

## **Diversidade e estrutura genética de maracujazeiros (*Passiflora* spp.) baseado em marcadores análogos a genes de resistência**

Diversity and genetic structure of passion fruit (*Passiflora* spp.) based on markers resistance genes analogs

Diversidad y estructura genética del maracuyá (*Passiflora* spp.) basada en marcadores análogos a los genes de resistencia

Recebido: 01/09/2022 | Revisado: 22/09/2022 | Aceitado: 01/10/2022 | Publicado: 18/10/2022

### **Larissa Neres Barbosa de Souza**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5730-115X>  
Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, Brasil  
E-mail: [larissaneres@hotmail.com](mailto:larissaneres@hotmail.com)

### **Nátilla Deyse Souza Costa Dias**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2553-0924>  
Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, Brasil  
E-mail: [natydeyse@gmail.com](mailto:natydeyse@gmail.com)

### **Lucas Amorim Silveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5747-6489>  
Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, Brasil  
E-mail: [lsilveira.biotec@gmail.com](mailto:lsilveira.biotec@gmail.com)

### **Thalana Souza Santos Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8072-3756>  
Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, Brasil  
E-mail: [thalana-souza@hotmail.com](mailto:thalana-souza@hotmail.com)

### **Rafaela Almeida Soares**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6696-9322>  
Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, Brasil  
E-mail: [rafaellaalmeidasoares@live.com](mailto:rafaellaalmeidasoares@live.com)

### **Thamires Oliveira dos Santos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8923-8151>  
Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, Brasil  
E-mail: [thamikiss18@gmail.com](mailto:thamikiss18@gmail.com)

### **Messulan Rodrigues Meira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2447-342X>  
Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, Brasil  
E-mail: [messulan.meira@gmail.com](mailto:messulan.meira@gmail.com)

### **Elisa Susilene Lisboa dos Santos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3644-3519>  
Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, Brasil  
E-mail: [elisa.lisboa@uesb.edu.br](mailto:elisa.lisboa@uesb.edu.br)

### **Fábio Gelape Faleiro**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8901-6428>  
Embrapa Cerrados, Brasil  
E-mail: [fabio.faleiro@embrapa.br](mailto:fabio.faleiro@embrapa.br)

### **Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1883-4543>  
Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, Brasil  
E-mail: [csilva@uesb.edu.br](mailto:csilva@uesb.edu.br)

## **Resumo**

O gênero *Passiflora* possui ampla distribuição e variedade genética passíveis de uso em programas de melhoramento e conservação. Porém, poucas espécies foram exploradas a nível genético e molecular. Devido à falta de conhecimento dessa natureza, sobretudo para espécies silvestres, objetivou-se avaliar a diversidade e estrutura genética em espécies comerciais e silvestres do gênero *Passiflora*. O estudo consistiu na análise do perfil de amplificação de 17 combinações de iniciadores RGA em 178 acessos (sendo, 79 espécies representadas por 166 plantas e 12 variedades – EMBRAPA BRS). Para análise dos dados, os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e posterior construção de tabela de dados binária (presença e ausência de amplificações). Os dados foram submetidos à análises de variância molecular, componente principal e Bayesiana. Os resultados, considerando apenas o polimorfismo entre as espécies e variedades (critério I, adotado neste estudo)

apresentaram sete combinações de iniciadores RGA com números relevantes da presença de locos. Ao considerar todos os acessos (critério II, adotado neste estudo), as 17 combinações de RGA resultaram em 100% de marcas polimórficas. A análise Bayesiana indicou duas possibilidades de estruturação, sendo  $k=2$  a estruturação mais provável e  $K=5$  uma subestruturação alternativa, menos provável. Na análise de variância molecular verificou-se maior diversidade entre os subgêneros e variedades, indicando baixa estruturação genética entre os acessos. Já a Análise de coordenada principal, mostrou ampla distribuição dos acessos representativo das espécies e maior estruturação entre estes acessos e as variedades. Os 17 iniciadores RGA foram eficientes para caracterizações genéticas de *Passiflora* spp.

**Palavras-chave:** Conservação; Diversidade genética; Maracujazeiros; Recurso genético.

### Abstract

The *Passiflora* genus has a wide distribution and genetic variety that can be used in breeding and conservation programs. However, few species have been explored at the genetic and molecular level. Due to the lack of knowledge of this nature, especially for wild species, the objective was to evaluate the diversity and genetic structure in commercial and wild species of the genus *Passiflora*. The study consisted of analyzing the amplification profile of 17 combinations of RGA primers in 178 accessions (79 species represented by 166 accessions and 12 varieties - EMBRAPA BRS). For data analysis, the amplification products were submitted to agarose gel electrophoresis and subsequent construction of a binary data table (presence and absence of amplifications). Data were submitted to molecular variance, principal component and Bayesian analysis. The results, considering only the polymorphism between species and varieties (criterion I, adopted in this study) showed seven combinations of RGA primers with relevant numbers of loci presence. When considering all accessions (criterion II, adopted in this study), the 17 combinations of RGA resulted in 100% polymorphic marks. The Bayesian analysis indicated two possibilities of structuring, with  $k=2$  being the most likely structuring and  $K=5$  an alternative, less likely sub-structuring. In the analysis of molecular variance, greater diversity was observed between subgenera and varieties, indicating low genetic structuring between accessions. The main coordinate analysis, on the other hand, showed a wide distribution of accessions representative of the species and greater structuring between these accessions and the varieties. The 17 RGA primers were efficient for genetic characterizations of *Passiflora* spp.

**Keywords:** Conservation; Genetic diversity; Passion fruit; Genetic resource.

### Resumen

El género *Passiflora* tiene una amplia distribución y variedad genética que puede ser utilizada en programas de mejoramiento y conservación. Sin embargo, pocas especies han sido exploradas a nivel genético y molecular. Debido al desconocimiento de esta naturaleza, especialmente para las especies silvestres, el objetivo fue evaluar la diversidad y estructura genética en especies comerciales y silvestres del género *Passiflora*. El estudio consistió en analizar el perfil de amplificación de 17 combinaciones de iniciadores RGA en 178 accesiones (79 especies representadas por 166 plantas y 12 variedades - EMBRAPA BRS). Para el análisis de datos, los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa y posterior construcción de una tabla binaria de datos (presencia y ausencia de amplificaciones). Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza molecular, componente principal y bayesiano. Los resultados, considerando únicamente el polimorfismo entre especies y variedades (criterio I, adoptado en este estudio) mostraron siete combinaciones de iniciadores RGA con números relevantes de presencia de loci. Al considerar todas las accesiones (criterio II, adoptado en este estudio), las 17 combinaciones de RGA resultaron en marcas 100% polimórficas. El análisis bayesiano indicó dos posibilidades de estructuración, siendo  $k=2$  la estructuración más probable y  $K=5$  una subestructuración alternativa menos probable. En el análisis de varianza molecular se observó mayor diversidad entre subgéneros y variedades, indicando baja estructuración genética entre accesiones. El análisis de coordenadas principales, por otro lado, mostró una amplia distribución de accesiones representativas de la especie y una mayor estructuración entre estas accesiones y las variedades. Los 17 iniciadores RGA fueron eficientes para caracterizações genéticas de *Passiflora* spp.

**Palabras clave:** Conservación; Diversidad genética; Maracuyá; Recurso genético.

## 1. Introdução

O gênero *Passiflora* pertence à família Passifloraceae, sendo este gênero o mais representativo, tanto pelo maior número de espécies, quanto pelo valor agregado enquanto recurso natural. O gênero possui cerca de 525 espécies (Cervi & Imig 2013), das quais aproximadamente 150 são encontradas no Brasil, onde aproximadamente 90 são endêmicas (Bernacci et al., 2016; Nunes & Queiroz, 2006). Diante deste cenário, o Brasil é considerado um dos centros de origem dos maracujazeiros, como popularmente são chamadas as espécies de *Passiflora*.

Considerando a variabilidade genética inter e intraespecífica existente (Nunes & Queiroz, 2006), assim como a perda acelerada de habitat, decorrente do crescimento das áreas urbanas e do avanço das fronteiras agrícolas, ganha especial

importância as ações de manejo e conservação. Estratégias de conservação *in vivo* e *ex situ* em instituições de pesquisas são notadamente necessárias para caracterização, conservação e uso destes recursos naturais. No Brasil, instituições como as unidades da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e as unidades experimentais dos *campi* universitários se destacam nestas atividades de caracterização e conservação. Em coleções ativas de germoplasma, para além da conservação, é possível a realização de caracterizações biológicas e agrônomicas dos acessos, o que naturalmente potencializa o uso destes recursos naturais em diferentes fases dos programas de melhoramento genético. Especificamente para os maracujazeiros, as coleções/bancos de germoplasma concentram o maior número de recursos genéticos conservados e com algum nível de caracterização (Meletti et al., 2005).

Dentre os maracujazeiros, destacam-se como recurso natural as espécies *P. edulis*, *P. alata*, *P. cincinnata*, *P. setacea* e *P. coccinea*. A maior popularidade dessas espécies, se deve ao seu espaço no mercado, em que são utilizadas nas indústrias, alimentícia, cosmética e, ou farmacêutica (Farmacopeia Brasileira, 2010; Bernacci et al., 2006), ou mesmo despertando novos potenciais, a exemplo do uso de subprodutos, como a casca de frutos, como substratos para produção de pigmentos (Silva et al., 2021). Embora, as espécies comumente mencionadas são utilizadas comercialmente, o subgênero *Passiflora* L. dispõe de uma grande diversidade tanto de espécies comerciais, quanto de espécies silvestres (Wetzel et al., 2011).

Pode-se verificar também, que as espécies inseridas nos subgêneros menos representativos, compõem em sua maioria espécies silvestres, como, *P. organensis*, *P. suberosa*, *P. cerradensis* e *P. chlorina*, estas e outras espécies silvestres, também apresentam potencial para programas de melhoramento genético, visto que, as espécies silvestres apresentam fonte de resistência a diversas doenças que acometem os maracujazeiros (Cerqueira-Silva et al., 2018; Paula et al., 2010).

Inúmeras espécies de *Passiflora* silvestres possuem resistência às doenças e patógenos que acometem os cultivos de maracujazeiros, o que torna as coleções de germoplasma úteis em programas de melhoramento genético, contribuindo assim para a domesticação de espécies de interesse comercial (Junqueira et al., 2007) e o direcionamento de cruzamentos. Estudos preliminares de muitas espécies silvestres, como a, *P. laurifolia*, *P. nitida*, *P. tenuifolia*, *P. mucronata*, *P. giberti*, *P. amethystina*, *P. quadrangularis*, *P. setacea*, *P. coccinea*, *P. caerulea*, atestam o potencial das espécies silvestres como fonte de genes de resistência potencialmente úteis tanto no melhoramento de espécies comerciais, quanto para a obtenção de variedades relacionadas as próprias espécies silvestres (Gonçalves et al., 2018; Junqueira et al., 2005; Santos Filho & Junqueira, 2003; Cunha et al., 2002).

O avanço das caracterizações genéticas com uso de múltiplos marcadores e com diferentes contextos (Oliveira et al., 2021) e o avanço dos programas de melhoramento, estão diretamente relacionados com o uso e avanço das técnicas moleculares, que em conjunto com as caracterizações agrônomicas aceleram e potencializam o avanço dos programas. Diante dessa realidade, as variadas opções de marcadores moleculares são rotineiramente utilizadas em diferentes etapas dos programas de melhoramento, incluindo as rotinas inerentes a ações de pré-melhoramento, onde destaca-se as caracterizações de diversidade em populações naturais e sobretudo em bancos ativos de germoplasma (BAG).

Os marcadores moleculares análogos a genes de resistência (*Resistance Genes Analogs* – RGAs), são exemplos da aplicação das técnicas de biologia molecular nas caracterizações de diversidade em plantas, incluindo os maracujazeiros (Pereira, 2012; Paula et al., 2010). Esses marcadores têm como principal característica acessar regiões conservadas presentes em genes de resistência, contribuindo, assim, com estimativas de diversidade genética a partir da identificação de polimorfismo em regiões potencialmente expressas (Hammond-Kosack & Jones, 1997).

Resultados de pesquisas envolvendo o uso de marcadores RGAs para caracterizações de maracujazeiros tem sido registrado a aproximadamente uma década (Souza et al., 2020; Pereira, 2012; Paula et al., 2010), incluindo mais recentemente informações relacionadas à caracterização e à seleção de combinações de iniciadores a serem priorizados em diferentes espécies do gênero (Souza et al., 2020). Neste mesmo contexto de avanço das pesquisas relativas à caracterização e uso das

espécies silvestres de maracujazeiro, tem-se o avanço dos programas de melhoramento que já incluem o lançamento de variedades associada a diferentes espécies silvestres, como as variedades BRS lançadas pela Embrapa.

A despeito dos avanços nos programas de melhoramento e do uso dos marcadores moleculares nas caracterizações genéticas, é ainda elevada a demanda por estudos que possibilitem desde informações preliminares para as espécies ainda não caracterizadas, até o aprofundamento daquelas espécies já inseridas em estudos genético moleculares, ou mesmo em programas de melhoramento. Diante do exposto, objetivou-se caracterizar 79 espécies do gênero *Passiflora* e 12 variedades cultivadas, mediante uso de 17 combinações de iniciadores RGAs.

## 2. Metodologia

### Obtenção das amostras / acessos

O experimento foi realizado em parceria com o Centro de Pesquisa Agropecuária Cerrados (CPAC) da Embrapa, Brasília, Distrito Federal. Foram utilizados 178 acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) “Flor da Paixão” da Embrapa Cerrados. Neste total de acessos estão inclusas 12 variedades obtidas a partir do programa de melhoramento genético da EMBRAPA, a saber: BRS céu do cerrado, BRS estrela do cerrado, BRS gigante amarelo, BRS maracujá jabuticaba, BRS pérola do cerrado, BRS mel do cerrado, BRS rosa púrpura, BRS roseflora, BRS rubi do cerrado, BRS rubiflora, BRS sol do cerrado e BRS vitta). Dados de registro dos acessos estão disponíveis na plataforma <http://alelo.cenargen.embrapa.br/>.

Os acessos utilizados estão distribuídos em 79 espécies pertencentes à família Passifloraceae, em que cinco foram do subgênero *Astrophea* DC.; 15 do subgênero *Decaloba* DC. e 59 do subgênero *Passiflora* L. (Tabela 1).

**Tabela 1.** Descrição das 79 espécies e 178 acessos de maracujá (*Passiflora* spp.), incluindo 12 variedades BRS, amostradas no Banco de Germoplasma Flor da Paixão (Embrapa Cerrados).

Subgênero	Nº de espécies	Nº de acessos	Espécies
<i>Astrophea</i>	15	17	<i>P. cerradensis</i> Sacco, <i>P. haematostigma</i> Mart. Ex. Mast., <i>P. chlorina</i> L. K. Escobar, <i>P. rhamniflora</i> Mst., <i>P. sclerophylla</i> Harms.
<i>Decaloba</i>	15	31	<i>P. organensis</i> Gardiner, <i>P. suberosa</i> L., <i>P. capsularis</i> Lam., <i>P. ferrugínea</i> Mast., <i>P. vespertilio</i> L., <i>P. auriculata</i> Kunth, <i>P. morifolia</i> Mast., <i>P. porophylla</i> Vell., <i>P. rubra</i> L., <i>P. biflora</i> Lam., <i>P. cervii</i> M.L. Azevedo, <i>P. micropetala</i> Mart., <i>P. pohloo</i> Mast, <i>P. saxicola</i> Gontsch e <i>P. tricuspis</i> Mast.  <i>P. alata</i> Curtis, <i>P. cincinnata</i> Mast, <i>P. edulis</i> Sims, <i>P. foetida</i> L., <i>P. maliformis</i> Vell., <i>P. P. nítida</i> Kunth, <i>P. quadrangulares</i> L., <i>P. amethystina</i> J. C. Mikan, <i>P. caerulea</i> L., <i>P. quadrifaria</i> Vanderpl, <i>P. setacea</i> DC., <i>P. tholozanii</i> Sacco, <i>P. vitifolia</i> Kunth, <i>P. actínia</i> Hook, <i>P. ambígua</i> Hemsl., <i>P. coccínea</i> Aubl., <i>P. hatschbachii</i> Cervi, <i>P. malacophylla</i> Mast., <i>P. mucronata</i> Lam., <i>P. trintae</i> Sacco, <i>P. araujo</i> Saco, <i>P. bahiensis</i> Klotzsch, <i>P. cappariidifolia</i> Killip, <i>P. galbana</i> Mast., <i>P. gardineri</i> Mast., <i>P. hypoglauca</i> Harms, <i>P. incarnata</i> L., <i>P. kermesina</i> Link & Otto, <i>P. laurifolia</i> L., <i>P. loefgrenii</i> Vitta, <i>P. mierssi</i> Mast, <i>P. pedata</i> L., <i>P. recurvata</i> Mast., <i>P. sidifolia</i> M. Roem, <i>P. triloba</i> Ruiz & Pav. Ex DC., <i>P. villosa</i> Vell, <i>P. boticarioana</i> Cervi, <i>P. cerasina</i> Annonay & Feuillet, <i>P. edmundoi</i> Sacco, <i>P. eichleriana</i> Mast., <i>P. elegans</i> Mast., <i>P. gibertii</i> B.E. Br., <i>P. glandulosa</i> Cav., <i>P. jilekii</i> Wawra, <i>P. junqueirae</i> Imig & Cervi, <i>P. ligularis</i> Juss., <i>P. luetzelburgii</i> Harms, <i>P. mendocaei</i> Harms, <i>P. odontophylla</i> Harms, <i>P. picturata</i> Ker Gawl., <i>P. phoenicea</i> Lindl., <i>P. quadriglandulosa</i> Rodschied, <i>P. racemosa</i> Brot., <i>P. riparia</i> Mart. Ex. Mast., <i>P. setulosa</i> Killip, <i>P. speciosa</i> Gardner, <i>P. subrotunda</i> Mast., <i>P. tenuifila</i> Killip e <i>P. variolata</i> Poepp.& Endl.
<i>Passiflora</i>	59	128	

Fonte: Autores (2022).

### **Extração e armazenamento de DNA**

O DNA genômico dos acessos foi extraído pelo método CTAB 2% (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) conforme preconizado por Faleiro et al. (2003) e a quantificação dos ácidos nucleicos foi realizada por espectrofotometria nas razões de absorbância em  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  a  $A_{260/230}$  e  $A_{260/280}$ , utilizando o BioDrop®  $\mu\text{LITE}$  (*Whitehead Scientific*). Para melhor atribuição dos resultados, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v), corados com Gel Red® (Biotium), durante 90 min a 90V. Os mesmos foram comparados com o marcador de peso molecular do DNA de fago Lambda de 100 bp da Invitrogen® ( $\lambda$ ) diluído para as concentrações de 25 a 75  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ .

Após as corridas de eletroforese, os géis foram visualizados em transluminador sob luz ultravioleta (UV) e registrados em sistema de fotodocumentação Kodak (Kodak MI Software). De posse das leituras espectrofotométricas, mensurou-se as médias e desvio-padrão com o auxílio do Software BioEstat® 5.0 (Ayres et al., 2007). As amostras de DNA foram diluídas na proporção de 100 $\mu\text{l}$  à 50  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  para padronização e condicionadas em gelo seco no Laboratório de Genética Molecular Aplicada (LGMA) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB, *campus* de Itapetinga) onde foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) com uso de iniciadores *Resistance Genes Analog* (RGA).

### **Genotipagem com marcadores moleculares**

No total foram utilizadas 17 combinações de iniciadores RGA (Tabela 2), previamente caracterizados para espécies do gênero *Passiflora* spp. (Souza et al., 2020; Pereira, 2012; Paula et al., 2010) e para *Cucumis melo* L. (Maciel, 2014). As reações de PCR consistiram de 16  $\mu\text{L}$ , contendo 8  $\mu\text{L}$  de DNA a 2  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , 1  $\mu\text{L}$  de cada iniciador RGA, 0,11  $\mu\text{L}$  Taq DNA Polimerase, 1  $\mu\text{L}$  do mix de dNTP, 1  $\mu\text{L}$  de Cloreto de Magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), 1,7 de Tampão 10X e 2,19 $\mu\text{L}$  de água ultra pura (q.s.p). Os programas adotados para as reações de amplificação consistiram em 5 minutos a 95°C para desnaturação inicial; seguido de 34 ciclos de (30 segundos a 95°C, 1 minuto a 37°C para anelamento, 1 min. E 20 segundos a 72°C para extensão); seguido de extensão final de 10 min. A 72°C. A reação de PCR para todas as combinações de iniciadores RGA foram realizados em termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA).

Em síntese, os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% (m/v), utilizando tampão de corrida TBE-0.5X, em uma voltagem de 120 por 2 horas. O registro das imagens foi realizado em transluminador sob luz ultravioleta (UV) e registrados em sistema de fotodocumentação Kodak (Kodak MI Software).

**Tabela 2.** Combinações de iniciadores RGA (*Resistance Genes Analog*) utilizados para caracterização do gênero *Passiflora*.

Combinação	Iniciadores	Sequência de nucleotídeos 5' - 3'
1	S1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG
	NBSr1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACGYCT
2	S2	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC
	As1	CAAGGCTAGTGGCAATCC
3	S2	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC
	As2	IAAIGCIAGIGGIAAICC
4	NBSf1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC
	As2	IAAIGCIAGIGGIAAICC
5	S1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG
	As1	CAAGGCTAGTGGCAATCC
6	S1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG
	As2	IAAIGCIAGIGGIAAICC
7	S1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG
	As3	IAGIGCIAGIGGIAGICC
8	NBSf1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC
	NBSr1	GGTGGGGTTGGGAAGACAACGYCT
9	NBSf1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC
	As1	CAAGGCTAGTGGCAATCC
10	NBSf1	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC
	As3	IAGIGCIAGIGGIAGICC
11	RGA1f	AGTTTATTATTYSATTGCT
	RGA2r	CACACGGTTTAAAATTCTCA
12	RGA1f	AGTTTATTATTYSATTGCT
	RGA5r	TCAATCATTCTTTGCACAA
13	RGA1f	AGTTTATTATTYSATTGCT
	RGA6r	AACTACATTCTTTGCAAGT
14	RGA1f	AGTTTATTATTYSATTGCT
	RGA8r	CCGAAGCATAAGTTGGTG
15	S2	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC
	As3	IAGIGCIAGIGGIAGICC
16	As1	CAAGGCTAGTGGCAATCC
	As2	IAAIGCIAGIGGIAAICC
17	As1	CAAGGCTAGTGGCAATCC
	As3	IAGIGCIAGIGGIAGICC

\*I= A/T/G/C; D= A/G/T; E=C/G; R= A/G; Y= C/T. Fonte: Autores, (2022).

### Estimativa de diversidade genética

A genotipagem realizada a partir da avaliação do padrão de amplificação das 17 combinações dos iniciadores RGA (Tabela 2), com base na presença e ausência de marcadores visualizados nos géis, considerou dois critérios. O primeiro (I) considerando 91 acessos, sendo uma planta de cada espécie (totalizando 79) e variedades (totalizando 12). E o segundo (II) considerando 178 acessos, soma do total de 166 plantas das 79 espécies e das 12 variedades (Tabela 1).

De posse dos dados obtidos com cada um dos dois critérios, realizou-se Análises de Coordenadas Principais (PCoA) e inferência Bayesiana com o auxílio dos softwares GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) e Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), respectivamente. Para determinação do número de *pools* gênicos mais provável para distribuição das amostras (Delta-K mais provável), foi adotada a metodologia *ad hoc*, disponível no portal *Structure Harvester* <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>.

### 3. Resultados e Discussão

Para o critério I, foi observado que dentre as 17 combinações dos iniciadores RGA, pode-se destacar as combinações 1, 5, 6, 7, 9, 10 e 17, visto terem estas combinações gerado marcadores (amplificações) em ao menos 50% das espécies avaliadas (Tabela 3). Ao considerarmos uma avaliação das amplificações por subgênero e variedades, observa-se dados distintos, onde espécies dos subgêneros *Passiflora* e *Decaloba* apresentaram a presença de marcadores gerados a partir de todas as 17 combinações de iniciadores RGA, enquanto no subgênero *Astrophea* e nas variedades BRS um total de quatro e nove combinações de iniciadores RGA, respectivamente, não geraram marcadores (Tabela 4). Esses perfis diferenciados de amplificação entre subgêneros, assim como entre as espécies destes subgêneros e as variedades BRS, são uma evidência favorável ao uso dos marcadores RGA para estimativas de diversidade genética em maracujazeiros.

**Tabela 3.** Número de marcadores gerados para as 79 espécies e 12 variedades de maracujazeiros, mantidos no Banco de Germoplasma Flor da Paixão (Embrapa Cerrados), e percentual de espécies/ variedades representadas com estas amplificações, geradas a partir de 17 combinações de iniciadores RGA (*Resistance Genes Analog*).

Combinações	Iniciadores	Número de marcadores	Percentual de espécies
1	S1 + NBSr1	89 (97,8%)	91,80%
2	S2 + As1	33 (36,2%)	36,20%
3	S2 + As2	18 (19,7%)	19,70%
4	NBSf1 + As2	22 (24,1%)	24,10%
5	S1 + As1	89 (97,8%)	97,80%
6	S1 + As2	58 (63,7%)	63,70%
7	S1 + As3	69 (75,8%)	75,80%
8	NBSf1 + NBSr1	35 (34%)	34,00%
9	NBSf1 + As1	52 (57,1%)	57,10%
10	NBSf1 + As3	49 (53,8%)	53,80%
11	RGA1f + RGA2r	34 (37,3%)	37,30%
12	RGA1f + RGA5r	19 (20,8%)	20,80%
13	RGA1f + RGA6r	13 (14,2%)	14,20%
14	RGA1f + RGA8r	20 (21,9%)	21,90%
15	S2 + As3	36 (39,5%)	39,50%
16	As1 + As2	14 (15,3%)	15,30%
17	As1 + As3	84 (92,3%)	92,30%

Fonte: Autores, (2022).

**Tabela 4.** Número e percentual de espécies nos subgêneros de *Passiflora* e de variedades, mantidos no Banco de Germoplasma Flor da Paixão (Embrapa Cerrados), que apresentaram marcadores gerados a partir de 17 combinações de iniciadores RGA (*Resistance Genes Analog*).

Combinações	Iniciadores	Subgêneros			variedades BRS
		<i>Astrophea</i>	<i>Decaloba</i>	<i>Passiflora</i>	
1	S1 + NBSr1	5 (100%)	15 (100%)	57 (96,6%)	12 (100%)
2	S2 + As1	1 (20%)	7 (46,6%)	25 (42,3%)	0
3	S2 + As2	0	3 (20%)	14 (23,7%)	1 (8,3%)
4	NBSf1 + As2	0	5 (33,3%)	17 (28,8%)	0
5	S1 + As1	5 (100%)	15 (100%)	57 (96,6%)	12 (100%)
6	S1 + As2	2 (40%)	13 (86,6%)	36 (61%)	7 (58,3%)
7	S1 + As3	5 (100%)	11 (73,3%)	45 (76,2%)	8 (66,6%)
8	NBSf1 + NBSr1	2 (40%)	5 (33,3%)	28 (47,4%)	0
9	NBSf1 + As1	4 (80%)	7 (46,6%)	41 (69,4%)	0
10	NBSf1 + As3	4 (80%)	9 (60%)	36 (61%)	0
11	RGA1f + RGA2r	2 (40%)	5 (33,3%)	21 (35,5%)	6 (50%)
12	RGA1f + RGA5r	1 (20%)	2 (13,3%)	14 (23,7%)	2 (16,6%)
13	RGA1f + RGA6r	0	2 (13,3%)	11 (18,6%)	0
14	RGA1f + RGA8r	0	6 (40%)	14 (23,7%)	0
15	S2 + As3	3 (60%)	6 (40%)	27 (45,7%)	0
16	As1 + As2	1 (20%)	2 (13,3%)	11 (18,6%)	0
17	As1 + As3	4 (80%)	15 (100%)	54 (91,5%)	11 (95,6%)

Fonte: Autores (2022).

Por sua vez, ao considerar os dados obtidos conforme preconizado pelo critério II, foi observado um total de 261 marcadores, todos polimórficos, gerados após as reações de amplificação com os 178 acessos de *Passiflora* spp. (Tabela 5). Destes marcadores gerados, foram observados por subgênero ou variedades um total de 74 marcadores para o subgênero *Astrophea*, 146 marcadores para o *Decaloba*, 243 marcadores para o *Passiflora* e 43 marcadores para as variedades (EMBRAPA BRS). Esse resultado pode ser explicado devido ao subgênero *Passiflora* abranger o maior número de espécies presentes no BAG, o que corresponde à maior diversidade de marcadores genético molecular observada com uso dos iniciadores RGA.

**Tabela 5.** Marcadores gerados para 166 acessos (distribuídos em 79 espécies e representativos de três subgêneros) e 12 variedades, mantidos no Banco de Germoplasma Flor da Paixão a partir de 17 combinações de RGA (*Resistance Genes Analog*).

Combinações	Iniciadores	Subgêneros			Variedades BRS	Total**
		Astrophea	Decaloba	Passiflora		
1	S1 + NBSr1	8	13	17	11	17
2	S2 + As1	4	17	25	0	25
3	S2 + As2	0	4	8	1	11
4	NBSf1 + As2	0	8	9	0	11
5	S1 + As1	13	16	17	9	18
6	S1 + As2	6	13	16	5	16
7	S1 + As3	5	7	10	3	13
8	NBSf1 + NBSr1	4	8	15	0	15
9	NBSf1 + As1	8	13	19	0	19
10	NBSf1 + As3	6	7	7	0	7
11	RGA1f + RGA2r	3	4	17	1	18
12	RGA1f + RGA5r	2	2	9	1	11
13	RGA1f + RGA6r	0	3	8	0	8
14	RGA1f + RGA8r	1	6	16	0	17
15	S2 + As3	4	11	15	0	16
16	As1 + As2	1	6	8	0	9
17	As1 + As3	9	8	17	12	20
Total*		4	146	243	43	261

\*Número de marcadores observados a partir das 17 combinações de iniciadores RGA; \*\*Número de marcadores observados a partir do total de acessos caracterizados. Fonte: Autores (2022).

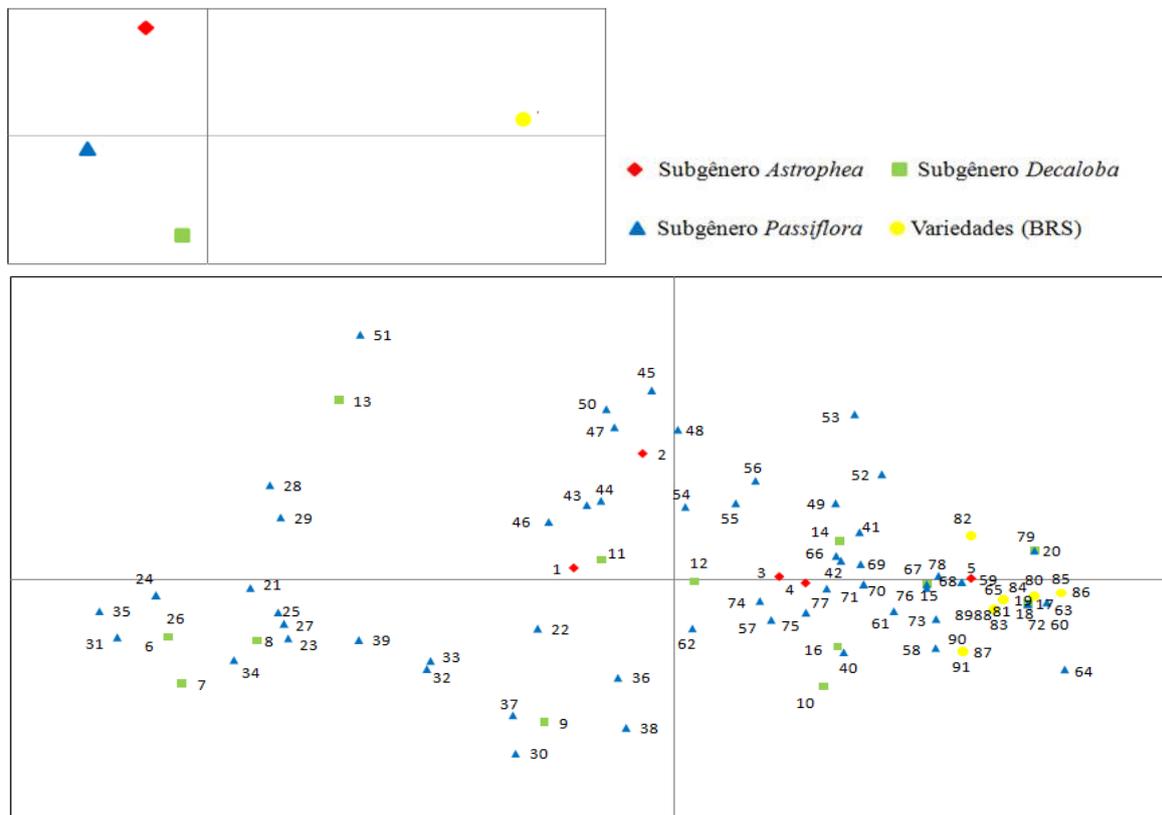
Apesar de escassos, os estudos publicados a partir do uso de marcadores RGA para o gênero *Passiflora* demonstraram a eficiência dos RGAs nas caracterizações de diversidade genética (Paula et al., 2010; Pereira, 2012; Souza et al., 2020). Os iniciadores utilizados nesse trabalho foram os mesmos utilizados por Paula et al. (2010); Pereira (2012) e Souza et al. (2020) e, em todos estes trabalhos, os autores recomendaram o uso dos RGAs em estudos de diversidade genética de maracujazeiro. Além do que nos dois primeiros trabalhos citados, Paula et al. (2010) e Pereira (2012), também se registraram, em cada um dos seus contextos de estudo, a importância em potencial dos marcadores RGA para acessar regiões conservadas NBS para a caracterização e manipulação de potenciais genes de resistência.

No tocante ao número de marcadores gerados com uso de RGA em maracujazeiros, Paula et al. (2010), utilizando seis combinações de RGA (S2+As1, S2+As2, S2+As3, S2+LM637, F1+As2 e S2+R1) em oito espécies (*P. setacea*, *P. nitida*, *P. serratodigitata*, *P. caerulea*, *P. gibertii*, *P. odontophylla*, *P. edulis* nativo e *P. coccinea*) e um híbrido interespecífico (*P. setacea* x *P. coccinea*), observaram um total de 99 marcadores, aproximadamente 16,5 marcadores por combinação de iniciadores RGA. Tal resultado é semelhante ao observado no presente estudo para a média das caracterizações realizada no subgênero *Passiflora* (15,5 marcadores por combinação de iniciadores RGA) (Tabela 5). Os estudos conduzidos por Paula (2006) e Pereira (2012) demonstram que não apenas o número de marcadores RGA gerados em maracujazeiros são elevados, mais também a predominância de polimorfismo, tendo estes autores observado em seus trabalhos percentuais de polimorfismo superiores a 95%, tanto em espécies silvestres quanto comerciais.

A diversidade genética entre os acessos de maracujazeiro também foi observada e corroborada a partir da análise de

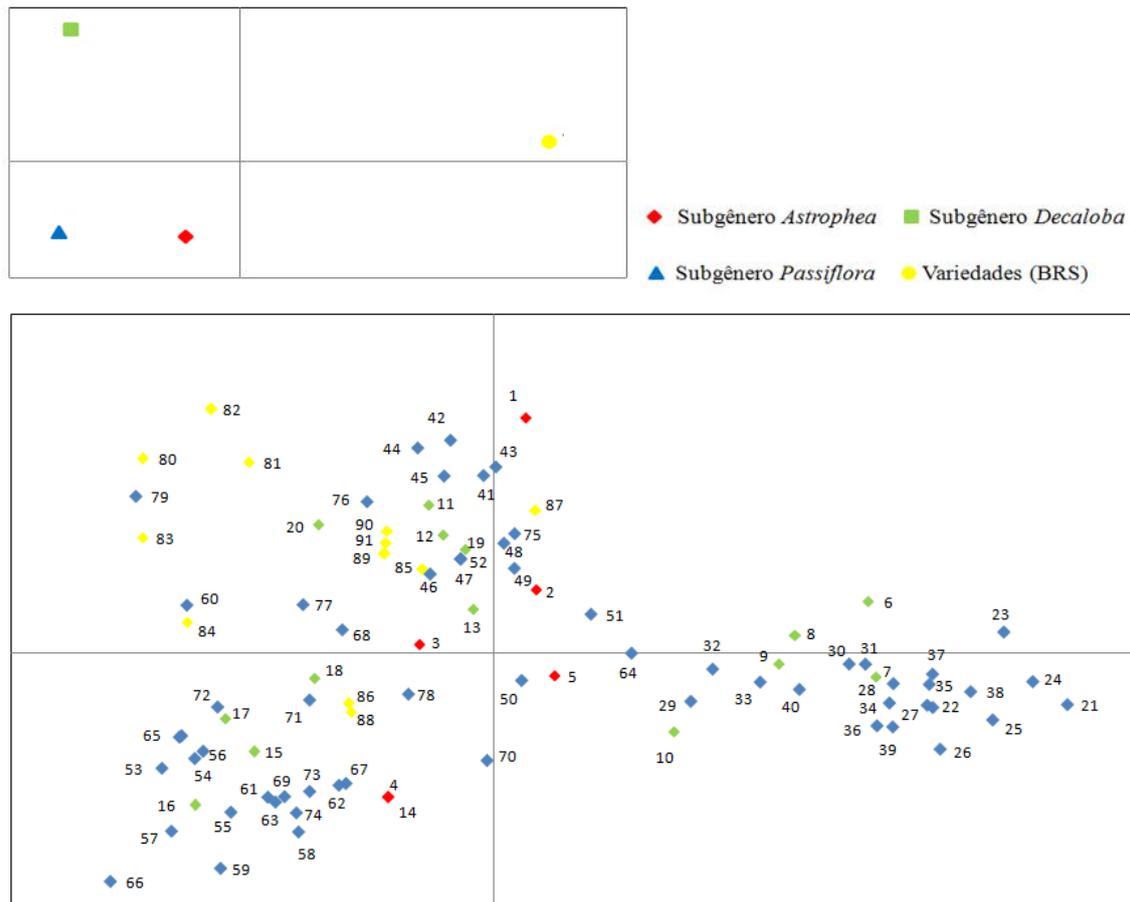
gráficos de coordenadas principais (PCoA) (Figuras 1 e 2). Para ambos os critérios de análise considerados, ficou evidente a formação de quatro grupos distintos, correspondendo aos três subgêneros de *Passiflora* (*Astrophea*, *Decaloba*, *Passiflora*) e pelas variedades; a despeito da utilização dos 79 acessos, decorrentes do uso de apenas um acesso por espécie e/ou variedade (critério I, Figura 1), ou do total de 188 acessos, decorrente da inclusão das repetições de plantas por acessos (critério II, Figura 2). de maneira geral, observa-se que os subgêneros estão mais próximos entre si, enquanto as variedades mais distantes dos mesmos subgêneros. Essa distribuição/estruturação da diversidade pode guardar relação com o histórico dos programas de melhoramento genético desenvolvido para obtenção das variedades.

**Figura 1.** Análise de Coordenadas Principais realizadas a partir de três subgêneros (representados por 79 espécies de *Passiflora* spp.) e 12 variedades de maracujá (EMBRAPA BRS) provenientes do Banco de Germoplasma Flor da Paixão, caracterizados a partir do padrão de amplificação observado com 17 combinações de iniciadores RGA (adotando-se o critério I de análise proposto).



Fonte: Autores (2022).

**Figura 2.** Análise de Coordenadas Principais realizadas a partir de três subgêneros (representados por 166 acessos distribuídos em 79 espécies de *Passiflora* spp.) e 12 variedades de maracujá (EMBRAPA BRS) provenientes do Banco de Germoplasma Flor da Paixão, caracterizados a partir do padrão de amplificação observado com 17 combinações de iniciadores RGA adotando o critério II.



Fonte: Autores (2022).

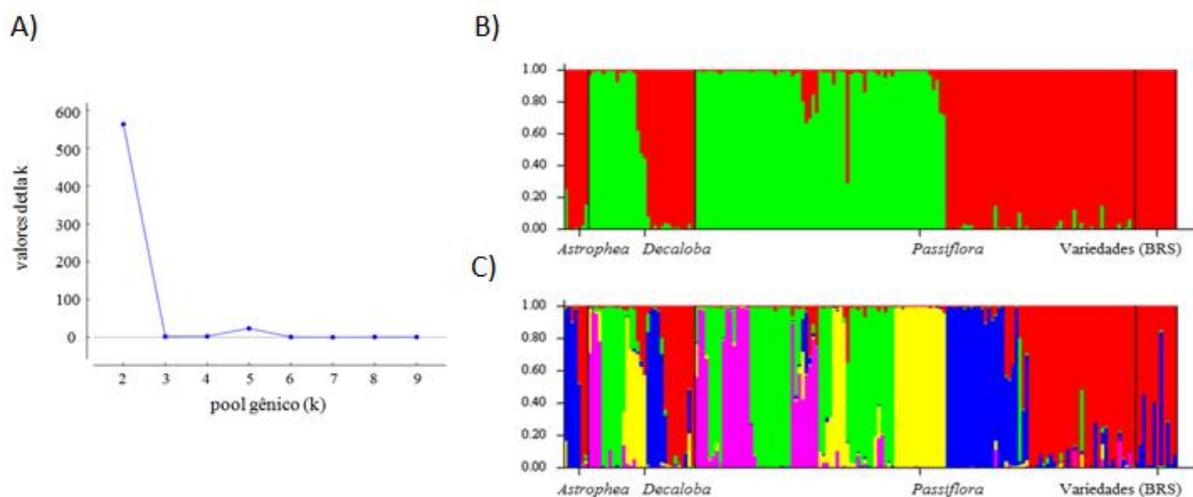
As observações decorrentes das análises de PCoA também possibilitam verificar maior distância genética entre os subgêneros *Decaloba* e *Astrophea*. Como o subgênero *Passiflora* abrange uma maior quantidade de espécies, observou-se que a distribuição está mais homogênea e ao mesmo tempo dispersa. Ressaltando assim, que a diversidade está distribuída majoritariamente entre as populações (subgêneros e variedades), em contraste, com um percentual notadamente inferior de diversidade entre as populações, evidenciando que existe baixo nível de estruturação nos subgêneros e variedades BRS avaliadas. Apesar da ampla variedade fenotípica (por vezes relacionada às características agrônômicas), estudos já com diferentes espécies de maracujazeiros já identificaram e/ou buscaram discutir a baixa diversidade genética identificada em espécies de maracujazeiros, sendo incluído nestes estudos inclusive a ausência de polimorfismo observada em loci microssatélites (Ortiz et al., 2012; Amorim et al., 2014; Cerqueira-Silva et al., 2014a; Cerqueira-Silva et al., 2014b)

A análise da diversidade genética dos subgêneros *Astrophea*, *Decaloba* e *Passiflora* e, as variedades do gênero *Passiflora*, revelou que os dados obtidos pelas PCoA, independente do critério (I ou II), corroboram com dados existentes na literatura, ao sugerir o subgênero *Passiflora* como o mais rico e diverso. Em parte, esses resultados guardam relação com o quantitativo de espécies dos subgêneros (Ulmer & Macdougall, 2004). Entretanto, apesar da menor riqueza de espécies nos subgêneros menos representativos, espécies destes subgêneros, como a *P. organensis*, *P. suberosa*, *P. cerradensis* e *P.*

*chlorina*, possuem importante papel nos programas de melhoramento, uma vez que apresentam resistência a doenças de grande ocorrência nos cultivos do maracujazeiro. Assim, estas espécies se tornam fonte de origem para caracteres de interesse agrônomico e comercial (Cerqueira-Silva et al., 2018; Paula et al., 2010).

Quanto à inferência Bayesiana, com base na estimativa de delta K, observou-se uma estruturação baseada em dois *pools* gênicos, representativos de dois grupos genéticos e ainda a possibilidade de análise de uma subestruturação em cinco grupos genéticos para os 166 acessos e 12 variedades de *Passiflora* (Figura 3A).

**Figura 3.** Estimativas de estrutura com base em inferências Bayesianas. Valores de delta K para o número de *pool* gênico (K) mais provável – A); Histograma considerando existência de 2 *pool* gênicos (K=2) – B) e de 5 *pool* gênicos (K=5) – C), tendo como base 178 acessos de maracujazeiros, distribuídos em três subgêneros de *Passiflora* (total de 166) e um grupo de variedades (total de 12).



Fonte: Autores (2022).

O histograma ilustra o nível de estruturação dos subgêneros *Astrophea*, *Decaloba*, *Passiflora* e das Variedades (BRS), mostrando a representação de histogramas com dois (Figura 3B) e cinco (Figura 3C) *pools* gênicos. É notório uma maior homogeneidade nas amostras do subgênero *Astrophea* e nas variedades (BRS), estando todos os acessos representados por um mesmo *pool* gênico. Por sua vez, os subgêneros *Decaloba* e *Passiflora*, possuem aproximadamente 50% dos acessos representados em cada um dos dois *pools* gênicos estimados para o K=2.

#### 4. Considerações Finais

Os iniciadores RGAs revelaram polimorfismos genéticos em maracujazeiros, demonstrando serem informativos e eficientes para estimativas genéticas do gênero *Passiflora*. Os 178 acessos representantes dos três subgêneros *Passiflora*, *Decaloba* e *Astrophea* e das variedades BRS de *Passiflora*, demonstraram diversidade genética passível de subsidiar ações para o avanço dos programas de melhoramento genético. Dessa forma, para além do potencial de uso do material estudado para cruzamentos inter e intraespecíficos que visem explorar a diversidade genética do BAG, tem-se a confirmação do potencial uso dos iniciadores RGA em estudos dedicados tanto para as estimativas de diversidade intra, quanto interespecíficas.

#### Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao programa de pós-graduação em

Ciências Ambientais (PPGCA) pela concessão da bolsa de estudo, bem como a FAPESB (PIE 0014/2016 e DTE 009/2016) e UESB (AUXPPI TO 24 de 2019), pelo suporte financeiro.

## Referências

- Amorim, J. S., Souza, M. M., Viana, A. J. C., Corrêa, R. X., Araujo, I. S. & Ahnert, D. (2014). Cytogenetic, molecular and morphological characterization of *Passiflora capsularis* L. and *Passiflora rubra* L. *Plant Systematics and Evolution*, 300 (5), 1147–1162. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0952-1>
- Bernacci, L. C., Meletti L. M. M., Soares-Scott, M. D. & Passos, I. R. S. (2006). Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: Faleiro, F.G.; Junqueira N.T.V.; Braga, M.F (eds.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p.559-586.
- Bernacci, L. C., Cervi, A. C., Milward- De -Azevedo, M. A., Nunes, T. S., Imig, D. C. & Mezzonato, A. C. (2016). Passifloraceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12506>
- Cerqueira-Silva, C. B. M., Santos, E. S. L., Vieira, J. G. P., Mori, G. M., Jesus, O. N., Corrêa, R. X. & Souza, A. P. (2014a). New microsatellite markers for wild and commercial species of *Passiflora* (Passifloraceae) and cross-amplification. *Applications in Plant Sciences*, 2, 1-5. <https://doi.org/10.3732/apps.1300061>
- Cerqueira-Silva, C. B. M., Jesus, O. N., Santos, E. S. L., Corrêa, R. X. & Souza, A. P. (2014b). Genetic breeding and diversity of the genus *Passiflora*: progress and perspectives in molecular and genetic studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 14122-14152. <https://doi.org/10.3390/ijms150814122>
- Cerqueira-Silva, C. B. M., Faleiro, F. G., de Jesus, O. N., dos Santos, E. S. L., & de Souza, A. P. (2018). Passion fruit (*Passiflora* spp.) Breeding. In advances in plant breeding strategies: Fruits (pp. 929-951). Springer, Cham.
- Cervi, A. C. & Imig, D. C. (2013). A new species of *Passiflora* (Passifloraceae) from Mato grosso do sul, brazil. *Phytotaxa*, 103 (1): 46-50.
- Cunha, M. A. P., Barbosa L. V. & Junqueira, N. T. V. (2002). Aspectos botânicos. In: Lima A.A (ed.) Maracujá Produção: aspectos técnicos. Cruz das Almas: Embrapa mandioca e fruticultura; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 15-24.
- Faleiro, F. G., Faleiro, A. S. G., Cordeiro, M. C. R. & Karia, C. T. (2003). Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados.
- Gonçalves, Z. S., Lima, L. K. S., Soares, T. L., Abreu, E. F. M., Barbosa, C. J., Cerqueira-Silva, C. B. M., Jesus, O. N. & Oliveira, E.J. (2018). Identification of *Passiflora* spp. genotypes resistant to Cowpea aphid-borne mosaic virus and leaf anatomical response under controlled conditions. *Scientia Horticulturae*, 231, 166-178. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.008>.
- Hammond-Kosack, K. E. & Jones, J. D. G. (1997). Plant Disease Resistance Genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 575–607.
- Junqueira, N. T. V., Braga, M. F., Faleiro, F. G., Peixoto, J. R., & Bernacci, L.C. (2005). Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a de doenças. In *Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético*; Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F., Eds.; Embrapa Cerrados: Planaltina, Brazil, pp. 79–108.
- Junqueira, k. P., Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Bellon, G., Ramos, J. D., Souza, L. S., & Santos, E. C. (2007). Obtenção de híbridos interespecíficos de *Passiflora laurifolia* l. e *Passiflora nítida* kunth. In: 4º congresso brasileiro de melhoramento de plantas, São Lourenço. Anais do 4º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas.
- Maciel, C. C. (2014). Diversidade de genótipos de melão por meio de descritores morfológicos e marcador RGA. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual De Santa Cruz.
- Ulmer, T. & MacDougal, J. M. (2004) *Passiflora: Passionflowers of the World*. Eds.; Timber Press: Portland, OR, USA, 2004; pp. 27–31.
- Meletti, L. M. M., Soares-Scott, M. D., Bernacci, L. C., & Passos, I. R. S. (2005). Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. (Ed.) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, Cap. 3, p. 55-78.
- Ministério da Saúde (2010) Farmacopeia Brasileira. Brasília: Editora Anvisa.
- Nunes, T. S., Queiroz, L.P. (2006). Flora da Bahia: Passifloraceae. *Sitientibus*, 6 (3), 194- 226.
- Oliveira, A. J., Oliveira, T. C., Santos, A. A. C., Siqueira, T. A., Duarte, W. M., Caldeira, D. S. A., Vilarinho, M. K. C., Almici, M. S., Silva, G. F., Barelli, M. A. A. & Karsburg, I. V. (2021). Principal molecular markers. *Research, Society and Development*, 10 (15), e562101523633. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i15.23633>.
- Ortiz, D. C., Bohórquez, A., Duque, M. C., Tohme, J., Cuéllar, D., Vásquez, T. M. (2012). Evaluating purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) genetic variability in individuals from commercial plantations in Colombia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59, 1089–1099. <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9745-y>
- Paula, S. M., Fonseca, M. E. N. DE., Boiteux, L. S. & Peixoto, J. R. (2010). Caracterização genética de espécies de *Passiflora* por marcadores moleculares análogos a genes de resistência. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32 (1), 222-229.
- Paula, M. S. (2006). Diversidade genética e reação de *Passiflora* sp. a *Meloidogyne Incognita* e a *Meloidogyne Javanica*. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília.

- Pereira, A. S. (2012). Genética e pós-melhoramento em cultivares de maracujazeiro amarelo: variabilidade acessada por ferramentas biométricas e moleculares. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Santa Cruz (UESC), Ilhéus – BA.
- Peakall, R. E. & Smouse P. E. (2012) GenAlEx 6.5: análise genética no excel. Software genético populacional para ensino e pesquisa - uma atualização. *Bioinformática*, 28, 2537-2539.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Santos Filho, H. P. & Junqueira, N. T. (2003). Maracujá: fitossanidade. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 86 p. (Embrapa Informação Tecnológica. Série Frutas do Brasil, 32).
- Silva, T. M., Silva Neto, A. B., Teixeira, J. M., Cerqueira-Silva, C. B. M., Gualberto, S. A. & Freitas, J. S. (2021) Optimization of pigment production by *Rhodotorula minuta* URM 5197 and *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 using yellow passion fruit peel (*Passiflora edulis*). *Research, Society and Development*, 10(17), e152101724311. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i17.24311>
- Souza, L. N. B., Dias, N. D. S. C., Santana, V. O., Silveira, L. A., Meira, M. R., Santos, E. S. L., Faleiro, F. G. & Cerqueira-Silva, C. B. M. (2020). Amplification test and selection of markers analogue to resistance genes in species and commercial varieties of *Passiflora* spp. *Multi-Science Journal*, 3 (1), 65-71. <http://dx.doi.org/10.33837/msj.v3i1.1183>
- Wetzel, M. M. V. S., Gimenes, M. A., Pádua, J. G., José, S. C. B. R. & Neto, L. G. P (2011). Conservação de espécies silvestres com potencial de utilização em programas de pré-melhoramento na coleção base da EMBRAPA. Lopes, M. A., Fávero, A. P., Ferreira, M. A. J. F., Faleiro, F. G., Folle, F. M., Guimarães, E. P (EDS.). Pré-melhoramento de plantas: estado da arte e experiências de sucesso. Embrapa Informações tecnológicas, Brasília, DF. 102-122.