem o próximo ciclo de seleção recorrente com base em características agronômicas e em marcadores moleculares SSR.

Os dados agronômicos foram analisados pelo programa Darwin 5.0, no qual, foi utilizada a distância de Manhattan para indicar a variabilidade dos genótipos avaliados. Para os dados moleculares, a matriz de distância foi calculada pelo aplicativo computacional Genes, sendo utilizado o índice ponderado, a partir das matrizes dos dados agronômicos e moleculares, obtendo-se a matriz conjunta.

Posteriormente, foi realizado o agrupamento hierárquico UPGMA, e sua correlação cofenética para as matrizes das distâncias de Manhattan, índice ponderado e dados conjuntos, utilizando o programa computacional R, e ainda o Boxplot, para verificar a dispersão dos genótipos selecionados em seis características de maior importância agronômica.

Dos 25 genótipos selecionados utilizando os dados agronômicos e os moleculares, 60% destes são coincidentes, sendo os demais diferentes. Mesmo com alguns genótipos em comum, a correlação entre esses dados não foi significativa pelo teste Z de Mantel, e os 25 genótipos selecionados, mediante a análise conjunta dos dados agronômicos e moleculares, apenas 24% dos indivíduos são diferentes dos selecionados pelos dados moleculares, e 16% em relação aos dados agronômicos, sendo as correlações significativas.

Os genótipos selecionados pelos dados agronômicos foram mais eficientes em apenas uma (peso do fruto) das seis características avaliadas, atingindo uma média de peso de frutos de 174 g, superior ao das outras análises. Nas características produtividade/ha, número de frutos e dias para o florescimento, os progênies selecionadas pelos marcadores moleculares foram mais eficientes, apresentando as maiores médias.

Com base nesses resultados, pode-se concluir que:

Os marcadores SSR permitiram analisar o grau de variabilidade genética das populações  $MA_0$  e  $MA_1$ .

O coeficiente de endogamia apresentou resultado médio maiores na população  $MA_1$ , e a distância genética média decresceu entre os ciclos, mas não apresentou perdas significativas.

Os procedimentos de seleção utilizados indicaram resultados positivos, sendo que as análises moleculares foram mais eficientes na seleção dos genótipos que apresentaram as maiores médias.

Os resultados observados indicam os genótipos mais produtivos e divergentes para a continuidade ao programa de seleção recorrente do maracujazeiro, além disso, demonstram o sucesso da seleção recorrente para essa cultura e sua viabilidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, D. R. D.; SANTOS, C .C. F. Importância econômica e mercado. In: BRUCKNER, C.H.; PIKANÇO, M.C. (2001) (Ed.). *Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado*. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 9-31
- ALLARD, R. W. (1999) *Principles of plant breeding*. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 254p.
- ANGEL, E. O.; FARJADO, D.; GRUM, M.; TOHME, J. e LOBO, M. (1998) Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. *Euphytica*, Dordrecht, v. 101, n. 3, p. 341-347.
- ARAÚJO, B. C. (1978) Maracujá em Sergipe - situação atual e perspectivas. In: ENCONTRO ESTADUAL DA CULTURA DO MARACUJÁ, 1. Aracaju, SE. *Anais...* Aracaju, SE, 1978. p. 67 - 76.
- BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SANTOS, E. C.; BRAGA, M. F. e GUIMARÃES, CT. (2007) Variabilidade genética de acessos silvestres de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v. 29, n. 1, p.1 24-127.

- BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P.; PAULA, M. S.; BRAGA, M. F.; JUNQUEIRA, N. T. V.; PEIXOTO, J. R. (2005) Diversidade genética de acessos comerciais e silvestres de maracujazeiro-doce com base em marcadores RAPD. In: Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Braga, M. F.; Pinto, A. C. Q.; Sousa, E. S. (Eds.) *IV Reunião Técnica de Pesquisas em Maracujazeiro - Trabalhos apresentados*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p. 118-121
- BERNACCI, L. C.; SOARES-SCOTT, M. D.; JUNQUEIRA, N. T. V. *Passiflora edulis* Sims: a maneira taxonômica correta de referir-se ao maracujá-amarelo (e aos de outras cores). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 566-576, 2008.
- BORÉM, A. & MIRANDA, G. V. (2005) *Melhoramento de plantas*. 4. ed. Viçosa: Editora UFV, p. 525
- BORÉM, A. (2001) *Melhoramento de Plantas*, 3º edição. Viçosa: UFV. 453 p.
- BORGES R. S. A.; SCARANARI C.; NICOLI A. M.; COELHO R. R. (2005) Novas variedades: validação e transferência de tecnologia. In: FALEIRO F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA M. *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina, Embrapa Cerrados. p. 610 - 639.
- BRAGA, M. F.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, K. P. Maracujá-doce: melhoramento genético e germoplasma. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 601-616.
- BRUCKNER, C. H.; CASALI, V. W. D.; MORAES, C. F. de; REGAZZI, A. J.; SILVA, E. A. M. da. (1995). Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Acta Horticulturae*, Bélgica, v.370, p. 45-57.

- BRUCKNER, C. H.; MELETTI, L. M.; OTONI, W. C.; JUNIOR, F. M. Z.(2002) Maracujazeiro. In: BRUCKNER, C. H. *Melhoramento de fruteiras tropicais*, Viçosa: UFV, p. 373-410.
- CARNEIRO M. S.; CAMARGO L. E. A.; COELHO A. S. G. (2002) RAPD-based genetic linkage maps of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). *Genome*, Ottawa. v. 45, p. 670–678.
- CASSIANO, A. P. A. A.; LEMOS, E. G. M e OLIVEIRA, J. C. (1998) Avaliação de espécies de *Passiflora* através de marcadores moleculares RAPD. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 21, n. 3, p. 214. Suplemento.
- CHOUMANE, W.; WINTER, P.; BAUM, M.; KAHL, G. Conservation of microsatellite flanking sequences in different taxa of Leguminosae. *Euphytica*, v.138, p.239-245, 2004
- COLLEVATTI, R. G.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. (1999) Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. *Heredity*, v.83, n.6, p.748-756.
- COMSTOCK, R. E. e ROBINSON, H. F. (1948) The components of genetic variance in populations of biparental progenies and their use in estimating the average degree of dominance. *Biometrics*, Washington, v. 4, p. 254-266.
- CREGAN, P. B.; MUDGE, J.; FICKUS, E. W.; MAREK, L. F.; DANESH, D.; DENNY, R.; SHOEMAKER, R. C.; MATTHEWS, B. F.; JARVIK, T.; YOUNG, N. D. (1999) Targeted isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, v.98, p.919-928.
- CRUZ C. D. e REGAZZI, A. J. (2001) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*, 2. ed. Viçosa, UFV 390 p.

- CUCO, S. M. et al. (2005) Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. *Caryologia*, v. 58. pág. 220-228.
- CUNHA, k. S.; *Seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos em milho (Zea mays L.) monitorada por marcadores moleculares ISSR*. (2010). 73 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- DAYANADAN, S.; BAWA, K. S.; KESSELI, R. (1997) Conservation of microsatellites among tropical tree (Leguminosae). *American Journal of Botany*, v.84, n.12, p.1658-1663.
- DAYANADAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.; KESSELI, R. (1999) Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Molecular Ecology*, v.8, n.10, p.1585-1592.
- D'EECKENBRUGGE, G. C. (2003) Exploração da diversidade genética das passifloras (1 CD-ROM). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., Campos dos Goytacazes. *Palestras*. Campos dos Goytacazes: Cluster Informática.
- DUVICK, D. N. (1967) Influence of morphology and sterility on breeding methodology. In: Frey, K. J. (ed.) *Plant breeding*. Iowa: State University Press, p. 85-138.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews*, v.5, p.435-445, 2004.
- FALEIRO, F. G.; SOUSA, E. dos S. de. (2005a) IV Reunião técnica de pesquisas em maracujazeiro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p. 35-38.

- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; BELLON, G. e PEIXOTO, JR. (2005b) Diversidade genética de variedades comerciais de maracujazeiro-azedo com base em marcadores RAPD. In: *REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISAS EM MARACUJAZEIRO*, 4, Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.105-109.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BELLON, G.; BORGES, T. A.; ANJOS, J. R. N.; PEIXOTO, JR.; BRAGA, M. F. e SANTOS, D. G. (2004) Diversidade genética de espécies silvestres de maracujazeiro com resistência múltipla a doenças com base em marcadores RAPD. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 29, p. S325. Suplemento.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 220p.
- GABRIEL, A. P. C. *Seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos em milho (Zea mays L.) assistida por marcadores moleculares* (2006). 112 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- GAIOTTO, F. A.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. (2001) Microsatellite markers for heart of palm - *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Arecaceae). *Molecular Ecology Notes*, v.1, n.1-2, p.86-88.
- GALVÊAS P. A. O.; COSTA A. F. S.; ALVES F. L (1999) Introdução e obtenção de novos cultivares de maracujazeiro (*P.edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) para o Estado do Espírito Santo. In: Reunião Técnica de Pesquisa em Maracujazeiro, Londrina. *Resumo*, IAPAR. p. 76.
- GANGA, R. M. D.; RUGGIERO, C. R.; LEMOS, E. G. M.; GRILI, G. V. G.; GONÇALVES, M. M.; CHADAS, E. A. e WICKERT, E. (2004) Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares fAFLP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 494-498

- GHISLAIN, M.; RODRÍGUEZ, F.; VILLAMÓN, NÚÑEZ, J.; WAUGH, R.; BONIERBALE. (2000) Establishment of microsatellites assays for potato genetic identification. *CIP Program Report*. p.167-174.
- GONÇALVES, M. G.; VIANA, A. P.; BEZERRA NETO, F. V.; PEREIRA, M. G.; PEREIRA, T. N. S. (2007) Seleção e herdabilidade na predição de ganhos genéticos em maracujá-amarelo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.42, n.2, p.193-198.
- GONÇALVES, G. M. (2005) *Estimativas de parâmetros genéticos em características produtivas de maracujazeiro amarelo (Passiflora edulis f. flavicarpa), baseado no delineamento I*. 87 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.
- GONÇALVES, G. M.; VIANA, A. P.; BEZERRA NETO, F. V.; AMARAL JUNIOR, A. T.; PEREIRA, M. G. (2009) Genetic parameter estimates in yellow passion fruit based on design I. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, p. 523-530.
- GONÇALVES, G. M.; VIANA, A. P.; REIS, L. S.; BEZERRA NETO, F. V.; AMARAL JÚNIOR, A. T. do; REIS, L. S. Correlações fenotípicas e genético-aditivas em maracujá-amarelo pelo delineamento I. *Ciência e Agrotecnologia* .v. 32, p. 1413-1418, 2008.
- GRAPIN, J. L.; NOYER, F.; CARREL, D.; DAMBLER, F. C.; BAURENS, C.; LANAUD, AND P. J. L. LAGODA, (1998) Diploid *Musa acuminata* genetic diversity assayed with sequence-tagged microsatellite sites. *Electrophoresis*, p. 1374–1380.
- GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP. P.; SAMBROOK, J. Physical (1974) mapping of temperature-sensitive mutations of adenovirus. *Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology*, Cold Spring Harbor, v.39, p. 439-446.

- GUIMARÃES, C. T.; PADILHA, L.; SOUZA, I.R.P.; PAIVA, E. (2004) "Fingerprinting" Molecular de linhagens de milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 4p. (Embrapa Milho e Sorgo. *Comunicado técnico*, 92).
- GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, v.113, p.163-185, 2000.
- GUTIERREZ, M. V.; VAZ PATTO, M. C.; HUGHET, T.; CUBERO, J. I.; MORENO, M. T.; TORRES, A. M. Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops. *Theoretical and Applied Genetics*, v.110, p.1210-1217, 2005.
- HALLAUER, A. R. & MIRANDA, J.B. (1985) Quantitative Genetics in Mayze Breeding. 286p
- HANCOCK, J. M. The contribution of slippage-like processes to genome evolution. *Journal of Molecular Evolution*, v.41, p.1038-1047, 1995
- HINRICHSEN, P. (1999) Identificación genética de frutales de propagación agámica: el caso de las vides en Chile. In: PAGLIANO, D. (Coord.). *Calidad genética y sanitaria: un instrumento para la competitividad de la cadena Agroindustrial*. Montevideo: IICA-PROCISUR, p.39-46.
- HULL, F. H. (1945) Recurrent selection for specific combining ability in corn. *Jour. Amer. Soc. Agron.*, 37: 134-145.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: (2008) Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em 20 dez de 2008..
- INGLEZ DE SOUSA, J. S.; MELETTI, L. M. M. (1997) *Maracujá: espécies, variedades e cultivo*. Piracicaba: Fealq. 179p.

- JØRGENSEN, P. M.; LAWESSON, J. E.; HOLM-NIELSEN, L. B. (1984) A guide to collecting Passionflowers. *Annals Missouri Botanical Garden*, v.71, n.4, p.1172-1174.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; PEIXOTO, J. R.; BRANCHER, A.; JUNQUEIRA, K. P.; FIALHO, J. F. (2005) Melhoramento genético do maracujá-doce. In: MANICA, I. et al. (Ed.). *Maracujá doce: tecnologia de produção, pós-colheita e mercado*. Porto Alegre: Cinco Continentes. p. 39-46.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; SHARMA, R. D.; RITZINGER, C. H. S. P. (2003) Manejo da bacteriose e de nematóides em maracujazeiro (compact disc). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6. *Palestras*. Campos dos Goytacazes: Cluster Informática.
- KILLIP, E. P. (1938) The American species of Passifloraceae. Publications Field Museum of Natural History, *Botanica Serries* 19(1-2): 1-613.
- KNAPIK, E. W.; GOODMAN, A.; EKKER, M. (1998) A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nature Genetics*, v.18, p.338-343.
- LIBERATO, J. R. (2002) Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides em maracujá. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Ed.). *Controle de doenças de plantas: fruteiras*. Viçosa: UFV, v.2, p. 699-826.
- LIMA, A. A. e BORGES, A. L. (2004) Exigências edafoclimáticas. In: LIMA, A. A. e CUNHA, M. A. P. *Maracujá: produção e qualidade na passicultura*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura. p. 37-44.
- LITT, M.; LUTY, J. A. (1989) A Hipervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics, Bethesda*, v.44, p.398-401.

- LOPES, R. (2003) *Mapas de ligação AFLP e identificação de genes de resistência à Xanthomonas campestris pv. passiflorae em maracujá-amarelo*. 126 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; CARNEIRO, M. S.; MATTA, F. P.; CAMARGO, L. E. A.; VIEIRA, M. L. C. (2006.) AFLP linkage analysis and mapping of resistance genes to *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in yellow passion fruit. *Genome*, Ottawa, v.49, p.17-29,
- MACDOUGAL, J. M. et al. (2004) Systematics. In: Ulmer, T. & MacDougal, J.M. *Passiflora*, Passionflowers of the World. *Timber Press*, Portland. p. 27-31.
- MADUREIRA, H. C. (2009) *Caracterização celular e molecular do sistema de autoincompatibilidade esporófitica do maracujazeiro azedo (Passiflora edulis Sims)*. 102 f. Tese de doutorado (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.
- MAHADEVAN, M.; TSILFIDIS, C.; SABOURIN, L.; SHUTLER, G.; AMEMIYA, C.; JANSEN, G.; NEVILLE, C.; NARANG, M.; BARCELO, J.; O'HOY, K.; LEBLOND, S.; EARLE- MACDONALD, J.; DE JONG, P.J.; WIERINGA, B. (1992) Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 38 untranslated region of the gene. *Science*, v.255, p.1253-1258.
- MARTINS, I. (2006) *Reação de patógenos de maracujazeiro-azedo ao Colletotrichum gloesporioides e ciocontrole da antracnose com Trichoderma spp.*. 137 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília – DF
- MATTA, F. P. (2005) *Mapeamento de QRL para Xanthomonas axonopodis PV. Passiflorae em maracujá-azedo (Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.)*. Piracicaba: ESALQ/USP. 230 p. Tese de Doutorado

- MELETTI, L. M. M. (1998) *Caracterização agrônômica de progênies de maracujá amarelo (Passiflora edulis Sims. f. flavicarpa Degener)*. Piracicaba. 92p. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Universidade de São Paulo.
- MELETTI, L. M. M. (2003) Comportamento de híbridos e seleções de maracujazeiro (Passifloraceae) (compact disc). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., Campos dos Goytacazes, *Palestras*. Campos dos Goytacazes: Cluster Informática,
- MELETTI, L. M. M.; SANTOS, R. R.; MINAMI, K. (2000) Melhoramento do maracujazeiro-amarelo: Obtenção do 'Composto IAC-27'. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 56, p. 491-498.
- MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; AZEVEDO FILHO, J. A. (1999) Caracterização de germoplasma de *Passiflora* II - *P. serrato-digitata* e *P. mucronata*. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, 2, Londrina, 1999. *Anais*, Londrina: SBF/IAPAR. p. 85-86
- MORAES, M. C.; GERALDI, I. O.; MATTA, F. P.; VIEIRA, M. L. C. (2005) Genetic and phenotypic parameter estimates for yield and fruit quality traits from a single wide cross in yellow passion fruit. *Hortscience*, Alexandria, v.40, p.1978-1981.
- MORAIS, R. C.; MELO, F. M. R.; SILVA, M. M.; MUSSER, R. S. e RESENDE, L. V. (2008) Diversidade genética em maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) utilizando marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). *Anais*. Congresso Brasileiro de Fruticultura.
- NAKASONE, H. Y.; PAULL, R. E. (1998) *Tropical fruits*. New York: CAB International. 445p. (Crop Production Science in Horticulture Series, 7).
- NASCIMENTO, W. M. O.; TOMÉ, A. T.; OLIVEIRA, M. S. P.; MULLER, C. H.; CARVALHO, J. E. U. (2003) Seleção de progênies de maracujazeiro-amarelo

(*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) quanto à qualidade de frutos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.25, p.186-188.

NOGUEIRA FILHO, G. C.; RONCATTO, G.; RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J. C. (2003) Avanços em propagação vegetativa do maracujazeiro (compact disc). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., Campos dos Goytacazes, *Palestras*. Campos dos Goytacazes: Cluster Informática.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P. e VIEIRA, M. L. C. (2005). Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Molecular Ecology Notes*, v.5, n.2, p.331-333.

OLIVEIRA, E. J. (2006) *Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.)* / ESALQ / USP. Tese de Doutorado - Piracicaba, 152 p.: il.

OLIVEIRA, J. C. de. (1980) *Melhoramento Genético de Passiflora edulis Sims. f. flavicarpa Deg. visando aumento de produtividade*. Jaboticabal. 113p. Tese. (Livre-Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista.

PÁDUA, J. G.; OLIVEIRA, E. J.; ZUCCHI, G. M. I.; OLIVEIRA, C. X.; CAMARGO, L. E. A. e VIEIRA, M. L. C. (2005) Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: Passifloraceae). *Molecular Ecology Notes*, v.5, n.4, p.863-865.

PEREIRA, M. G.; PEREIRA, T. N. S.; VIANA, A. P. (2005) Marcadores moleculares aplicados ao melhoramento genético do maracujazeiro. In: Fábio Gelape Faleiros; Nilton Tadeu Vilela Junqueira; Marcelo Fidelis Braga; (Org.). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. 1 ed. Brasília: EMBRAPA, v. 1, p. 277-294.

- PINTO, R. J. B. (1995) Introdução ao melhoramento genético de plantas. Maringá. 275p.
- POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, v.2, p.225-238.
- RÊGO, M. M. (1997) *Genética, interação pólen-pistilo e expressão de proteínas na auto-incompatibilidade do maracujazeiro (Passiflora edulis Sims.)* 66 p. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- SANTANA, E. N.; LAU, D. (2002) Controle do vírus que causa endurecimento-dos-frutos-do-maracujazeiro. In: ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R.; MONTEIRO, A.J.A., COSTA, H. (Ed.). *Controle de doenças de plantas: fruteiras*. Viçosa: UFV, v.2, p. 827-836.
- SCHLOTTERER, C.; HARR, B. (2000) Drosophila virilis has long and highly polymorphic microsatellites. *Molecular Biology and Evolution*, v.17, n.11, p.1641-1646.
- SCHULER, G. D.; BOGUSKI, M. S.; STEWART, E. A. (1996) A gene map of the human genome. *Science*, v.274, p.540-546.
- SILVA, M. G. M. (2009), *Seleção recorrente intrapopulacional no maracujazeiro amarelo*. 157 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- SILVA, M. G. M.; VIANA, A. P.; GONÇALVES, G. M.; AMARAL JUNIOR, A. T. e PEREIRA, M. G. (2009) Seleção recorrente intrapopulacional no maracujazeiro amarelo: Alternativa de capitalização de ganhos genéticos. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 33, p. 170-176.

- SOARES-SCOTT, M. D. et al. (2005) Citogenética clássica e molecular em passifloras In: *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético* v. 1, p213-239.
- SOUZA JÚNIOR, C. L. (1993) Comparisons of intra-interpopulation and modified recurrent selection methods. *Revista Brasileira de Genética*, v. 16, p. 91-105.
- SOUZA JÚNIOR, C. L. (2001) Melhoramento de espécies alógamas. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; INGLIS, M.C.V. (Org.). *Recursos genéticos e melhoramento de plantas*. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso. p.159-200.
- STALLINGS, R. L. (1994) Distribution of trinucleotide microsatellites in different categories of mammalian genomic sequence: Implication for human genetic diseases. *Genomics*, v.21, p.116-121.
- STAUB, J. E.; GABERT, A.; WEHNER, T. C. (1996) Plant variety protection: A consideration of genetic relationship. *Hort Science*, v.31, n.7, p. 1086-1091.
- STENZEL, N. M. C.; SERA, T. (1999) Melhoramento genético de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Paraná. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, 2., Londrina, 1999. *Anais*, Londrina: IAPAR-SBF, p. 81.
- TAUTZ, D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, v.17, p.6463-6471.
- TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, v.25, p.4127-4138, 1984.
- TEIXEIRA, C. G. (1994) Maracujá: cultura. In: TEIXEIRA CG, DE CASTRO JV, TOCCHINI RP, NISIDA ALAC, HASHIMUZE T, MEDINA JC, TURATTI JM, LEITE RSSF, BLISKA FMM, GARCIA AE *Maracujá: cultura, matéria-prima,*

*processamento e aspectos econômicos*. Campinas, ITAL. p.1-142 (Série Frutas Tropicais, n.9).

VANDERPLANK, J. (1996) *Passion flowers*. London: Cambridge Press. 224p.

VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, M. M.; MALDONADO, J. F. M. e 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. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 3, p. 489-493.

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

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

VIEIRA, M. L. C.; OLIVEIRA, C. A.; MAYEDA, L. Y.; DORNELAS, M. C.; FUNGARO, M. H. P. (1997) Estudo do cariótipo e da variabilidade genética detectada por RAPD em espécies de maracujazeiro. *Brazilian Journal of Genetics*, Ribeirão Preto, v. 20, n. 3, p. 88. Suplemento.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, Londres, v.23, n.21, p.4407-4414.

WEBER, Z.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, v.44, p.388-396, 1989.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKY, J. A.; TINGEY, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary iniciadores are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Londres, v.18, p.6531-6535.

WU, R.; M. A. C. X.; PAINTER, I.; ZENG, Z. B. (2002) Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species. *Theoretical Population Biology*, New York, v.61, p.349-363.