



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**RETROCRUZAMENTOS VISANDO À OBTENÇÃO DE  
RESISTÊNCIA DO MARACUJAZEIRO-AZEDO  
À VIROSE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS,  
AUXILIADOS POR MARCADORES MOLECULARES**

**KENIA GRACIELLE DA FONSECA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**BRASÍLIA/DF**  
**MARÇO/2008**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**RETROCRUZAMENTOS VISANDO À OBTENÇÃO DE RESISTÊNCIA DO  
MARACUJAZEIRO-AZEDO  
À VIROSE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS, AUXILIADOS POR  
MARCADORES MOLECULARES**

**KENIA GRACIELLE DA FONSECA**

**ORIENTADOR: JOSÉ RICARDO PEIXOTO  
CO-ORIENTADOR: FÁBIO GELAPE FALEIRO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PUBLICAÇÃO: 281/2008**

**BRASÍLIA/DF  
MARÇO/2008**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**RETROCRUZAMENTOS VISANDO À OBTENÇÃO DE RESISTÊNCIA DO  
MARACUJAZEIRO-AZEDO À VIROSE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS,  
AUXILIADOS POR MARCADORES MOLECULARES**

**KENIA GRACIELLE DA FONSECA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE AGRONOMIA E  
MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE  
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE, EM  
CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE DISCIPLINAS DE  
PRODUÇÃO VEGETAL.**

---

**Eng. Agrônomo Fábio Gelape Faleiro, Doutor (Embrapa Cerrados).  
(Co-orientador) CPF: 739.634.706-82. E-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br**

**APROVADO POR:**

---

**Eng. Agrônomo José Ricardo Peixoto, Doutor (Universidade de Brasília – FAV).  
(Orientador) CPF: 354.356.236-34. E-mail: peixoto@unb.br**

---

**Eng. Agrônomo Nilton Tadeu Vilela Junqueira, Doutor (Embrapa Cerrados).  
(Examinador Interno) CPF: 309.620.646-53. E-mail: junqueir@cpac.embrapa.br**

---

**Eng<sup>a</sup>. Agrônoma Marília Santos Silva, PhD (Embrapa Cerrados)  
(Examinadora Externa) CPF: 647.662.171-87. E-mail: marilia@cpac.embrapa.br**

**Brasília/DF, 04 de março de 2008.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Fonseca, Kenia Gracielle.

Retrocruzamentos visando à obtenção de resistência do maracujazeiro-azedo à virose do endurecimento dos frutos, auxiliados por marcadores moleculares. / Kenia Gracielle da Fonseca; orientação de José Ricardo Peixoto. – Brasília, 2008.

82 p. : il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

1. Maracujá-azedo. 2. Doenças. 3. Recuperação do genitor recorrente. I. Peixoto, J.R. II. Doutor

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

FONSECA, K.G. **Retrocruzamentos visando à obtenção de resistência do maracujazeiro-azedo à virose do endurecimento dos frutos, auxiliados por marcadores moleculares.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 82p. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DA AUTORA: Kenia Gracielle da Fonseca

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Retrocruzamentos visando à obtenção de resistência do maracujazeiro-azedo à virose do endurecimento dos frutos, auxiliados por marcadores moleculares.

GRAU: Mestre ANO: 2008

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. A autora reserva-se os outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito da autora.

---

Kenia Gracielle da Fonseca  
CPF: 731.172.261-68  
Condomínio Vivendas Bela Vista H-11  
CEP: 73.070-018 – Distrito Federal – Brasil  
E-mail: kenia.fonseca@cpac.embrapa.br

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, força, conquistas e sucesso;

Ao Professor, Dr. José Ricardo Peixoto pela orientação, amizade e ensinamentos;

Ao Co-orientador, Dr. Fábio Gelape Faleiro pela disponibilidade, profissionalismo, ética, dedicação e enorme contribuição neste trabalho;

Ao Dr. Nilton Tadeu Vilela Junqueira, pela paciência, pelos ensinamentos e pela ajuda;

À Dra. Marília Santos Silva, pela disponibilidade e colaboração neste trabalho;

À Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (FAV-UnB) e a Embrapa Cerrados;

Ao meu pai, pela educação, apoio, pelo seu exemplo de honestidade, humildade, responsabilidade e de dedicação profissional e, sobretudo, pelo amor incondicional;

Aos meus irmãos e também a Arlanza e Karine pelo incentivo e amor;

À família Akimoto pelo carinho;

Às amigas Carolina, Erivanda, Graciele e Keize pela amizade, risos, distrações, conselhos, incentivo e, principalmente, pela colaboração na execução deste trabalho.

Aos amigos que conquistei na Embrapa Cerrados e também aos antigos e novos amigos que sempre torceram por mim: Alex, Angélica, Ana Paula, Babi, Carlinha, Cláudia, Cris, Dalvimar, Dani, Fê, Giovana, Jads, Jeanis, Leomara, Leonice, Lidiane, Luana, Luciana e Tiane;

Ao João Batista pela enorme ajuda na avaliação dos experimentos e principalmente nas atividades do Laboratório, além da sua grande amizade e ao Robson pela ajuda no experimento realizado em casa de vegetação;

Aos pesquisadores da Embrapa Cerrados, Msc. Marcelo Fideles Braga, Msc. Cláudio Karia, Dr. José de Ribamar, Dra. Maria Cristina e aos funcionários pela colaboração

E a todos os familiares e amigos pelo carinho e incentivo.

*Dedico meu trabalho,  
à minha amada mãe Áurea, sempre presente em minha vida;  
ao meu pai Marcos;  
aos meus irmãos, Aurimar e Kesley;  
à minha querida madrinha Ida;  
às pequenas Sarah e Karine  
e a todos familiares e amigos.*

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMO GERAL.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	6
REVISÃO DE LITERATURA.....	10
Botânica do maracujazeiro ( <i>Passiflora</i> sp.).....	10
Doenças.....	13
Virose do endurecimento dos frutos.....	13
Melhoramento genético.....	15
Retrocruzamentos.....	19
O método dos retrocruzamentos utilizado em pesquisas na Embrapa Cerrados..	20
Marcadores moleculares de DNA.....	23
Uso de marcadores moleculares para acelerar a recuperação do genoma recorrente.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
<b>CAPÍTULO 1 - RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES RC DE MARACUJAZEIRO À VIROSE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS.....</b>	<b>36</b>
RESUMO.....	37
ABSTRACT.....	38
INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAL E MÉTODOS.....	41

Avaliação de virose nas plantas RC4.....	41
Obtenção das plantas RC5.....	43
Avaliação de virose nas plantas RC5.....	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
Avaliação dos sintomas de virose nas plantas RC4.....	45
Avaliação dos sintomas de virose nas plantas RC5.....	48
CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

**CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS RC4 E RC5 DE MARACUJAZEIRO-AZEDO E QUANTIFICAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DO GENOMA RECORRENTE POR MEIO DE MARCADORES RAPD.....56**

RESUMO.....	57
ABSTRACT.....	58
INTRODUÇÃO.....	59
MATERIAL E MÉTODOS.....	61
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
Plantas RC4.....	64
Plantas RC5.....	67
Características dos frutos RC4 e RC5.....	71
CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
ANEXOS.....	78



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Recuperação média do genitor recorrente após diversas gerações de retrocruzamentos.....	20
<b>Tabela 1.1-</b> Nota atribuída à cada folha de acordo com o sintoma observado.....	42
<b>Tabela 2.1-</b> Plantas RC4 analisadas.....	62
<b>Tabela 2.2-</b> Plantas RC5 analisadas.....	63
<b>Tabela 2.3-</b> <i>Primers</i> utilizados para obtenção dos marcadores RAPD e respectivos número de bandas polimórficas e monomórficas.....	64
<b>Tabela 2.4-</b> Matriz de similaridade entre 17 plantas RC4 e seus genitores <i>Passiflora edulis</i> e <i>P. setacea</i> , calculadas com base no coeficiente de Nei e Li, utilizando-se 146 marcadores RAPD.....	65
<b>Tabela 2.5-</b> <i>Primers</i> utilizados para obtenção dos marcadores RAPD e respectivos número de bandas polimórficas e monomórficas.....	68
<b>Tabela 2.6-</b> Matriz de similaridade entre 16 plantas RC5 e seus genitores <i>Passiflora edulis</i> e <i>P. setacea</i> , calculadas com base no coeficiente de Nei e Li, utilizando-se 120 marcadores RAPD.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1-** Folhas classificadas de acordo com a escala da tabela 1.1. a = 1, b = nota 2, c = nota 3 e d = nota 4..... 42
- Figura 1.2-** Severidade do vírus do endurecimento dos frutos em plantas RC4, no genitor recorrente (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e no genitor resistente (*Passiflora setacea*). A avaliação foi feita em novembro de 2006, utilizando escala de notas de 1 a 4, sendo 1 = sem sintoma de mosaico; 2 = mosaico leve e sem deformações foliares; 3 = mosaico intenso e sem deformações foliares e 4 = mosaico severo, bolhas e deformações foliares. Para cada planta RC4 foi calculada uma média das 10 folhas avaliadas..... 45
- Figura 1.3-** Severidade do vírus do endurecimento dos frutos em plantas RC4, no genitor recorrente (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e no genitor resistente (*Passiflora setacea*). A avaliação foi feita em janeiro de 2007, utilizando escala de notas de 1 a 4, sendo 1 = sem sintoma de mosaico; 2 = mosaico leve e sem deformações foliares; 3 = mosaico intenso e sem deformações foliares e 4 = mosaico severo, bolhas e deformações foliares. Para cada planta RC4 foi calculada uma média das 10 folhas avaliadas.....47
- Figura 1.4-** Genitor recorrente *P. edulis* f. *flavicarpa* (A) e genitor resistente *P. setacea* (B) evidenciando a suscetibilidade e resistência à virose do endurecimento dos frutos.....47
- Figura 1.5-** Severidade do vírus do endurecimento dos frutos em plantas RC5, no genitor recorrente (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e no genitor resistente (*Passiflora setacea*). A avaliação foi feita em setembro de 2007, utilizando escala de notas de 1 a 4, sendo 1 = sem sintoma de mosaico; 2 = mosaico leve e sem deformações foliares; 3 = mosaico intenso e sem deformações foliares e 4 = mosaico severo, bolhas e deformações foliares. Para cada planta RC5 foi calculada uma média das 10 folhas avaliadas.....50

<b>Figura 1.6-</b> Severidade do vírus do endurecimento dos frutos em plantas RC5, no genitor recorrente ( <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> ) e no genitor resistente ( <i>Passiflora setacea</i> ). A avaliação foi feita em novembro de 2007, utilizando escala de notas de 1 a 4, sendo 1 = sem sintoma de mosaico; 2 = mosaico leve e sem deformações foliares; 3 = mosaico intenso e sem deformações foliares e 4 = mosaico severo, bolhas e deformações foliares. Para cada planta RC5 foi calculada uma média das 10 folhas avaliadas.....	51
<b>Figura 2.1-</b> Análise de agrupamento de 17 plantas RC4 e seus genitores <i>Passiflora edulis</i> e <i>P. setacea</i> , com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 146 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.....	65
<b>Figura 2.2-</b> Dispersão gráfica de 17 plantas RC4 e seus genitores <i>Passiflora edulis</i> e <i>P. setacea</i> com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 146 marcadores RAPD. Os números correspondem aos acessos da Tabela 2.1.....	66
<b>Figura 2.3-</b> Similaridade genética de 17 plantas RC4 e do genitor resistente <i>P. setacea</i> em relação ao genitor recorrente <i>P. edulis</i> GA-2.....	67
<b>Figura 2.4-</b> Análise de agrupamento de 16 plantas RC5 e seus genitores <i>Passiflora edulis</i> e <i>P. setacea</i> , com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 120 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.....	69
<b>Figura 2.5-</b> Dispersão gráfica de 16 plantas RC5 e seus genitores <i>Passiflora edulis</i> e <i>P. setacea</i> com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 120 marcadores RAPD. Os números correspondem aos acessos da Tabela 2.2.....	70
<b>Figura 2.6-</b> Similaridade genética de 16 plantas RC5 e do genitor resistente <i>P. setacea</i> em relação ao genitor recorrente <i>P. edulis</i> GA-2.....	70

**Figura 2.7-** Flor e frutos de um híbrido RC5 de *P. edulis* f. *flavicarpa* x *P. setacea*..... 72

**Figura 2.8-** Semelhança do formato e cor das flores de um híbrido RC5 (a) e *P.edulis* (b)..... 72

## RETROCRUZAMENTOS VISANDO À OBTENÇÃO DE RESISTÊNCIA DO MARACUJAZEIRO-AZEDO À VIROSE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS, AUXILIADOS POR MARCADORES MOLECULARES

**Resumo Geral** – O Brasil tem se destacado na produção de maracujá, entretanto, a produtividade média está muito abaixo do potencial da cultura. Um dos motivos da baixa produtividade são os problemas fitossanitários, que comprometem a produção e qualidade dos frutos. Para contornar estes problemas, programas de melhoramento genético têm sido realizados por meio de cruzamentos intra e interespecíficos entre genótipos comerciais e genótipos selvagens que, em geral, apresentam resistência a doenças. Objetivou-se, neste trabalho, obter, avaliar e caracterizar plantas da quarta e quinta geração de retrocruzamentos (RC4 e RC5, respectivamente) originadas do cruzamento base interespecífico das espécies *P. edulis* e *P. setacea*, quanto à virose do endurecimento dos frutos e quanto à recuperação do genoma recorrente com base em marcadores *Randon Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). O trabalho foi realizado na Embrapa Cerrados. Em condições de campo, coletou-se aleatoriamente, dez folhas de cada planta RC4 e RC5 e também de três plantas de cada genitor (*P. setacea* e *P. edulis*) em épocas diferentes, para avaliação da severidade da virose. De acordo com uma escala visual de notas, classificou-as em resistentes, medianamente susceptíveis, susceptíveis e altamente susceptíveis. Foi realizada uma inoculação mecânica em condições controladas e avaliou-se a manifestação de sintomas dessa doença em 60 plantas RC5 e seus genitores. Verificou-se a resistência das plantas *P. setacea* e a susceptibilidade das plantas RC e da espécie *P. edulis*. Para a caracterização de plantas RC4 e RC5 e da recuperação do genoma recorrente com base em marcadores RAPD, selecionou-se 17 plantas RC4 e 16 plantas RC5 com base na resistência à virose (avaliado como supramencionado). Utilizou-se também folhas de três plantas *P. setacea* e *P. edulis*. Amostras de DNA de cada material genético foram amplificadas para obtenção de marcadores RAPD. A maior distância genética foi observada entre os dois genitores (*P. edulis* e *P. setacea*), verificando-se uma grande porcentagem de polimorfismos. As plantas RC5 apresentaram maior recuperação do genitor recorrente e maior distância genética do genitor resistente quando comparadas com as plantas RC4. Entre as plantas RC4 e RC5, foram selecionadas aquelas com maior resistência à virose e mais próximas geneticamente do genitor recorrente para fornecer pólen para as sucessivas gerações, diminuindo, dessa forma, o tempo gasto para a recuperação do genoma recorrente.

**Palavras-chave:** *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, *P. setacea*, vírus do endurecimento dos frutos, genoma recorrente.

## **BACKCROSSING AIMING THE RESISTANCE OF SOUR PASSION FRUIT TO WOODINESS PASSION FRUIT VIRUSIS RESISTANCE ASSISTED BY MOLECULAR MARKERS**

**Overall Abstract** - Brazil is an exponent in passion fruit production, however, the average productivity is quite below its potential. Among the reasons for low productivity are the phytosanitary problems, that compromise the production and the quality of the fruit. Breeding programs that use intra and interspecific crossings have been conducted to overcome these problems. The objective of the present work is to obtain, evaluate and characterize plants of the fourth and fifth backcrossing generation (RC4 and RC5, respectively) originated from the base interspecific crossing between species *Passiflora setacea* and *P. edulis*) regarding the woodiness virus disease and the recovery of recurrent genome based on *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) markers. The experiment was carried out at Embrapa Cerrados. Ten leaves per RC4 and RC5 plant and three plants per genitor (*P. setacea* and *P. edulis*) were randomly collected, at different time points, for evaluation of virus symptoms. They were classified into highly resistant, resistant, susceptible and highly susceptible, according to a visual scale of grades. Artificial inoculation was held under controlled conditions and the incidence of this disease in 60 plants RC5 and their genitors was evaluated. The resistance of *P.setacea* and the susceptibility of RC plants and *P.edulis* species were verified. To characterize RC4 and RC5 plants and the recover of the recurrent genome based on RAPD markers, 17 RC4 plants and 16 RC5 plants were collected, based on virusis resistance (evaluation as before mentioned). Leaves of three *P. setacea* and *P. edulis* plants were also used. DNA samples of each genetic material was amplified to obtain RAPD markers. The greatest genetic distance was observed between the two genitors (*P. edulis* and *P. setacea*), with a large percentage of polymorphisms. RC5 plants showed greater recovery of the recurrent genitor and greater genetic distance to the resistant genitor when compared with RC4 plants. Among RC4 and RC5 plants were selected those with greater resistance to virusis and genetically closer to the recurrent genitor to provide pollen for successive generations, in order to decrease the time spent on the recurrent genome recovery.

Keywords: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, *P. setacea*, wood, recurrent genome.

## INTRODUÇÃO GERAL

Maracujá é uma palavra de origem tupi, que significa “alimento em forma de cuia”. O maracujazeiro é originário da América Tropical e apresenta grande variabilidade inter e intra-específica, porém os cultivos comerciais são principalmente da espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, conhecida como maracujá-amarelo ou azedo (Meletti & Maia, 1999).

O maracujá, conhecido também por flor-da-paixão como referência da sua flor com a paixão de Jesus Cristo (Vanderplank, 1996), pertence à Ordem *Passiflorales*, Tribo *Passiflorae* e família *Passifloraceae* (Cunha et al., 2004). A quantidade de espécies dessa família ainda é muito discutida. Segundo Cunha et al. (2002), há uma estimativa de que o gênero *Passiflora* seja composto de 465 espécies, das quais de 150 a 200 são originárias do Brasil e podem ser utilizadas como alimento, remédio e ornamento. Cerca de 70 espécies produzem frutos comestíveis.

No Brasil, as espécies com maior expressão comercial são a *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (maracujá-amarelo ou azedo), a *Passiflora edulis* (maracujá-roxo) e a *Passiflora alata* (maracujá-doce). O maracujá-azedo é o mais conhecido, cultivado e comercializado devido à qualidade de seus frutos e ao seu maior rendimento industrial. O maracujá-roxo é muito apreciado na Austrália e na África do Sul, sendo usado para fazer suco ou consumido como fruta fresca. O maracujá-doce tem sua produção e comercialização limitada pela falta de hábito de consumo e pelo desconhecimento pela maioria da população. Ao contrário do maracujá-azedo, o maracujá-doce é consumido exclusivamente como fruta fresca (Souza & Melletti, 1997; Faleiro et al., 2005).

Seu uso comercial é definido não apenas pelos seus frutos para fabricação de bebidas e sucos, mas também apresentam potencial de exploração da diversidade genética em relação ao comportamento quanto à resistência, tolerância ou suscetibilidade às pragas, doenças e nematóides (exploração como porta-enxerto), além do potencial uso como ornamental e no atendimento às indústrias de fitoterápicos (Vasconcellos et al., 2005).

A utilização do maracujá como planta medicinal faz parte da cultura de povos americanos, europeus e asiáticos. Espécies comerciais e silvestres integram o repertório etnofarmacológico que recomenda folhas, flores, raízes e frutos para combater as mais diferentes enfermidades, do controle de verminoses ao tratamento de tumores gástricos.

Contudo, a fama do maracujá vem da ação benéfica sobre o sistema nervoso, sendo indicado, principalmente, no combate à ansiedade, à depressão e à insônia (Matos, 2002; Dhawan et al., 2004; Costa & Tupinambá, 2005).

As variedades comerciais de maracujá são ricas em alcalóides, flavonóides e carotenóides, minerais e vitaminas A e C, substâncias responsáveis pelo efeito funcional em vários alimentos (Casimir et al., 1981; Suntornsuk et al., 2002; Dhawan et al., 2004; Costa & Tupinambá, 2005).

Na Europa e nos Estados Unidos, é comum a destinação de maracujazeiro para ornamentação, como por exemplo, a *Passiflora caerulea* (Braga et al., 2006). No Brasil, híbridos com elevado potencial ornamental, obtidos a partir do cruzamento entre a *P. coccinea* x *P. setacea*, foram lançados em 2007 pela Embrapa Cerrados. As belas flores do maracujazeiro conferem o valor ornamental, que exercem atração pelo seu tamanho, pela exuberância das cores e singularidade das formas. Muitas espécies de *Passiflora* que não produzem frutos comestíveis chamam atenção pelo efeito decorativo e podem ser utilizadas em cercas vivas, caramanchões e alambrados (Faleiro et al., 2005; Peixoto, 2005).

A produção mundial de maracujá é de 640 mil toneladas e a brasileira próxima de 75% deste valor. Apesar dessa produção, o volume de fruta fresca e suco exportado pelo Brasil é pequeno quando comparado com outras frutas. Além do Brasil, o maracujá é amplamente produzido no Equador, Colômbia, Peru, África do Sul e Austrália. A África do Sul e Austrália produzem, principalmente, o maracujá roxo (*P. edulis* Simmonds) que é consumido *in natura*. Atualmente, o Equador é o maior exportador de suco concentrado (50° Brix), exportando, em 2006, em torno de 170 mil toneladas (ITI Tropicals, 2007).

O Brasil, que é o maior produtor e o maior consumidor mundial da fruta, ainda não produz excedentes exportáveis significativos, sendo inclusive eventual importador de países sul americanos (Pires & Mata, 2004). O maracujá produzido no Brasil tem sido exportado para países europeus e latino americanos, embora de forma incipiente. Na tentativa de mudar esse cenário, em 2005, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabeleceu e aprovou a Instrução Normativa Nº 3 sobre as Normas Técnicas específicas para a Produção Integrada de Maracujá (PIF-Maracujá) com o objetivo principal de elevar os padrões de qualidade e de competitividade da fruticultura brasileira ao patamar de excelência requerido pelo mercado internacional, em bases voltadas para o sistema integrado de produção, sustentabilidade do processo, expansão da produção, do emprego e da renda (Andrigueto et al., 2005).



Segundo Lima (2001), o agronegócio do maracujá no Brasil gera R\$ 500 milhões por ano, emprega 250.000 pessoas e pode gerar de 5 a 6 empregos diretos e indiretos por hectare durante 2 anos, com apenas R\$ 12.000,00 de investimentos, fazendo com que tal cultura seja uma excelente alternativa para a agricultura familiar. A alta demanda de mão-de-obra vem da colheita processada manualmente e sua periodicidade semanal, além disso, há também geração de emprego na indústria e nos setores de comercialização, pois o suco de maracujá é o terceiro mais produzido no Brasil (Aguiar & Santos, 2001).

A produção de maracujá vem ganhando grande importância econômica no Brasil, principalmente nas últimas três décadas. Antigamente, ocorriam, com frequência, ciclos de retração e expansão da área cultivada devido à falta de demanda dessa fruta (Rizzi et al., 1998) e o País nem mesmo constava entre os principais produtores (Ruggiero et al., 1996).

A melhoria do desempenho da cadeia produtiva de maracujá deverá passar pela ampliação e conquista de novos mercados, pela melhoria da produtividade e da qualidade dos produtos e pela redução do custo de produção (Aguiar & Santos, 2001).

Nos últimos anos, o Brasil lidera a produção mundial dessa fruta que começou a crescer a partir de 1986, com a ampliação significativa na área cultivada e na produção, acompanhada pelo consumo devido ao estímulo no mercado do produto industrializado provocado pelas indústrias extratoras de suco (Meletti & Maia, 1999).

A década de 90 foi marcada pela valorização do preço da fruta fresca e a modificação do hábito de consumo: por um longo período, cerca de 30% da produção era destinada ao mercado de fruta fresca e 70% para a indústria de sucos. Atualmente, a situação está quase invertida e mais da metade da produção nacional destina-se ao mercado interno de frutas frescas (Silva, 1998).

Em 2004, a produção de maracujá atingiu 491.619 toneladas. Os estados da Bahia, Espírito Santo, São Paulo, Minas Gerais e Sergipe foram os maiores produtores dessa fruta nesse mesmo ano, produzindo 114.627 t, 81.180 t, 46.917 t, 45.477 t e 40.056 t, respectivamente. O Distrito Federal contribuiu com apenas 1.867 t, correspondendo a 0,38 % da produção brasileira (Agrianual, 2007).

Assim como a maior produção, o Nordeste também apresentou a maior porcentagem da área colhida brasileira, equivalente a 47,73% dessa área. A Bahia foi o Estado que mais contribuiu em área (8.895 ha) como também em produção, seguido do Pará (4.187ha), Sergipe (4.181 ha), Espírito Santo (3.243 ha) e Minas Gerais (3.147 ha), sendo que o DF apresentou uma área colhida de 122 ha (Agrianual, 2007).

Segundo Ruggiero et al. (1996), o potencial da produtividade de maracujá é de 35-40 t/ha/ano, mas têm sido alcançadas somente 15 a 20 t/ha/ano. Vários fatores são limitantes ao aumento da qualidade e da produtividade dos pomares, sendo os principais: o cultivo de variedades ou linhagens inadequadas, mudas de baixa qualidade ou contaminadas com doenças, ausências de irrigação nas regiões sujeitas a déficit hídrico, adubações inadequadas ou ausentes, falta de correção da acidez potencial do solo, ausência da polinização manual e falta de manejo de pragas e doenças (Junqueira et al., 1999).

Algumas doenças podem ocorrer com maior frequência na cultura, dentre elas, (i) doenças do sistema radicular como morte prematura de plantas ou morte precoce ou morte súbita e podridão do colo; (ii) doenças da parte aérea como bacteriose, antracnose, verrugose, septoriose, viroses, entre outras (Oliveira & Ruggiero, 1998).

Dentre as doenças, as viroses assumem grande importância. A virose do endurecimento dos frutos, causada por *Potyvirus*, já foi relatada no Brasil nos principais Estados produtores de maracujá, incluindo Bahia (Chagas et al., 1981), Ceará (Lima et al., 1985; Bezerra et al., 1995), Minas Gerais (Costa, 1996) e São Paulo (Chagas et al., 1992). Os *Potyvirus* são transmitidos por afídeos, de maneira não-persistente e não-circulativa. As proteínas virais HC-Pro e capa protéica, em geral, são requeridas para transmissão por afídeos (Van Regenmortel et al., 2000). Plantas infectadas apresentam mosaico e frutos com endurecimento do pericarpo e grande redução da polpa (Kitajima et al., 1986). Não existe controle curativo, por isso, medidas de exclusão têm sido ineficientes para evitar a disseminação do vírus (Meletti et al., 2005).

O desenvolvimento de cultivares com resistência a doenças é uma alternativa premente e interessante para essa cultura porque envolve medidas de segurança para o trabalhador agrícola e consumidor, preservação do ambiente, redução de custos de produção, qualidade mercadológica, entre outros, sendo uma demanda atual para as pesquisas em maracujazeiro (Faleiro et al., 2005).

O uso de espécies silvestres tem mostrado grande potencial para o melhoramento genético do maracujazeiro, principalmente como fontes de resistência a doenças. Em pesquisas em andamento na Embrapa Cerrados, tem-se verificado que, por meio de cruzamentos artificiais, podem ser obtidos híbridos férteis e promissores para o melhoramento. *P. setacea*, *P. coccinea* e *P. grandulosa* apresentam compatibilidade genética com *P. edulis*, quando utilizadas como genitor masculino ou feminino, e *P. caerulea* quando utilizada como genitor masculino. O método dos retrocruzamentos tem sido muito utilizado para incorporação de genes de resistência em variedades comerciais

(Junqueira et al., 2005). A eficiência dos programas de retrocruzamentos pode ser maximizada com o uso de marcadores moleculares, aumentando a probabilidade de conversão dos indivíduos e reduzindo o tempo requerido para obter uma recuperação aceitável do progenitor recorrente (Borém, 1997).

Neste trabalho, objetivou-se obter e caracterizar plantas RC4 e RC5 quanto à resistência a virose do endurecimento dos frutos e quanto à recuperação do genoma recorrente com base em marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL, 2007: **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria, 2007. p. 389-394.

AGUIAR, D. R.D.; SANTOS, C.C.F. Importância econômica e mercado. In: BRUCKNER, C.H.; PIÇANHA, M.C. (Ed.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. cap.1, p. 9-32.

ANDRIGUETO, J.R.; KOSOSKI, A.R.; OLIVEIRA, D.A. Maracujá no contexto do desenvolvimento e conquistas da produção integrada de frutas no Brasil. In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 509-556.

BRAGA, M.F.; SILVA, J.R.S.; RUGGIERO, C.; BARROS, A.M.; VASCONCELOS, M.A.S.; BATISTA, A.D.; DUTRA, G.A.P.; PEIXOTO, M. Demandas para as pesquisas visando à exploração diversificada. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: demandas para a pesquisa**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. p. 37-40.

BEZERRA, D.R.; LIMA, J.A.A. & XAVIER FILHO, J. Purificação e caracterização de um isolado cearense do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro. **Fitopatologia Brasileira** 20: 553-560. 1995.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 1997. 547 p.

CASIMIR, D.; KEFFOR, J.; WHITFIELD, F. Technology and flavor, chemistry of passion fruit juices and concentrates. **Advances in Food Research**, v. 27, p. 243-295, 1981.

CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W. & LIN, M.T. Grave moléstia em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Estado da Bahia causada por um isolado do vírus “woodiness” do maracujá. **Fitopatologia Brasileira** 6: 259-268. 1981.

CHAGAS, C.M.; REZENDE, J.A.M.; COLARICCIO, A.; PIZA Jr., C.T.; LOPES, L.C.; FERRARI J.T. & BELLUZI, B.M. Ocorrência do endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura** 14: 187-190. 1992.

COSTA, A.F. **Comportamento de Passiflora spp. diante do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro e a relação entre a nutrição mineral e a interação vírus-Passiflora edulis f. flavicarpa**. Tese D.S., Dep. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, MG. 1996.

COSTA, A.M. e TUPINAMBÁ, D.D. O maracujá e suas propriedades medicinais – estado da arte. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 475-506.

CUNHA, M.A.P., BARBOSA, L.V., FARIA, G.A. Botânica. In: LIMA, A.A e CUNHA, M.A.P. **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 396 p.

CUNHA, M.A.P.; BARBOSA, L.V.; JUNQUEIRA, N.T.V. Espécies de maracujazeiro. In: LIMA, A.A. (Ed.). **Maracujá Produção: aspectos técnicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 104 p. (Embrapa Informação Tecnológica. Frutas do Brasil; 15).

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. Passiflora a review apdate. **Journal of Ethno-pharmacology**, v. 94, p. 1-23, 2004.

FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – Desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 187-210.

ITI Tropicals. Disponível em: <[www.passionfruitjuice.com](http://www.passionfruitjuice.com)> Acesso em 24 de agosto de 2007.

JUQUEIRA, N.T.V.; ANJOS, J.R.N. dos; SHARMA, R.D.; SANZONWICZ, C.; ANDRADE, L.R.M.de. Doenças do Maracujazeiro. In: Encontro de Fitopatologia, 3., 1999, viçosa, MG. **Doenças de Fruteiras Tropicais**. Palestras. Viçosa:UFV, 1999. p. 83-115.

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; BERNACCI, L.C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 341-358.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M. & CRESTANI, O.A. Enfermidades de etiologia viral e associados e organismos do tipo micoplasma em maracujazeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira** 11: 409-432. 1986.

LIMA, J.A.A.; SANTOS, C.D.G. & KITAJIMA, E.W. Isolamento de um potyvírus de plantas de maracujá com sintomas de mosaico. **Fitopatologia Brasileira** 10: 305. 1985 (Resumo).

LIMA, M.M. **Competitividade da cadeia produtiva do maracujá na região integrada de desenvolvimento do Distrito Federal e Entorno-Ride**. 2001. 171p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2001.

MATOS, F. J. A. **Farmácia Vivas**. 4. ed. Fortaleza: Editora UFC, 2002. 267 p.

MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R.S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p 55-78.

MELETTI, L.M.M. e MAIA, M.L. **Maracujá: Produção e comercialização.** Boletim técnico, 181. Campinas, Instituto Agrônômico, 1999, 64 p.

OLIVEIRA, J. C. de & RUGGIERO, C. **Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo.** In: RUGGIERO, C. 50 SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 10-13 de fevereiro, 1998, Jaboticabal. Anais. Jaboticabal: Funep, 1998. 388 p.

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 457-463.

PIRES, M.M.e MATA, H.T.C. Uma abordagem econômica e mercadológica para a cultura do maracujá no Brasil. In: LIMA, A.A e CUNHA, M.A.P. **Maracujá: produção e qualidade na passicultura.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 325-343.

RIZZI, L.C.; RABELLO, L.A.; MOROZINI FILHO, W.; SAVASAKI,E.T.; KAVATI, R. **Cultura do maracujá azedo.** Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, SAA, 1998. 23 p. (Boletim Técnico, 235).

RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A.R.; VOLPE, C.A.; OLIVEIRA, J.C. de; DURIGAN, J.F.; BAUMGARTNER, J.G.; SILVA, J.R.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, M.E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V. de P. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção.** Brasília, MAARA, Secretaria de Desenvolvimento Rural, Embrapa-SPI, 1996. 64p. (Série Publicações Técnicas FRUPEX, 19).

SILVA, J.R..da. Situação da cultura do maracujazeiro na Região Central do Brasil. In: RUGGIERO, C. (coord.) SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, 5., 1998, Jaboticabal. **Anais.** Jaboticabal, FUNEP: 1998. p. 18-19.

SOUZA, J.S.I.; MELETTI, L.M.M. **Maracujá: espécies, variedade, cultivo.** Piracicaba: FEALQ, 1997. 179 p.

SUNTORNUSUK, L.; GRITSANAPUN, W.; NILKAMHANK, S.; PAOCHOM, A. Quantitation of vitamin C content in herbal juice using direct titration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 849-855, 2002.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**, 2.ed. Cambridge: The MIT Press, 1996. 224 p.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; McGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. **Seventh Report of the Internacional Committee on taxonomy of viruses.** Academic Press, 2000. 1162 p.

VASCONCELLOS, M.A.S.; SILVA A.C.; SILVA, A.C.; REIS, F.O. **Ecofisiologia do maracujazeiro e implicações na exploração diversificada.** In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 295-313.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Botânica do maracujazeiro (*Passiflora* sp.)

O maracujazeiro é uma planta trepadeira, robusta, sub-lenhosa, glabra de caule cilíndrico, vigoroso, podendo atingir 5 a 10 m de comprimento (Ruggiero et al., 1996; Cunha et al., 2004a).

O sistema radicular é pivotante, ou seja, com uma raiz central mais grossa que as demais. A maioria das raízes finas se concentra nos primeiros 50 cm de profundidade. O solo, então, deve ser permeável, capaz de proporcionar uma adequada distribuição das raízes e evitar o encharcamento, fatal para a planta, e ainda permitir melhor fixação em áreas sujeitas a ventos (Meletti & Maia, 1999).

O caule na região basal é lenhoso, tornando-se menos lenhoso em direção ao ápice da planta. É circular em *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá amarelo), mas pode apresentar secção transversal quadrada em outras espécies, como *P. alata* (maracujá doce) e *P. quadrangularis* (Urashima, 1985; Ruggiero et al., 1996).

As folhas do maracujazeiro-azedo são simples, alternadas, com formas variadas (lobadas, digitadas, elípticas, ovadas, serreadas, lisas, glandulosas e subcoreáceas). As folhas jovens apresentam-se ovadas sem lobos. Na sua base elas apresentam brácteas foliáceas bem desenvolvidas e gavinhas. Em condições ideais, as folhas do maracujazeiro são permanentes, porém, uma vez que haja estresse hídrico, pragas ou doenças, assim como ventos fortes e geadas, as folhas tendem a cair e voltam a brotar no início do ciclo seguinte da cultura (Leitão Filho & Aranha, 1974; Urashima, 1985; Silva & São José, 1994; Manica, 1997; Kudo, 2004).

Os pecíolos, normalmente, são providos de glândulas nectaríferas, variando em número, forma e tamanho, podendo também não ter estas estruturas. As gavinhas, modificações foliares, que servem para prender a planta a suportes, são freqüentemente solitárias nas axilas das folhas (Cunha et al., 2004a).

As flores são hermafroditas, actinomorfas, geralmente isoladas ou aos pares nas axilas das folhas, mais raramente em inflorescências racemosas, pseudoracemosas ou até fasciculadas. O tubo floral pode ter diversas formas: bacia, taça e campânula, sendo geralmente verde naquelas de tubo bem desenvolvido. As sépalas são em número de cinco, carnosas ou membranáceas, lineares, comumente providas de uma quilha dorsal e



aristadas. As pétalas, normalmente, são formadas no tubo calicinal, alternadamente com as sépalas, geralmente menores e a textura mais delgada que as sépalas podendo ocorrer nas cores verde, branca, amarelada ou fortemente coloridas (Vanderplank, 1996; Cunha et al., 2004a). O maracujazeiro geralmente produz flores auto-incompatíveis, isto é, o pólen produzido em determinada flor não pode fecundá-la e nem pode fecundar, de forma eficaz, as demais flores produzidas na mesma planta (Junqueira et al., 2001).

A polinização natural do maracujazeiro, geralmente, é feita por mamangavas, abelhas do gênero *Xylocopa* que, devido ao seu grande porte, ao visitarem a flor do maracujazeiro, encostam seu dorso nos estames onde estão os grãos de pólen, fazendo a retirada dos mesmos e levando-os para o estigma, efetuando dessa maneira a polinização. Nesse caso, o percentual de vingamento dos frutos vai depender do número de mamangavas presentes no pomar e da frequência das aplicações de inseticidas agrícolas. O efeito positivo da polinização manual no vingamento de frutos de maracujazeiro tem sido relatado por vários autores alcançando, por exemplo, 76% de vingamento em flores cruzadas e polinizadas manualmente e apenas 7 % com a polinização natural (Junqueira et al., 2001; Lima & Cunha, 2004).

A abertura das flores ocorre de meio-dia até a noite, no maracujá amarelo e pela manhã, no roxo. O melhor tempo para a polinização é quando o estilete curva-se totalmente após a antese (Akamine & Girolami, 1959; Cunha et al., 2004b).

A auto-incompatibilidade é uma característica importante da biologia floral encontrada em maracujazeiro-amarelo (Knight Júnior & Winters, 1962; Akamine & Girolami, 1959; Faleiro et al., 2005a). É um mecanismo que determina a alogamia, pois impede que plantas produtoras de gametas masculinos e femininos funcionais produzam sementes quando autopolinizadas. Autofecundações e algumas hibridações podem ser inviáveis devido à presença de auto-incompatibilidade, que é muito freqüente na natureza. Nas espécies cultivadas, ela se torna menos freqüente, em razão da pressão de seleção contrária causada pela domesticação (Mather, 1953; Rowlands, 1964; Nettancourt, 1977; Bruckner et al., 2005).

A incompatibilidade pode ser gametofítica, quando o grão de pólen carrega um alelo também presente no estigma e que inibe o desenvolvimento do tubo polínico, e esporofítica determinada pelo grão de pólen, o qual reage com a superfície do estigma e não germina em cruzamentos incompatíveis (Duvick, 1967). Bruckner (1994) estabeleceu que a auto-incompatibilidade do maracujazeiro é do tipo homomórfica esporofítica. Homomórfica porque a auto-incompatibilidade não é baseada em diferenças morfológicas

entre as estruturas florais e esporofítica porque é determinada pelo cultivares da planta que produziu o grão de pólen, que é diplóide, ocorrendo a reação na superfície estigmática, resultando na inibição da germinação do grão de pólen (Lewis, 1954; Brewbacker, 1957; Nettancourt, 1977).

O fruto do maracujazeiro-azedo é uma baga de forma oval ou subglobosa, com grande variação em tamanho e coloração de polpa. Possui, em média, 6 a 8 cm de comprimento, 5 a 7 cm de largura, 44 a 160 gramas de peso e de 200 a 300 sementes. Apresenta casca coriácea e de coloração amarela intensa no final do amadurecimento. É um fruto carnoso, com sementes recobertas pelo arilo, o qual contém um suco amarelo-alaranjado, bastante aromático e nutritivo (Cunha et al., 2004a; Meletti & Maia, 1999).

O suco possui de 13 a 18 % de sólidos solúveis totais, cujo principais componentes são os açúcares (sacarose, glicose e frutose) e alta acidez, conferida predominantemente pelo ácido cítrico (Durigan, 1998; Melletti & Maia, 1999).

Sua composição nutritiva, calculada por 100 g de polpa fresca, corresponde a 30 mg de vitamina C; cerca de 700 U.I. de vitamina A; 1,63 mg de vitaminas do complexo B; 13 mg de cálcio; 17 mg de fósforo; 1,6 mg de ferro; 2,2 g de proteínas e 21,2 g de carboidratos (Chitarra e Chitarra, 1990; Meletti & Maia, 1999).

No Brasil, a propagação do maracujazeiro-amarelo é feita basicamente por meio de sementes, havendo, portanto, segregação e existência de indivíduos diferentes (Stenzel & Carvalho, 1992). A elevada heterozigose existente nessa espécie determina alta variabilidade, decorrendo, por isso, a desuniformidade de plantas nos pomares. Desse modo, a propagação vegetativa apresenta vantagens na manutenção de material com boas características agrônômicas, favorecendo a multiplicação de plantas produtivas e tolerantes a pragas e a doenças (Lima et al., 1999).

O Brasil apresenta excelentes condições para o cultivo do maracujazeiro pelo fato dessa planta 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, de acordo com Lima & Borges (2004).

## **Doenças**

Problemas fitossanitários, devido à falta de cuidados necessários a cultura durante a expansão da área cultivada, podem contribuir para um ciclo econômico mais curto que muitas vezes inviabiliza o cultivo em determinadas regiões (Filho & Junqueira, 2003).

No Brasil, as doenças e pragas constituem-se nos principais fatores que ameaçam a expansão e diminuem a produtividade dos cultivos de maracujá-azedo e maracujá-doce, provocando prejuízos expressivos e preceituando os produtores a usarem defensivos agrícolas de forma indiscriminada. Em algumas regiões do país, doenças como a bacteriose (causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*), murcha de fusário (causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae*), virose do endurecimento dos frutos (causada por *Passionfruit Woodiness Virus* - PWV ou *Cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV), a antracnose (causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*) têm sido limitantes. Essas doenças, favorecidas por condições edafo-climáticas favoráveis, não podem ser controladas de forma eficaz pelos métodos curativos (Junqueira et al. 2006).

### **Virose do endurecimento dos frutos**

A virose do endurecimento dos frutos é uma das doenças mais importantes da cultura do maracujazeiro (Kitajima et al., 1986; Rezende, 1994). Foi constatada pela primeira vez em plantios comerciais de maracujá amarelo e doce, no Estado da Bahia, no final da década de 70 (Chagas et al., 1981; Yamashiro & Chagas, 1979). Posteriormente, foi detectada em quase todos os Estados do Brasil (Barbosa & Filho, 2003). A distribuição geográfica dessa virose inclui também a Austrália, Suriname, Formosa, África do Sul, Sumatra, Quênia e Inglaterra (Kitajima et al., 1986).

Há relatos de pelo menos nove espécies de vírus infectando o maracujazeiro em condições naturais, dos quais, cinco foram relatados no Brasil: o vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (*Passion fruit woodiness potyvirus* – PWV), o vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic cucumovirus* – CMV); o vírus do mosaico amarelo do maracujazeiro (*Passion fruit yellow mosaic tymovirus* - PFYMV); o vírus do mosaico do maracujá-roxo (*Purple Granadilla mosaic virus* – GMV) e o vírus do enfezamento do maracujazeiro (*Passion fruit vein-clearing rhabdovirus* – PFVVCV). Desses, o mais disseminado é o PWV, tendo sido relatado na Bahia, no Ceará, no Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Pará, Pernambuco, São Paulo e Sergipe (São José et al., 1994; Bezerra et al.,

1995; Inoue et al., 1995 citados por Anjos et al., 2001). Observou-se, em experimentos, que a virose do endurecimento dos frutos pode causar perdas de 50% a 80% no rendimento do maracujá (Anjos et al., 2001).

A denominação da doença “endurecimento dos frutos do maracujazeiro”, causada pelo PWV ou CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*), advém do sintoma do endurecimento dos frutos. Porém, esse sintoma pode ser causado também por CMV (Rybicki & Pietersen, 1999; McKern et al., 1994 citados por Anjos et al., 2001).

Até o início da década de 90, acreditava-se que a única espécie de *potyvirus* causadora do endurecimento dos frutos em maracujazeiro era o PWV. Entretanto, estudos recentes demonstraram que na África do Sul, a doença é causada por uma estirpe do CABMV (McKern et al., 1994; Sithole-Niang et al., 1996 citados por Nascimento et al., 2006).

Estudos recentes, com base em análises comparativas da seqüência de nucleotídeos do gene que codifica a proteína da capa protéica, apontaram homologia de aproximadamente 70 % de alguns isolados do PWV do Brasil com o PWV da Austrália. Por outro lado, comparando-se os isolados brasileiros do PWV com o CABMV e o SAPV (*South African passiflora virus*), encontrou-se homologia de 85% no mesmo gene, de acordo com Santana et al. (1999), citado por Novaes (2002). Considerando-se que valores de homologia desse gene iguais ou superiores a 85% agrupam os isolados em um mesmo gênero *Potyvirus*. Ambos os vírus pertencem ao gênero *Potyvirus* da família Potyviridae. Os *potyvirus*, como PWV e CABMV, possuem partícula alongada e flexuosa, com 690-760 nm de comprimento por 11-16 nm de largura. O genoma é constituído por um RNA de fita simples, sentido positivo, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos (Van Regenmortel et al., 2000).

Por meio de análise molecular, Zerbini & Maciel-Zambolim (1999) mostraram que alguns isolados de vírus que causavam o endurecimento dos frutos do maracujazeiro dos principais estados produtores do Brasil, pertenciam à espécie CABMV.

Nascimento et al. (2006) também comprovou através de caracterização molecular a identidade de alguns isolados, coletados em Pernambuco, Paraíba e Recife, como sendo estirpes do CABMV, podendo ser considerado como a principal espécie de *potyvirus* causadora de endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Brasil.

O sintoma de endurecimento dos frutos possui valor diagnóstico limitado, uma vez que também pode ser causado por CMV, fatores nutricionais e injúrias produzidas por insetos (Kimati et al., 1997).

Plantas de maracujazeiro infectadas pelo PWV ou CABMV apresentam mosaico e deformação foliar e produzem frutos pequenos, deformados e com endurecimento do pericarpo. A produtividade e o ciclo da cultura são reduzidos. Tanto o PWV quanto o CABMV são transmitidos de maneira não circulativa por várias espécies de afídeos, além de serem facilmente transmitidos mecanicamente via extrato foliar tamponado e por enxertia. Esses vírus infectam naturalmente espécies de *Passiflora* e de leguminosas, além de infectarem artificialmente alguns membros das famílias *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Solanaceae* e *Cucurbitaceae* (Taylor & Greber, 1973; Mckern et al., 1994 citado por Zerbini et al., 2005).

O complexo PWV/CABMV e CMV com efeito sinérgico provoca intenso nanismo e amarelecimento das plantas, acompanhados de queda de folhas e necrose do topo. Nas células, pode-se observar inclusões lamelares (na configuração de cata-vento) induzidas pelo PWV/CABMV, típicas dos potyvirus (Kimati et al., 1997).

Como não existe controle curativo, as recomendações técnicas têm sido relativas a medidas de exclusão, evitando-se a disseminação do vírus por áreas indenes ou convivência com o PWV/CABMV nas áreas medianamente afetadas. Áreas bastante afetadas são condenadas, muitas vezes, com as plantas eliminadas sumariamente antes mesmo do início da primeira safra, o que representa prejuízo total ao produtor (Meletti et al., 2005).

A técnica da pré-imunização não se mostrou viável para o maracujazeiro. Plantas pré-imunizadas são facilmente infectadas em condições de campo por estirpes mais virulentas (Meletti et al., 2005).

Na Austrália, o controle do PWV tem sido feito mediante uso de híbridos de maracujá-amarelo e roxo que parecem ser mais tolerantes. O uso de estirpes fracas na pré-imunização produziu bons resultados apenas por algum tempo, pois essa política de convivência com o vírus aparentemente permitiu o surgimento de estirpes mais severas, capazes de prejudicar até mesmo esses híbridos (Meletti & Brückner, 2001).

### **Melhoramento genético**

O melhoramento genético de plantas tem sido praticado com sucesso desde os primórdios da civilização. O progresso no melhoramento tem se baseado, em geral, na análise de fenótipos. O sucesso desta análise, entre outros fatores, depende da herdabilidade do caráter. Heranças poligênicas, dominâncias parciais ou completas, a

influência do ambiente e o tempo necessário para avaliação fenotípica em culturas perenes, por exemplo, são fatores que freqüentemente limitam a eficiência desta análise (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

As características físico-químicas do maracujá são de grande importância para o melhoramento genético dessa frutífera, pois permitem avaliar as propriedades organolépticas e de sabor dos frutos, garantindo sua qualidade para o mercado *in natura* ou para a indústria. Atualmente, busca-se, por meio de pesquisas, selecionar genótipos de maracujá-azedo e maracujá-doce mais produtivos e mais resistentes a doenças, e uma das alternativas é a hibridação interespecífica, ou seja, cruzamentos convencionais de seleção ou cultivares comerciais com espécies silvestres, que 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 objetivos do melhoramento do maracujazeiro devem visar além da qualidade dos frutos e produtividade, a incorporação de resistência a moléstias nas atuais cultivares ou desenvolvimento de outras com alguma tolerância a elas. A produção de mudas por enxertia com objetivo de evitar os danos causados por fungos de solo e a limpeza clonal têm sido apontadas como alternativa para diminuir os problemas causados por fitopatógenos, mas poucos estudos vêm sendo realizados na área (Meletti et al., 2005; Bruckner, 2002).

Novas características podem ser incorporadas em cultivares ou populações em diferentes etapas do melhoramento, utilizando-se de meios clássicos de recombinação sexuada, ou quando possível, de outros meios tais como hibridação somática e transformação gênica (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O melhoramento genético é uma das alternativas para solucionar problemas, principalmente, aqueles referentes a doenças. O melhoramento genético usa a hibridação para a transferência de genes de resistência de um material resistente para um material suscetível. As espécies silvestres têm importante papel nesses programas de melhoramento por que de modo geral elas apresentam genes de resistência. Um dos problemas que o melhorista enfrenta nesse tipo de programa é o referente a incongruidade, ou seja, incompatibilidade entre espécies. Para que a obtenção do híbrido interespecífico seja bem-sucedida, é necessário que as espécies a serem combinadas apresentem homologia cromossômica garantindo, assim, a viabilidade do híbrido. Portanto, o conhecimento das relações genômicas é necessário para o sucesso de um programa de hibridação (Pereira et al., 2005).

A espécie *Passiflora edulis* tem sido considerada como um bom progenitor por apresentar florescimento abundante e ininterrupto de fins de outubro a começo de maio, nas condições paulistas, e de até onze meses por ano, em regiões tropicais (Meletti & Brückner, 2001). Por esse motivo, tem-se dado ênfase à transferência de caracteres favoráveis de outras espécies para *P. edulis*. Além disso, diferentemente da maioria das espécies do gênero *Passiflora*, apresenta índices de germinação previsíveis e manutenção da viabilidade das sementes por quase um ano em condições normais de armazenamento (Meletti et al., 2005).

Entre as várias espécies do gênero *Passiflora* nativas do Brasil, algumas têm características interessantes que poderiam ser introduzidas no maracujazeiro comercial. Além da resistência a doenças e a algumas pragas, há espécies autocompatíveis como a *P. tenuifila* Killip, *P. cf. elegans* Mast., *P. capsularis* L., *P. villosa* Vell., *P. suberosa* L., *P. morifolia* Mast. e *P. foetida* L. Essa característica é importante para aumentar a produtividade e reduzir custos com mão-de-obra para a polinização manual, bem como para reduzir o impacto negativo provocado pelas abelhas-africanizadas, que perfuram a câmara nectarífera e removem todo o seu néctar antes da abertura das flores e, quando estas se abrem, retiram a maior parte de grãos de pólen, resultando em menor número de visitas dos polinizadores naturais e murchamento das flores (Junqueira et al., 2005; Fancelli & Lima, 2004).

Há espécies como a *P. setacea* DC. e *P. coccinea* Aubl. que, nas condições do Distrito Federal, comportam-se como planta de “dias curtos”, pois florescem e frutificam durante o período de dias mais curtos do ano, e a colheita ocorre de agosto a outubro, época da entressafra do maracujá-azedo comercial. Essa característica, se incorporada ao maracujazeiro comercial, poderá eliminar os problemas referentes a sua sazonalidade, permitindo a produção de frutos durante o ano todo na região Centro-Sul do País (Junqueira et al., 2005).

Outra característica importante, observada em algumas espécies silvestres, é a presença de androginóforo mais curto que reduz a distância dos estigmas em relação à coroa, facilitando a polinização por insetos menores. O androginóforo é a estrutura formada pelo prolongamento do receptáculo floral que sustenta o gineceu e o androceu. Em alguns acessos de maracujá roxo, silvestre e *P. odontophylla*, no momento de máxima curvatura do estilete, os estigmas chegam a tocar na coroa e, dessa forma, podem ser polinizados facilmente por pequenos insetos, sobretudo, pelas abelhas que, atualmente, são

consideradas pragas impactantes por transportar todo o pólen e não fazer a polinização de forma eficaz (Junqueira et al., 2005).

Em relação à resistência a doenças, vários autores (Menezes et al., 1994; Oliveira et al., 1994; Fischer, 2003; Meletti & Bruckner, 2001) relataram as espécies de passifloras silvestres: *Passiflora caerulea* L., *P. nitida* Kunth., *P. laurifolia* L., alguns acessos de *P. suberosa*, *P. alata*, *P. coccinea*, *P. gibertii* e *P. setacea*, como resistentes à morte precoce e a outras doenças causadas por patógenos do solo. Segundo Menezes et al. (1994), Fischer (2003) e Roncatto et al. (2004), a *P. nitida* Kunth, além de rústica, possui boa resistência a doenças e tem grande potencial para uso em programas de melhoramento que incluam hibridação interespecífica (Junqueira et al., 2005).

Em pesquisas em andamento na Embrapa Cerrados, com o objetivo de avaliar os índices de compatibilidade genética entre espécies de maracujazeiro, verificou-se que, por meio de cruzamentos artificiais, podem-se obter híbridos férteis e promissores para o melhoramento. A *P. setacea*, *P. coccinea* e *P. glandulosa*, *P. mucronata*, *P. galbana*, quando utilizadas como genitor feminino ou masculino, cruzam muito bem com *P. edulis* f. *flavicarpa*, produzindo frutos com muitas sementes férteis. Já a *P. caerulea* como genitor feminino nos cruzamentos com *P. edulis* f. *flavicarpa* dificilmente gera frutos com alguma semente, e o problema se repete na primeira geração de retrocruzamento (RC1). No entanto, quando utilizada como genitor masculino, os frutos obtidos possuem muitas sementes F1 férteis, mas há dificuldades para se obter sementes em RC1. Na geração RC2, em que se utilizou o maracujá-azedo comercial como recorrente e genitor masculino, podem ser encontradas plantas mais produtivas e frutos com muitas sementes (Junqueira et al., 2005).

As espécies silvestres de maracujá apresentam elevado grau de resistência e essa característica pode ser explorada em programas de melhoramento genético e em porta-enxertos (Junqueira et al., 2005). O maracujá-sururuca ou maracujá-do-sono (*Passiflora setacea*) é uma espécie de *Passifloraceae* silvestre que se destaca por apresentar tolerância a moléstias, resistência à morte precoce e à fusariose, constituindo-se numa importante alternativa potencial para porta-enxertos segundo alguns autores. Porém, possui algumas características fisiológicas indesejáveis tais como, longo período de dormência e dificuldade de enraizamento de estacas (Santos et al., 2005).

A maioria dos híbridos interespecíficos apresenta problemas de desenvolvimento, macho-esterilidade, baixa viabilidade polínica ou dificuldade em florescer (Otoni, 1995; Soares-Scott et al., 2003 citados por Meletti et al., 2005), além da ausência de



características agrônômicas interessantes para o cultivo e a comercialização. Neste caso, uma alternativa é o uso dos retrocruzamentos utilizando variedades comerciais com genitores recorrentes.

De acordo com Meletti & Brückner (2001), o caminho da hibridação natural interespecífica exige muitos ciclos de retrocruzamentos para recompor o vigor natural das plantas e as características interessantes para comercialização, o que torna o programa de melhoramento demasiadamente longo.

Por isso mesmo, os cultivos comerciais baseiam-se numa única espécie, *P. edulis*, uma vez que ela ocupa 95% dos pomares. Mesmo tendo se tornado comercial há poucos anos, o maracujá-amarelo apresenta grande variabilidade genética natural para as diversas características da planta e do fruto. Isto define um significativo potencial de exploração por seleção massal, podendo-se encontrar algumas populações selecionadas e cultivares (Meletti et al., 2005).

Oliveira & Ruggiero (1998) relatam que a transferência de resistência de *P. setacea* para *P. edulis* é a mais promissora, embora estudos devam ser feitos para contornar a macho-esterilidade dos descendentes híbridos e as dificuldades das metodologias de avaliação da resistência genética. Estudos detalhados de caracterização da genética da resistência em espécies cultivadas e silvestres são essenciais para subsidiar a utilização do germoplasma do gênero *Passiflora* em programas de melhoramento genético e como porta-enxerto visando à resistência a doenças (Faleiro et al., 2005a).

Considerando a grande variabilidade do maracujazeiro, programas de melhoramento genético têm sido conduzidos visando à obtenção de variedades mais produtivas e resistentes a doenças, por meio da hibridação sexual entre as espécies cultivadas e espécies silvestres (Barbosa, 1998; Junqueira et al., 2005; Faleiro et al., 2005a).

### **Retrocruzamentos**

O melhoramento de plantas pelo método dos retrocruzamentos envolve uma série de cruzamentos da progênie de duas variedades selecionadas com um dos genitores, por exemplo, [(A x B) x A]. A variedade que participa apenas do cruzamento inicial, no exemplo a variedade B, é denominada genitor doador ou não-recorrente e a que é utilizada nos cruzamentos repetidos, no exemplo, a variedade A, genitor recorrente. O termo recorrente indica que a variedade é utilizada repetidas vezes durante o programa. O

cruzamento entre as duas variedades é realizado e o híbrido F1, retrocruzado com o genitor recorrente em sucessivas gerações (Borém, 1997).

O objetivo do método dos retrocruzamentos é a recuperação do genitor recorrente, exceto em relação ao(s) gene(s) de interesse que está(ão) sendo transferidos. Características com alta herdabilidade, controladas por um ou poucos genes, são mais facilmente transferidas por esse método. A transferência dos alelos dominantes é realizada mais diretamente que a de alelos recessivos, em razão de os indivíduos heterozigotos revelarem apenas o fenótipo característico dos alelos dominantes. Se o alelo em transferência for recessivo, a autofecundação torna-se essencial para a sua manifestação (Borém, 1997).

A proporção de genes do genitor doador é reduzida à metade após cada geração de retrocruzamentos (Tabela 1). O número de retrocruzamentos necessários depende do grau de recuperação desejado do genitor recorrente, do mérito agrícola do doador, da intensidade de seleção das características do genitor doador, da intensidade de seleção das características do genitor recorrente durante o programa e da existência de ligação gênica entre o gene em transferência e outros indesejáveis (Borém, 1997).

**Tabela 1** - Recuperação média do genitor recorrente após diversas gerações de retrocruzamentos.

<i>Geração</i>	<i>% Recorrente</i>
F1	50
RC1	75
RC2	87,5
RC3	93,75
RC4	96,875

Fonte: Borém (1997)

### **O método dos retrocruzamentos utilizado em pesquisas na Embrapa Cerrados**

Em pesquisas em andamento na Embrapa Cerrados com o objetivo de avaliar os índices de cruzabilidade entre espécies de passifloras, verificou-se que, por meio de cruzamentos artificiais, podem se obter híbridos férteis e promissores para o melhoramento. As espécies *P. setacea*, *P. coccinea* e *P. glandulosa*, *P. mucronata*, *P. galbana*. e *P. caerulea* cruzam muito bem com a espécie *P. edulis* f. *flavicarpa* comercial

ou com a *P. alata* comercial produzindo frutos com sementes férteis (Junqueira et al., 2006).

Com objetivo de se obter resistência a doenças causadas por patógenos do solo, à virose do endurecimento dos frutos e à antracnose, foram obtidas e avaliadas plantas de gerações F1, RC1, RC2, RC3 e RC4 oriundas do cruzamento entre a *P. edulis* f. *flavicarpa* comercial x *P. setacea*, tendo a espécie comercial como genitor feminino e masculino para a obtenção das progênes F1 e como genitor masculino para a obtenção das progênes RC. Nas plantas obtidas na geração F1, tendo o maracujá-azedo como genitor feminino ou masculino, prevaleceram o vigor híbrido e as características marcantes da *P. setacea*, como folhas verdes mais claras, alta capacidade de floração, flores com androginóforo muito longo, pétalas e coroa com ligeira tonalidade lilás herdada do *P. edulis* f. *flavicarpa*, horário da antese e frutos com características intermediárias em todas as 98 plantas das duas progênes analisadas. No entanto, essas plantas, embora apresentem boa resistência à podridão-do-colo ou de raízes (*Fusarium solani*), à antracnose e à virose (PWV) e ótima floração, só produzem frutos por polinização manual, pelo fato de possuírem androginóforo muito longo, o que faz com que a altura ou a distância do estigma em relação à coroa seja elevada, não permitindo, dessa forma, a polinização por insetos. O horário de antese das plantas F1 pode também ter contribuído para a ausência de frutos obtidos via polinização natural. No Distrito Federal, a antese de *P. setacea* inicia-se às 19 horas e a flor permanece aberta e fértil até as 7 horas da manhã seguinte. Os possíveis polinizadores dessa espécie podem ser morcegos e mariposas. A antese de *P. edulis* f. *flavicarpa* inicia-se às 12 horas, e a flor permanece aberta até as 18 horas. Já a antese das plantas F1 inicia-se em torno das 17 horas e as flores permanecem abertas até as 22 horas. Portanto, parece não serem visitadas por polinizadores durante o período de antese (Junqueira et al., 2005).

Todas as plantas F1 são altamente suscetíveis à bacteriose, mas com alto grau de tolerância, o que faz com que as plantas se recuperem rapidamente após o período favorável à doença.

Quanto às gerações RC1, RC2, RC3 e RC4, verificou-se que a tonalidade das flores foi modificando em decorrência dos retrocruzamentos, até adquirir formato e cor similares aos da flor do recorrente nas gerações RC3 e RC4. Fato semelhante aconteceu com os frutos e as folhas. A confirmação do sucesso da fecundação cruzada para a obtenção dessas populações foi realizada por Faleiro et al. (2005b) por meio de marcadores moleculares RAPD. Em relação à resistência a doenças, verificou-se, também, que a resistência à virose

do endurecimento dos frutos foi diluída durante os retrocruzamentos, chegando, nas gerações RC3 e RC4, com graus de suscetibilidade similares aos observado no recorrente. Quanto à resistência à bacteriose, todas as gerações RC foram altamente suscetíveis e perderam a capacidade de tolerância observada em *P. setacea* e na geração F1 (Junqueira et al., 2005).

Em relação à produtividade, em experimentos conduzidos por Sousa (2005) em Vargem Bonita, DF, onde foi comparado o desempenho agrônômico de plantas de duas progênes RC3 (Progênes OS-09 e RC-03) de *P.edulis* f. *flavicarpa* x *P.setacea* juntamente com outras cultivares de *P.edulis* f. *flavicarpa* comerciais com polinização natural, verificou-se que ambas as progênes foram resistentes à antracnose e susceptíveis à verrugose, bacteriose e à virose do endurecimento dos frutos e tiveram baixa produtividade em relação à cultivar mais produtiva. Durante seis meses de colheita, os híbridos OS-09, RC-03 e EC-RAM {híbrido entre a Cv. Sul Brasil Marília x *P. edulis* f. *edulis* australiano (F1 x GA-2 comercial)} produziram respectivamente 2.602,00 kg/ha, 7.586,67 kg/ha e 23.457,15 kg/ha, ou seja, a melhor cultivar produziu nos seis meses de colheita, respectivamente dez vezes e três vezes mais que as RC3. Por sua vez o tamanho dos frutos das plantas dessas progênes foi similar ao das cultivares comerciais. A causa da baixa produtividade pode estar relacionada com a elevada altura do estigma em relação à coroa, proporcionada pelo androginóforo longo, o que dificulta a polinização por insetos. Ademais, o comportamento destas em relação a doenças causadas por patógenos do solo ainda está sendo analisado, segundo Junqueira et al. (2005).

As plantas F1 obtidas entre cruzamentos de *P.edulis* f. *flavicarpa* comercial x *P. coccinea*, apresentaram características marcantes do *P. coccinea*, como folhas simples, lóbulos com bordas serrilhadas, verde-escuros, flores de cor vinho e rosa *pink*, androginóforo longo, mas, também com características de *P.edulis* f. *flavicarpa* como flores e coroa e filetes brancos e excelente vigor. Embora apresentem boa resistência a doenças, as plantas F1 produzem poucos frutos por polinização natural pelas mesmas causas encontradas nos híbridos com *P.setacea*, ou seja, androginóforo longo e elevada altura dos estigmas em relação à coroa. As plantas da geração RC1, tendo *P.edulis* f. *flavicarpa* como genitor masculino e recorrente, apresentam, também, excelente vigor e características marcantes de *P. coccinea*, porém, suas flores são de coloração róseo-arroxeadas e geram poucos frutos por polinização natural e demoram muito para iniciar a frutificação (Junqueira et al., 2005).

Quanto aos híbridos obtidos entre *P.edulis* f. *flavicarpa* comercial x *P. caerulea*, as plantas da geração F1 e RC1 têm boa resistência à bacteriose e à antracnose, mas produzem frutos sem sementes, são preferidas pela broca-do-maracujá e são susceptíveis à virose do endurecimento dos frutos. As plantas da geração RC2 tendo o maracujá-azedo como genitor masculino e recorrente, frutificam bem, produzem frutos grandes semelhantes aos do maracujazeiro-azedo comercial, têm flores com cores semelhantes às do maracujazeiro-azedo e formato similar ao do *P.caerulea*, como pétalas e sépalas com ápices arredondados (Junqueira et al., 2005).

### **Marcadores moleculares de DNA**

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 características fenotípicas (Vieira et al., 2005).

A disponibilidade de uma bateria de marcadores moleculares, por si só, já permite empreender uma série de estudos importantes dentro de um programa de melhoramento, antes mesmo que a correlação entre um ou mais marcadores moleculares e locos genéticos que controlam características de interesse agrônômico seja estabelecida (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

De um modo geral, diversas aplicações de marcadores moleculares em melhoramento genético podem ser distribuídas em aplicações cujos resultados apresentam expectativas de curto, médio e longo prazo. As aplicações de curto prazo envolvem, basicamente, a identificação e discriminação de genótipos. Nas aplicações analíticas de médio-longo prazo, os marcadores permitem quantificar a variabilidade genética existente ao nível de seqüência 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 eles 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, desenvolvidas, bem como para monitorar a pureza das sementes e ou clones produzidos e repassados aos agricultores (Pereira et al., 2005).

Conforme relataram Openshaw et al. (1994), o uso de marcadores moleculares para a identificação de indivíduos que apresentam maior proporção do genoma do genitor recorrente pode reduzir o número de retrocruzamentos requeridos para sua recuperação.

O princípio da utilização dos marcadores moleculares é baseado no dogma central da Biologia Molecular e na pressuposição de que diferenças genéticas no DNA significam, na maioria das vezes, diferenças fenotípicas. Suas vantagens são: obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos; identificação direta do genótipo sem influência do ambiente; possibilidade de detecção de tais polimorfismos em qualquer estágio de desenvolvimento da planta ou a partir de cultura de células ou tecidos. Ainda, há possibilidade de gerar maior número de informação genética por loco no caso de marcadores co-dominantes (Faleiro, 2007).

Dentre os marcadores de DNA, o primeiro a ser utilizado foi o baseado em enzimas de clivagem do DNA (*Restriction fragment length polymorphism* – RFLP). O RFLP, embora bastante trabalhoso, constitui uma metodologia poderosa, capaz de gerar marcas co-dominante, de grande conteúdo em termos de informação genética. Com o advento do processo da amplificação por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR), outras categorias de marcadores foram desenvolvidas. Como exemplos, os mais utilizados na PCR, são RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), segundo Pereira et al. (2005).

O RAPD, por ser uma metodologia mais simples e relativamente mais barata, tem sido intensamente usado pelos diversos laboratórios, em diferentes culturas, para as mais variadas finalidades. O RAPD se baseia no uso de iniciadores arbitrários que são utilizados na amplificação de DNA via PCR. Embora sejam bastante empregados, esses marcadores apresentam algumas limitações, sendo as principais: baixa reprodutibilidade e não-separação dos indivíduos homocigotos dos heterocigotos, ou seja, são dominantes (Pereira et al., 2005).

Os marcadores AFLP foram estabelecidos na expectativa de se explorar as vantagens do RFLP, por se basearem, igualmente em enzimas de clivagem, e também nas vantagens do RAPD. A grande vantagem dos marcadores AFLP é o elevado potencial de

se detectar polimorfismo, permitindo com isto, rápida cobertura genômica. A desvantagem é que, à semelhança dos marcadores RAPD, são também co-dominantes (Pereira et al., 2005).

As diferentes metodologias da genética molecular têm permitido estudos de evolução, de diversidade genética inter e intra-específica, de identidade, origem genética e identificação de novas variantes, gerando informações importantes para subsidiar diferentes ações de pesquisa desde a coleta até o uso dos recursos genéticos em programas de melhoramento (Faleiro, 2007).

A tecnologia da reação em cadeia de polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) é uma técnica poderosa para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo devido sua facilidade, versatilidade e sensibilidade. Muitos métodos tradicionais de clonagem, sequenciamento e análise de polimorfismo de DNA foram acelerados ou substituídos pelo uso da técnica de PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA pela enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (*primers*) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes *primers* são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares a seqüências específicas que flanqueiam a região alvo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Um ciclo de PCR envolve três etapas (desnaturação, anelamento e extensão). A fita dupla de DNA alvo é desnaturada através da elevação de temperatura para 92 a 95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60°C, dependendo essencialmente do tamanho e seqüência do *primer* utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada *primer* com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos *primers*. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência-alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência é feita no processo. Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da seqüência-alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, é produzido mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de seqüência alvo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Para a análise dos marcadores genético-moleculares, o primeiro passo é a codificação dos fragmentos moleculares em dados binários (no caso de marcadores dominantes) ou dados de coincidência alélica (no caso de marcadores co-dominantes). Os dados para marcadores dominantes, normalmente, são codificados como 1 (presença de marcador) e 0 (ausência do marcador). Os dados para marcadores co-dominantes normalmente são codificados como zero (ausência de alelos comuns no loco),  $\frac{1}{2}$  (um alelo comum no loco) e 1 (os dois alelos comuns no loco). No caso de marcadores baseados na seqüência de nucleotídeos, a codificação é a própria seqüência de nucleotídeos, representada pelas quatro diferentes bases nitrogenadas do DNA (Faleiro, 2007).

O segundo passo é utilizar os dados codificados para a estimativa de índices de similaridade ou de distância genética entre cada par de acessos. Normalmente, os coeficientes de correlação entre os diferentes índices são muito altos (Corrêa et al., 1999), embora existam algumas diferenças importantes entre elas (Dias, 1998). No caso de marcadores baseados na seqüência de nucleotídeos de determinado fragmento de DNA, os índices de similaridade ou de distância são calculados com base na homologia de seqüência (Kimura, 1980).

Com base nos índices, estabelece-se uma matriz de similaridade ou de distâncias entre os acessos a qual vai servir de base para as análises de agrupamento e de dispersão dos acessos. As análises de agrupamento normalmente são baseadas em métodos hierárquicos que podem utilizar diferentes critérios de agrupamento: vizinho mais próximo (“single linkage”), vizinho mais distante (“complete linkage”) e baseado na média das distâncias (“unweighted pair-group method using arithmetic average”). No caso da análise de dispersão dos acessos, o método mais utilizado é aquele baseado em escalas multidimensionais por meio das coordenadas principais. Esse método tem sido denominado análise de coordenadas principais (“principal coordinates analysis” - PCDA) (Gower, 1966) e também é discutido por Dias (1998).

Existem vários softwares disponíveis para a análise de marcadores moleculares, entre eles o GENES (Cruz, 1997), o STATISTICA (StatSoft, 1999), o NTSYS (Rohlf, 1992), o GQMOL (Cruz & Schuster, 2000), o SPSS (Norusis, 1993) e o SAS (SAS Institute, 1989). Eles são de grande importância para a realização das análises, principalmente, quando vários acessos são analisados simultaneamente (Faleiro, 2007).

Esses vários softwares diferem-se nos procedimentos e na abrangência das análises, nos formatos dos arquivos utilizados como entrada de dados, na robustez, linguagem de programação e na qualidade gráfica dos resultados ou saída dos dados (Faleiro, 2007).



A utilização de marcadores moleculares como uma ferramenta de seleção em culturas perenes é uma tecnologia extremamente atraente, tendo em vista o tempo necessário para completar uma geração de melhoramento destas espécies. A perspectiva de tornar mais eficiente a seleção precoce, e com isso aumentar o ganho genético por unidade de tempo, faz com que o melhoramento de espécies florestais e frutíferas seja a área onde o uso efetivo desta tecnologia tende a ter as melhores perspectivas de sucesso (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

### **Uso de marcadores moleculares para acelerar a recuperação do genoma recorrente**

Os programas de retrocruzamentos têm o objetivo de obter um indivíduo com o mesmo genótipo do progenitor recorrente, exceto em relação a um ou alguns genes em transferência do progenitor doador. Nesses programas, em geral, o progenitor recorrente é uma variedade superior e o doador, muitas vezes, apresenta diversas limitações agrônômicas, porém é portador dos genes de interesse para o melhoramento do progenitor recorrente. Durante a condução dos retrocruzamentos, prioritariamente selecionam-se as características em transferência. A seleção dos caracteres do progenitor recorrente, durante o programa, pode reduzir o número de retrocruzamentos necessários para a sua recuperação (Borém, 1997).

A genotipagem dos indivíduos com o uso de marcadores moleculares, além de monitorar a presença do gene de interesse, permite a seleção de indivíduos mais semelhantes ao genitor recorrente e com melhor conversão na região próxima ao gene introduzido (Guimarães & Moreira, 1999). Desse modo, o número de retrocruzamentos necessários para a recuperação do fenótipo recorrente é reduzido de forma acentuada, acelerando o desenvolvimento de variedades melhoradas (Openshaw et al., 1994).

O número de gerações que podem ser reduzidas vai depender do tamanho do genoma da espécie, do número de marcadores moleculares utilizados na análise, do número de plantas RC genotipadas e selecionadas e da proporção do genoma recorrente a ser recuperada (Faleiro, 2003). Em estudos de simulação, Openshaw et al. (1994) concluíram que, para uma espécie com genoma constituído de 10 cromossomos com 200 cM cada e utilizando 80 marcadores para seleção em população com 50 progênies, é possível reduzir o número de retrocruzamentos de sete para três e recuperar 99% do progenitor recorrente.

A utilização de marcadores moleculares no programa de retrocruzamentos foi bem sucedida em trabalho realizado por Faleiro et al. (2004), que após três ciclos de retrocruzamentos, obtiveram cinco cultivares de feijoeiro-comum resistentes à ferrugem e à antracnose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAMINE, E.K.; GIROLAMI, G. **Pollination and fruit set in the yellow passion fruit.** Havai: University of Hawaii, 1959. 44p. (University Hawaii. Technical Bulletin, 39).
- ANJOS, J.R.N.; JUNQUEIRA, N.T.V.; CHARCHAR, M.J.A. **Incidência e distribuição do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro do cerrado do Brasil Central.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2001. 17 p.
- BARBOSA, L.V. **Citogenética de híbridos somáticos de *Passiflora* spp. Obtidos por fusão de protoplastos.** Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998. 97p. (Tese de Doutorado).
- BARBOSA, C.J.; FILHO, H.P.S. Doenças causadas por vírus e similares. In: FILHO, H.P.S.; JUNQUEIRA, N.T.V. **Maracujá: Fitossanidade.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 86p. (Frutas do Brasil; 32).
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas.** Viçosa: UFV, 1997. 547 p.
- BRAGA, M.F.; BATISTA, A.D.; JUNQUEIRA, N.T.V.; JUNQUEIRA, K.P.; VAZ, C.F.; SANTOS, E.C. SANTOS, F.C. Características agronômicas, físicas e químicas de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip.) cultivado no Distrito Federal. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PINTO, A.C.Q; SOUSA, E.S. **IV Reunião técnica de pesquisas em maracujazeiro.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 86-90.
- BREWBACKER, J.L. Pollen cytology and self incompatibility systems in plants. **The Journal of Heredity**, v.28, n.6, p. 271-277, 1957.
- BRUCKNER, C.H. **Auto-incompatibilidade no maracujá (*Passiflora edulis* Sims).** 1994. 85 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1994.
- BRUCKNER, C.H.; SUASSUNA, T.M.F.; RÊGO, M.M.; NUNES, E.S. Auto-incompatibilidade do maracujá - implicações no melhoramento genético. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 317-338.
- BRUCKNER, C.H.; MELETTI, L.M.; OTONI, W.C.; JUNIOR, F.M.Z. Maracujazeiro. In: BRUCKNER, C.H. **Melhoramento de fruteiras tropicais,** Viçosa: UFV, 2002, p. 373-410.
- CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T.; GAMA, M.I.C.S; YAMASHIRO, T. **Grave moléstia em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) no Estado da Bahia, causada por um isolado do vírus do “woodiness” do maracujá.** Fitopatologia Brasileira, v.6, p. 259-268. 1981.
- CHITARRA, M.I.F. & CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio.** Lavras: ESAL/FAEPE, 1990. 320p.

CORRÊA, R.X.; ABDELNOOR, R.V.; FALEIRO, F.G.; CRUZ, C.D.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Genetic distances in soybean based on RAPD markers. **Bragantia**, Campinas, v.58, p. 15-22, 1999.

CRUZ, C.D. 1997. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV. 442p.

CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. **Programa GQMOL: genética quantitativa e molecular**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>>. Acesso em: 13 jun. 2005.

CUNHA, M.A.P., BARBOSA, L.V., FARIA, G.A. **Botânica**. In: LIMA, A.A e CUNHA, M.A.P. Maracujá: produção e qualidade na passicultura. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004a. p. 13-36.

CUNHA, M.A.P., BARBOSA, L.V., FARIA, G.A. Melhoramento Genético. In: LIMA, A.A e CUNHA, M.A.P. **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004b. p. 67-94.

DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: Editora UFV, 1998. p. 405-475.

DUVICK, D.N. Influence of morphology and sterility on breeding methodology. In: FREY, K.J. **Plant breeding**. Iowa: Iowa State University Press, 1967. p. 85-138.

DURIGAN, J.F. **Colheita e conservação pós-colheita**. In: RUGGIERO, C. coord. SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, 5, 1998, Jaboticabal. Anais. Jaboticabal: FUNEP, 1998. p. 257-278.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FALEIRO, F.G. **Seleção assistida por marcadores moleculares – Diferentes aplicações. Mesa Redonda**. In: 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Porto Seguro, Bahia, 2003. Unidade CD. 2003. 6p.

FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – Desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005a. p. 187-210.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.; BRAGA, M.F.; BELLON, G.; PEIXOTO, J.R. ; BARROS, A.M.C.; BORGES, T.A. ; ALMEIDA, D. A. ; COSTA, B. **Obtenção de populações de retrocruzamentos e confirmação da fecundação cruzada no maracujazeiro com base em marcadores moleculares**. In: 3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2005, Gramado. 3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. CD-ROM, 2005b.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; MOREIRA, M.A. & BARROS, E.G. Use of molecular markers to accelerate the breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose. **Euphytica**, 138: 213-218. 2004.

FANCELLI, M; LIMA, A.A. Insetos – Praga do maracujazeiro. In: LIMA, A.A e CUNHA, M.A.P. **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 179-210.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FILHO, H.P.S.; JUNQUEIRA, N.T.V. **Maracujá: Fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 86p. (Frutas do Brasil; 32).

FISCHER, I. H. **Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da “morte prematura” do maracujazeiro, causada por *Nectria hematococca* e *Phytophthora parasítica***. 2003. 48 f. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2003.

GOWER, J.C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**, London, v.53, p.325-338, 1966.

GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: Borém, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. 817p.

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; BERNACCI, L.C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 341-358.

JUNQUEIRA, N.T.V.; FALEIRO, F.G.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. Uso de Espécies Silvestres de Passifloras no Pré-melhoramento do Maracujazeiro. In: LOPES, M.A.; FÁVERO, A.P.; FERREIRA, M.A.J.F.; FALEIRO, F.G. **Curso Internacional de pré-melhoramento de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 2006. 184p.

JUNQUEIRA, N.T.V., VERAS, M.C.M., NASCIMENTO, A.C., CHAVES, R.C., MATOS, A.P., JUNQUEIRA, K.P. **A importância da polinização manual para aumentar a produtividade do maracujazeiro**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001. 18 p.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. 3ª ed. 2v. 774 p.

KIMURA, M.A. simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, London, v.16, p. 111-120, 1980.

KITAJIMA, E.W. , CHAGAS, C.M. & CRESTANI, O.A. Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira** 11: 409-432. 1986.

KNIGHT JUNIOR, R. J.; WINTERS, H. F. Pollination and fruit set of yellow passionfruit in southern Florida. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 75, p. 412-418, 1962.

KUDO, A.S. **Reação de genótipos de maracuzazeiro azedo a *Septoria passiflorae* e a *Cladosporium herbarum***. 2004. 97 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília.

LEITÃO FILHO, H.F. & ARANHA, C. Botânica do maracujazeiro. In: **Simpósio da cultura do maracujá**, Campinas, 1971. Sociedade Brasileira de Fruticultura, I.1 a I13. 1974 (Mimeografado).

LEWIS, D. Comparative incompatibility in angiosperms and fungi. **Advances in genetics**, v.6, p. 235-85, 1954.

LIMA, A.A. e BORGES, A.L. Exigências edafoclimáticas. In: LIMA, A.A e CUNHA, M.A.P. **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 37-44.

LIMA, A. A.; CALDAS, R. C.; CUNHA, M. A. P.; SANTOS FILHO, H. P. Avaliação de porta-enxertos e tipos de enxertia para o maracujazeiro-amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 21, n. 3, p. 318-321, 1999.

LIMA, A.A; CUNHA, M.A.P. Práticas Culturais. In: LIMA, A.A e CUNHA, M.A.P. **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 169-178.

MANICA, I. Maracujazeiro: Taxionomia – anatomia – morfologia. In: **Maracujá, temas selecionados 1) melhoramento, morte prematura, polinização, taxionomia**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. p. 7-24.

MATHER, K. The genetical structure of population. **Evolution**, v. 7, p. 66-95, 1953.

MENEZES, J. M. T.; OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C.; BANZATO, D. A. Avaliação da taxa de pagamento de enxertos de maracujá-amarelo sobre espécies tolerantes à “morte prematura de plantas”. **Científica**, v. 22, n. 1, p. 95-104, 1994.

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

MELETTI, L.M.M. e MAIA, M.L. **Maracujá: Produção e comercialização**. Boletim técnico, 181. Campinas, Instituto Agrônomo, 1999, 64 p.

MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R.S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 55-78.

NASCIMENTO, A.V.S.; SANTANA, E.N; BRAZ, A.S.K.; ALFENAS, P.F.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G.P.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F. MURILO. **Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease.** Archives of Virology, Viena, v.161, p. 21-34, 2006.

NETTANCOURT, D. **Incompatibility in Angiosperms.** Berlin: Springer-Verlag, 1977. 230 p.

NORUSIS, M.J. **SPSS for windows, advanced statistics,** Release 6.0. Chicago: SPSS, 1993.

NOVAES, Q.S. **Seleção de estirpes fracas de Passion fruit woodiness virus e tentativas de premunização para o controle do endurecimento dos frutos do maracujazeiro.** Piracicaba, 2002. 74p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.

OLIVEIRA, J. C. de; NAKAMURA, K.; CENTURION, M. A. P. C.; RUGGIERO, C.; FERREIRA, F. R.; MAURO, A. O.; SACRAMENTO, C. K. Avaliação de Passifloráceas quanto à morte prematura de plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13., 1994, Salvador. **Anais...** Salvador: SBF, 1994. v. 3, p. 827. (Resumo 347).

OLIVEIRA, J. C. de & RUGGIERO, C. **Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo.** In: RUGGIERO, C. 50 SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 10-13 de fevereiro, 1998, Jaboticabal. **Anais.** Jaboticabal: Funep, 1998. 388 p.

OPENSHAW, S.J.; JARBOE, S.G. and BEAVIS, W.D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: ASHS/CSSA Joint Plant. Breeding Symposium, 2, Corvallis **Proceedings...** Corvallis: Oregon State University. 1994.

PEREIRA, T.N.S; NICOLI, R.G.; MADUREIRA, H.C.; DAMASCENO JUNIOR, P.C.; GABURRO, N.O.P.; COUTINHO, K. Caracterização morfológica e reprodutiva de espécies silvestres do gênero *Passiflora*. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PINTO, A.C.Q; SOUSA, E.S. **IV Reunião técnica de pesquisas em maracujazeiro.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 29-34.

REZENDE, J.A.M. Doenças de vírus e micoplasma do maracujazeiro no Brasil. In: São José, A.R.(Ed.) **Maracujá: produção e mercado.** Vitória da Conquista: UESB 1994. pp. 116-125.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc – Numerical taxonomy and multivariate analysis system.** Version 1.70. New York: Exeter Siftware, 1992.

RONCATTO, G.; OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C.; NOGUEIRA FILHO, G. C.; CENTURION, M. A. P. C.; FERREIRA, F. R. Comportamento de maracujazeiros (*Passiflora* spp.) quanto à morte prematura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 3, p. 552-554, 2004.

- ROWLANDS, D. G. Self-incompatibility in sexual propagated plants. **Euphytica**, v. 13, p.157-162, 1964.
- RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A.R.; VOLPE, C.A.; OLIVEIRA, J.C.; DURIGAN, J.F.; BAUNGARTNER, J.G.; SILVA, J.R.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, M.E; KAVATI,R.; PEREIRA, V.P. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: MAARA, SDR; EMBRAPA-SPI, 1996. 64p. Publicações técnicas Frupex, 19.
- SANTOS, F.C.; RAMOS, J.D. SANTOS, F.C.; LIMA, L.C.O.; JUNQUEIRA, K.P.; REZENDE, J.C. Características físico-químicas do maracujazeiro silvestre *Passiflora setacea*. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PINTO, A.C.Q; SOUSA, E.S. **IV Reunião técnica de pesquisas em maracujazeiro**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 143-146.
- SAS INSTITUTE INC. 1989. **SAS/STAT user's guide**. Version 6, 4 ed. SAS Institute, North Caroline, Cary.
- SILVA, A.C. & SÃO JOSÉ, A.R. Classificação botânica do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R. (ed.). **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista: UESB, 1994. p. 1-5.
- SOUSA, M. A. F. **Produtividade e reação a doenças em genótipos de maracujazeiro-azedo, cultivados no Distrito Federal**. 2005. 138 p. Dissertação (Mestrado)-Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2005.
- STATSOFT INC. 1999. **Statistica for Windows [Computer program manual] Tulsa, OK**. StatSoft Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa.
- STENZEL, N. M. C.; CARVALHO, S. L. C. Comportamento do maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) enxertado sobre diferentes porta-enxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 14, n. 3, p. 183-186, 1992.
- URASHIMA, A.S. **Aspectos fenológicos do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)**. Botucatu, 1985. 83p. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.
- VANDERPLANK, J. **Passion flowers**, 2.ed. Cambridge: The MIT Press, 1996. 224 p.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E., ESTES, M.K.; LEMON, S.; MANILOFF,J.; MAYO, J.A.; McGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R. & WICKNER, R. (Eds.) **Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses**. Seventh report of the Internacional Committee on the Taxonomy of Viruses. New York: Academic Press. 2000.
- VIEIRA, M.L.C.; OLIVEIRA, E.J.; MATTA, F.P.; PÁDUA, J.G.; MONTEIRO, M. 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, 2005. p. 411-453.
- YAMASHIRO, T.; CHAGAS, C.M. **Ocorrência de grave virose em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.), no Estado da Bahia**. In: CONGRESSO



BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., Pelotas, 1979, Anais. Pelotas: SBF, 1979. p. 915-917.

ZERBINI, F.M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. **Doenças causadas por vírus em maracujazeiro.** In: ENCONTRO DE FITOPATOLOGIA, 3., 1999. Anais. Viçosa: UFV, 1999, p. 135-145.

ZERBINI, F.M.; NASCIMENTO, A.V.S.; ALFENAS, P.F.; TORRES, L.B.; BRAZ, A.S.K.; SANTANA, E.N.; OTONI, W.C.; CARVALHO, M.G. Transformação genética do maracujazeiro para resistência a doenças. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 589-597.

## **CAPÍTULO 1**

### **RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES RC DE MARACUJAZEIRO À VIROSE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS**

## RESISTÊNCIA DE POPULAÇÕES RC DE MARACUZEIRO À VIROSE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS

**RESUMO** – Na região do Cerrado, a cultura do maracujá apresenta produtividade crescente nos últimos anos, entretanto, a média nacional ainda é considerada baixa quando analisado seu potencial produtivo. A baixa produtividade é provocada principalmente pela ocorrência de doenças, podendo destacar as causadas por vírus. A base genética do maracujazeiro-azedo comercial para resistência a doenças é relativamente estreita. Assim, as espécies silvestres podem contribuir para aumentar o nível de resistência das cultivares comerciais a doenças e nesse sentido um programa de melhoramento genético por retrocruzamentos tem sido realizado com sucesso na Embrapa Cerrados e parceiros. Dentro deste programa de melhoramento genético, objetivou-se, neste trabalho, avaliar a incidência e severidade da virose do endurecimento dos frutos nas populações RC4 e RC5 (quarta e quinta geração de retrocruzamento) geradas a partir do cruzamento base [*P.edulis* x *P.setacea*) x *P.edulis*] comparando-as com a severidade no genitor recorrente (*P. edulis* f. *flavicarpa*) e no genitor resistente (*Passiflora setacea*). Foram realizados dois ensaios na Embrapa Cerrados (avaliação da severidade da virose do endurecimento dos frutos nas plantas RC4 e RC5 em condições de campo e avaliação da incidência do vírus em condições controladas em 60 plantas RC5). As avaliações de severidade de virose foram realizadas em duas épocas diferentes nas plantas RC4 (novembro de 2006 e janeiro de 2007) e RC5 (setembro e novembro de 2007). Não houve controle de vetores. Para tais avaliações, coletou-se ao acaso, dez folhas de cada planta e atribuiu-se notas de 1 a 4 de acordo com o sintoma observado, baseando-se em uma escala de notas. Observou-se que 62% das 47 plantas RC4 apresentaram severidade da virose menor que a apresentada pelo genitor recorrente na primeira avaliação. A porcentagem de plantas que apresentaram menor severidade que o genitor recorrente na segunda avaliação diminuiu para 56%, considerando-se que o total de plantas avaliadas nesse período foi de 45. Nas plantas RC5, todas as plantas apresentaram médias de severidade menores que o genitor *P.edulis*, em setembro de 2007. Já em novembro do mesmo ano, 77% das plantas RC5 apresentaram média de severidade menor que o genoma recorrente. Notou-se que a severidade da doença é menor no genitor resistente e maior no genitor recorrente (espécie comercial) e à medida que ocorreram os retrocruzamentos, a resistência à virose nas plantas RC foi reduzida, provavelmente pelo fato de ser uma resistência horizontal de herança quantitativa.

**Palavras-chave:** *P.edulis*, *P.setacea*, retrocruzamentos, severidade

## RESISTANCE TO WOODINESS VIRUSIS IN PASSION FRUIT POPULATIONS RC

**ABSTRACT** - In the Cerrado region, passion fruit crop shows increasing productivity in recent years, however, the national average is still considered low when taking in account its productiveness potential. Low productivity is mainly caused by the occurrence of diseases, specially those caused by virusis. Commercial sour passion fruit genetic basis regarding diseases resistance is relatively narrow. Thus, wild species can help increase the commercial cultivars resistance level and accordingly a backcrossing breeding program has been successfully implemented at Embrapa Cerrados and partners. Within this breeding program, this experiment's objective was to evaluate incidence and severity of the woodiness virus in populations RC4 and RC5 (fourth and fifth backcrossing generation) generated from the primary crossing [(*P. edulis* x *P. setacea*) x *P. edulis* ] compared to severity in the recurrent (*P. edulis* F. *flavicarpa*) and in the resistant genitor (*P. setacea*). There were two assays at Embrapa Cerrados (virusis severity evaluation in plants RC4 and RC5 under field conditions and virusis incidence evaluation under controlled conditions in 60 plants RC5). The virusis severity evaluation were performed in two different periods, in plants RC4 (November 2006 and January 2007) and RC5 (September and November 2007). For such assessments, ten leaves from each plant were randomly collected and received grades from 1 to 4 according to the symptom observed, based on a scale. From 47 plants RC4, 62% showed lower virusis severity than the recurrent genitor at the first evaluation. The percentage of plants that showed lower severity than the recurrent genitor at the second evaluation dropped to 56%, considering the total of 45 plants evaluated during this period. Among plants RC5, in September 2007, all of them showed lower severity averages than the genitor *P. edulis*. But in November of the same year, 77% of plants RC5 showed severity average smaller than the recurrent genome. It was observed that disease severity is lower in the resistant genitor and higher in the recurrent genitor (commercial species), and as the backcrossings took place, the virusis resistance in plants RC was reduced, probably because it is a horizontal resistance of quantitative inheritance.

Keywords: *P. edulis*, *P. setacea*, backcrossing, severity

## INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos mais importantes centros de diversidade do maracujá, pois muitas espécies silvestres de *Passiflora* são nativas, notadamente, no Centro-Norte do País (Ferreira, 2005). Estima-se que mais de 200 espécies de *Passiflora* sejam nativas do Brasil (Oliveira et al., 1988). Além desse número expressivo de espécies, deve-se enfatizar que, em geral, existe material ainda não descrito que provavelmente constitua espécie nova (Ferreira, 1994).

Na região do Cerrado, essa cultura apresenta produtividade crescente nos últimos anos, entretanto, a média nacional ainda é considerada baixa quando analisado seu potencial produtivo, principalmente em condições experimentais. A baixa produtividade é provocada por vários fatores, entre eles o fitossanitário, especialmente a suscetibilidade a doenças causadas por vírus (Anjos et al., 2001).

O desenvolvimento de cultivares com resistência a doenças é uma alternativa para essa cultura porque envolve medidas de segurança para o trabalhador agrícola e consumidor, preservação do ambiente, redução de custos de produção, qualidade mercadológica, entre outros, sendo uma demanda atual para as pesquisas em maracujazeiro (Faleiro et al., 2005b; Faleiro et al., 2006).

Algumas espécies não cultivadas têm acenado com contribuições importantes ao melhoramento genético por apresentar resistência a doenças ou a pragas, longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, maior concentração de componentes químicos interessantes para a indústria farmacêutica e outras potencialidades, quase todas, ainda, inexploradas. Entre essas, destacam-se *P. setacea*, *P. cincinata*, *P. caerulea*, *P. incarnata*, *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. nitida* e *P. quadrangularis* (Meletti et al., 2005; Junqueira et al., 2005).

No entanto, a utilização da ampla diversidade genética dentro do gênero *Passiflora*, em função do elevado número de espécies nele presente, ainda tem sido pouco explorada, inclusive, no Brasil onde se localiza o maior centro de dispersão geográfica do maracujá. Apesar dessa condição privilegiada quanto aos recursos genéticos de *Passiflora*, a maioria dos híbridos interespecíficos obtidos apresenta problemas de desenvolvimento, esterilidade masculina, baixa viabilidade polínica ou dificuldade em florescer (Meletti & Brückner, 2001). Por isso, a hibridação interespecífica não tem sido explorada adequadamente em nível mundial (Nakasone & Paull, 1999).

A base genética do maracujazeiro-azedo comercial para resistência a doenças é

relativamente estreita. Assim, as espécies silvestres podem contribuir para aumentar o grau de resistência das cultivares comerciais a doenças. A transferência de genes de resistência de espécies silvestres para as comerciais tem sido feita, na Embrapa Cerrados, por meio de hibridações interespecíficas seguidas de um programa de retrocruzamentos visando a recuperação das características agronômicas das cultivares comerciais, mantendo-se o(s) gene(s) de resistência das espécies silvestres.

Entre os híbridos interespecíficos avaliados até o momento, aqueles obtidos a partir do cruzamento de *P. edulis* f. *flavicarpa* comercial x *P. caerulea* são os mais promissores. Na geração RC2 usando o maracujazeiro-azedo como recorrente, já se obtiveram populações com produtividades similares ao maracujazeiro comercial. A *P. caerulea* possui resistência à bacteriose e antracnose e boa tolerância a fusariose (Junqueira et al., 2005). Híbridos de *P. edulis* f. *flavicarpa* comercial x *P. coccinea* não foram bem sucedidos. Todos os híbridos foram confirmados por meio de marcadores moleculares, conforme preconizado por Faleiro et al. (2005a).

A partir de cruzamentos de *P. edulis* f. *flavicarpa* comercial x maracujá-roxo (*P. edulis* Sims), uma espécie silvestre no Brasil e cultivada na Austrália, Oceania e Ásia, obtiveram-se alguns híbridos intraespecíficos que vêm se destacando em produtividade e tolerância a doenças foliares

Híbridos entre *P. setacea* x *P. edulis* f. *flavicarpa* comercial já nas gerações RC4 e RC5, tendo a *P. edulis* f. *flavicarpa* comercial como recorrente, estão sendo avaliados. No entanto, as plantas das gerações RC1, RC2 e RC3 não apresentaram boa produtividade e a resistência à virose do endurecimento dos frutos apresentada pela *P. setacea* diluiu durante os retrocruzamentos, chegando ao mesmo grau da *P. edulis* f. *flavicarpa* comercial na geração RC3, de acordo com Junqueira et al. (2006).

Para dar continuidade ao programa de retrocruzamentos, utilizando as espécies *P. edulis* e *P. setacea*, objetivou-se, neste trabalho, avaliar a severidade da virose do endurecimento dos frutos nas populações RC4 e RC5, em condições de campo e em condições de casa-de-vegetação, comparando com a severidade no genitor recorrente (*P. edulis* f. *flavicarpa*) e no genitor resistente (*Passiflora setacea*).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

As avaliações da virose do endurecimento dos frutos foram feitas em três etapas: avaliação da severidade nas plantas RC4 em condições de campo, inoculação mecânica e avaliação da incidência da doença nas plantas RC5, em condições controladas (casa de vegetação) e avaliação da severidade da virose nas plantas RC5 em condições de campo.

### **Avaliação de virose nas plantas RC4**

O experimento foi instalado no campo experimental da Embrapa Cerrados (CPAC), localizado em Planaltina, DF, a 1.050 m de altitude, em Latossolo Vermelho-Amarelo areno-argiloso. No campo, havia 59 plantas dispostas em duas fileiras, sendo a primeira com 48 plantas e a segunda com 11 plantas RC4, entre fileiras de *P. edulis* comercial e de outras espécies silvestres, todas infectadas por virose.

As avaliações da severidade de virose nessas plantas foram realizadas em duas épocas (novembro de 2006 e janeiro de 2007). A primeira avaliação foi feita quando as plantas tinham 18 meses de idade.

Em novembro foram avaliadas 47 plantas e em janeiro o número de plantas avaliadas reduziu para 45, as demais morreram durante a execução do experimento.

Para essa avaliação, coletou-se, ao acaso, dez folhas em desenvolvimento de brotações novas de cada planta RC4. Além das plantas RC4, foram avaliadas três plantas do genitor recorrente, *P. edulis* f. *flavicarpa*, e três plantas do genitor resistente, *P. setacea*. Para cada folha, foram atribuídas notas (Tabela 1.1) de acordo com os sintomas observados, referente à classificação: resistente (R), medianamente susceptível (MS), susceptível (S) e altamente susceptível (AS). A Figura 1.1 exemplifica as folhas avaliadas de acordo com a nota atribuída.

**Tabela 1.1** - Nota atribuída à cada folha de acordo com o sintoma observado

<i>Nota atribuída</i>	<i>Sintoma observado</i>
1	sem sintoma de mosaico (R) <sup>i</sup>
2	mosaico leve, sem deformações foliares (MS) <sup>ii</sup>
3	mosaico intenso, sem deformações foliares (S) <sup>iii</sup>
4	mosaico severo, bolhas e deformações foliares (AS) <sup>iv</sup>

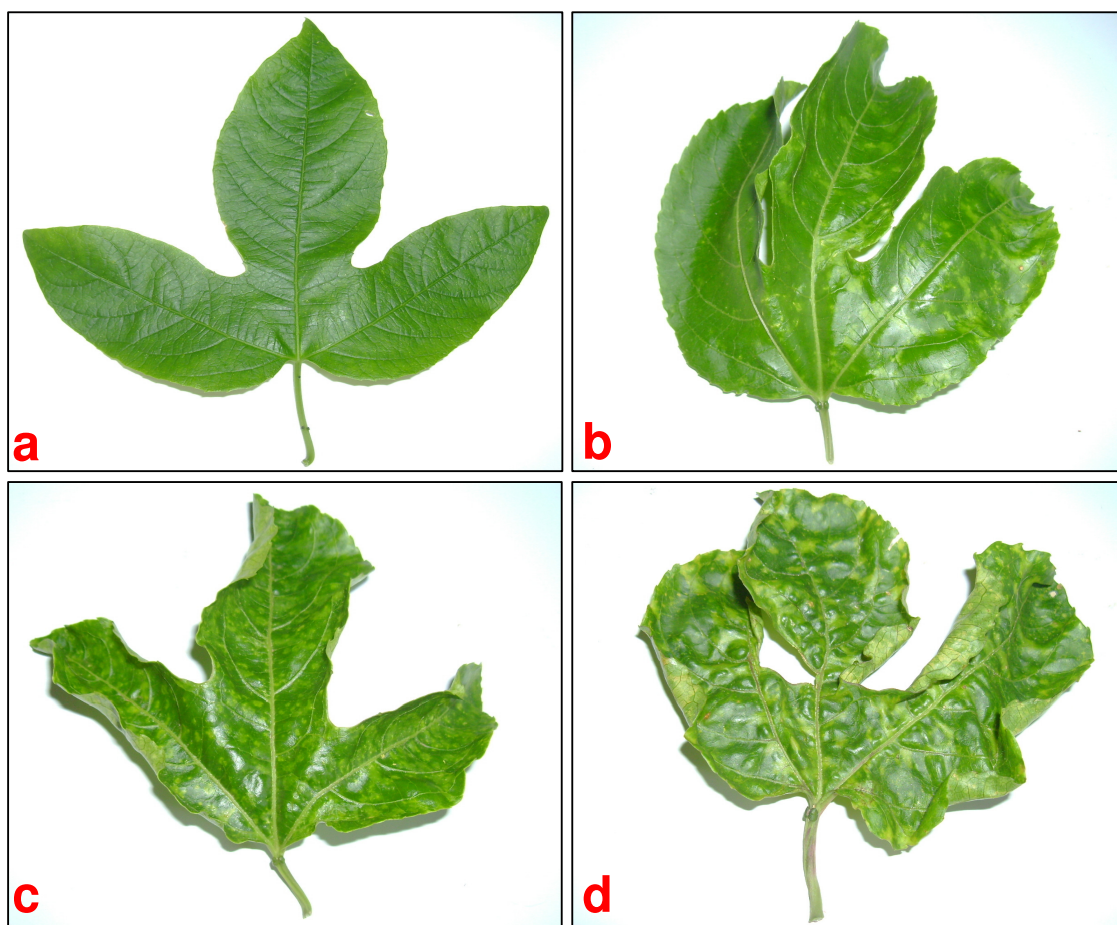
Fonte: Junqueira et al. (2003) com modificações

<sup>i</sup> (R) = Resistente

<sup>ii</sup> (MS) = Medianamente susceptível

<sup>iii</sup> (S) = Susceptível

<sup>iv</sup> (AS) = Altamente susceptível



**Figura 1.1** - Folhas classificadas de acordo com a escala da tabela 1.1. a = 1, b = nota 2, c = nota 3 e d = nota 4. Embrapa Cerrados/2007.



Após atribuir as notas para cada folha, calculou-se a média de cada planta. Com base nessa média obteve-se o gráfico da severidade da virose do endurecimento dos frutos nas plantas RC4 e nos seus respectivos genitores (Figuras 1.2 e 1.3).

### **Obtenção das plantas RC5**

Os retrocruzamentos para obter a geração RC5 (Plantas RC4 x *P. edulis* f. *flavicarpa*) foram realizados por cruzamentos artificiais, nos meses junho e julho de 2006. Plantas RC4 com maior resistência à virose e geneticamente mais próximas do genitor recorrente com base em marcadores moleculares foram utilizadas.

Em novembro de 2006, na casa de vegetação da Embrapa Cerrados, as sementes dos frutos gerados foram plantadas em duas bandejas de poliestireno estendido de 72 células, também semeou-se uma bandeja de *P. edulis* e uma de *P. setacea*. Utilizou-se, para o plantio, o substrato artificial Plantmax<sup>®</sup>, à base de vermiculita + casca de *Pinus* sp. e duas sementes por célula. Algumas mudas foram utilizadas para a inoculação mecânica de vírus e outras foram levadas para o campo.

As mudas, no primeiro mês, foram adubadas com Osmocote<sup>®</sup> (fórmula NPK 14-14-14), um fertilizante de liberação lenta, e dois meses após a semeadura, foram transplantadas para sacos preto de polietileno, perfurado, de 10 x 17 cm de dimensão.

### **Avaliação de virose nas plantas RC5**

As mudas obtidas pelo retrocruzamento foram transplantadas para o campo em março de 2007. A área escolhida para o plantio encontrava-se contaminada pelo fungo *Fusarium solani*, causador da podridão do pé ou podridão do coleto. Plantou-se uma fileira de 40 covas de plantas RC5 e metade de uma fileira (20 covas) de plantas *P. edulis*. Foram utilizadas duas mudas por cova, eliminando-se posteriormente, a planta menos vigorosa.

O sistema de condução adotado foi o espaldeira, onde as plantas foram conduzidas na forma vertical, de forma semelhante a uma cerca (Fachinello et al., 1996). O espaçamento de plantio utilizado foi de 2,5 x 2,5 m. A adubação foi realizada de acordo com as recomendações propostas por Junqueira et al. (1999). As plantas receberam, nas fases de crescimento e produção, os tratamentos culturais que se fizeram necessários, tais como podas, tutoramento, controle de plantas daninhas e tratamentos fitossanitários.

A irrigação no local foi feita por gotejamento, um sistema de irrigação

caracterizado por aplicar a água no solo, diretamente sobre a região radicular, em pequenas intensidades, porém, em alta frequência, de modo que mantenha a umidade do solo na zona radicular próximo à capacidade de campo (Bernardo, 1995).

As avaliações de severidade da virose nessas plantas foram feitas em setembro e novembro de 2007. A metodologia utilizada para essa avaliação foi igual à usada para as plantas RC4.

A inoculação mecânica de vírus foi realizada em maio de 2007, em 60 plantas RC5 e 26 plantas testemunhas (20 plantas *P.edulis* e 6 plantas *P.setacea*).

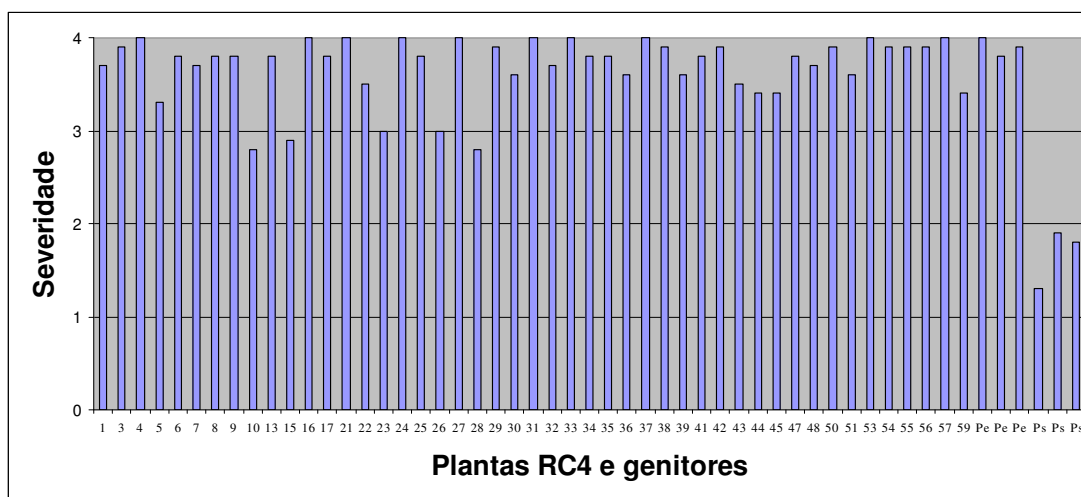
O inóculo para a transmissão mecânica foi preparado no almofariz com auxílio de um pistilo através de maceração do material foliar infetado (obtido na casa de vegetação de Fitopatologia da Embrapa Cerrados) na proporção de 2 g de tecido (folha) para 10 ml de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. Em seguida, polvilhou-se uma pequena quantidade de “celite” (abrasivo mecânico) nas folhas saudáveis das plantas. O vírus foi inoculado, friccionando as partes superiores das folhas com o dedo, onde continha o extrato. Foram inoculadas duas folhas por planta, utilizando-se preferencialmente as mais novas. Aproximadamente, 5 minutos após a inoculação, as plantas foram lavadas, a fim de que o abrasivo não prejudicasse a fotossíntese das folhas inoculadas.

Após 30 dias, foi realizada uma avaliação de incidência da virose nessas plantas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliação dos sintomas de virose nas plantas RC4

Os resultados da primeira avaliação da severidade das plantas RC4, em condições de campo são apresentados na Figura 1.2. Verifica-se a alta suscetibilidade do genitor recorrente *P. edulis* f. *flavicarpa* (nota média de 3,9) e a resistência do genitor *P. setacea* (nota média de 1,7). Com relação às plantas RC4, verifica-se uma suscetibilidade semelhante ao genitor recorrente (nota média de 3,7). Por outro lado, 62% das plantas vivas (20% das plantas morreram durante a condução do experimento) apresentaram severidade da virose menor que a apresentada pelo genitor recorrente. As plantas RC4 10, 15, 23, 26 e 28 apresentaram notas médias de severidade iguais ou inferiores a 3 (menor média comparando-se os dois meses avaliados).



**Figura 1.2** - Severidade da virose do endurecimento dos frutos em plantas RC4, no genitor recorrente (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e no genitor resistente (*Passiflora setacea*). A avaliação foi feita em novembro de 2006, utilizando escala de notas de 1 a 4, sendo 1 = sem sintoma de mosaico; 2 = mosaico leve e sem deformações foliares; 3 = mosaico intenso e sem deformações foliares e 4 = mosaico severo, bolhas e deformações foliares. Para cada planta RC4 foi calculada uma média das 10 folhas avaliadas. Embrapa Cerrados/2006.

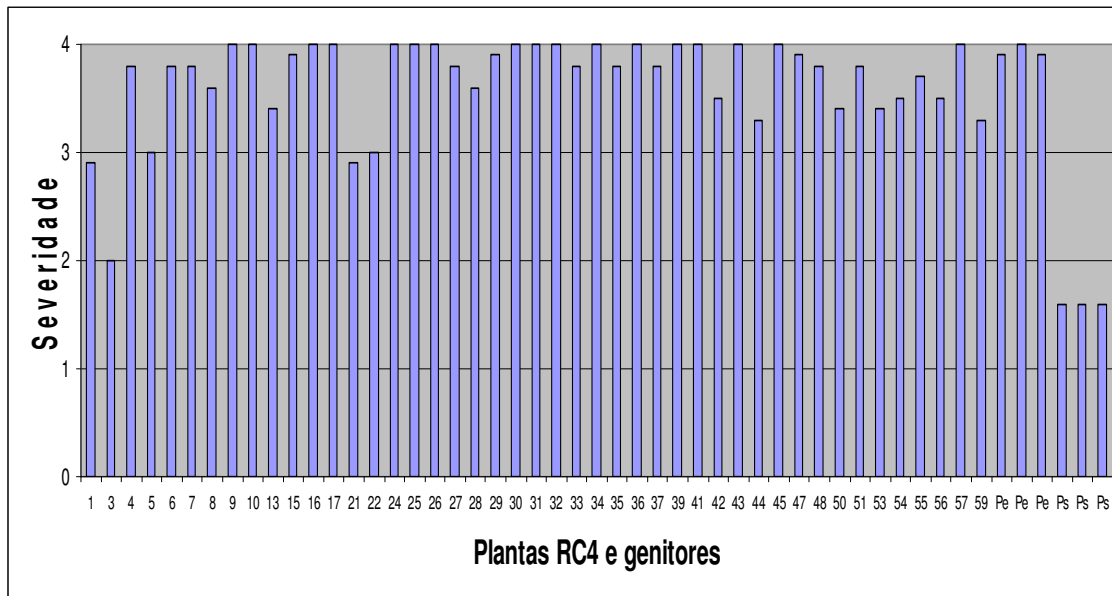
Os resultados da segunda avaliação da severidade das plantas RC4, em condições de campo são apresentados na Figura 1.3. Esta avaliação confirma a alta suscetibilidade do genitor recorrente *P. edulis* f. *flavicarpa* (nota média de 3,9) e a resistência do genitor *P. setacea* (nota média de 1,6) (Figura 1.4). Com relação às plantas RC4, como na primeira avaliação, verifica-se uma suscetibilidade semelhante ao genitor recorrente (nota média de 3,7). A porcentagem das plantas que morreram durante a condução do experimento aumentou para 24% e a das que apresentaram severidade da virose menor que a

apresentada pelo genitor recorrente diminuiu para 56%. As plantas RC4 1, 3, 5, 21 e 22 apresentaram notas médias de severidade iguais ou inferiores a 3.

Verifica-se as plantas mais resistentes em novembro de 2006 foram diferentes das plantas mais resistentes em janeiro de 2007. A explicação para este fato pode ser deficiências na acurácia e precisão do método de avaliação ou uma mudança no fenótipo de cada planta RC4 ao longo do tempo e a pequena diferença do nível de resistência das plantas, além das condições edafoclimáticas.

Segundo Laranjeira (2005), para uma boa avaliação deve-se considerar quatro atributos básicos (acurácia, precisão, reprodutibilidade e eficiência). Os dois primeiros atributos referem-se à qualidade da avaliação, o terceiro diz respeito à possibilidade de mais grupos de pesquisa utilizarem os mesmos métodos e o último atributo refere-se ao balanço entre a qualidade e o tempo de execução. A acurácia é a medida de quão próximo ao real estão as estimativas de um dado avaliador e precisão é a medida dos desvios de avaliação em relação às estimativas do próprio avaliador, ou seja, a precisão diz respeito a quanto um avaliador erra ao avaliar amostras do mesmo valor.

Na média das duas avaliações, as plantas que apresentaram as menores notas (<3,4) foram 1, 3, 5, 22 e 28.



**Figura 1.3** - Severidade da virose do endurecimento dos frutos em plantas RC4, no genitor recorrente (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e no genitor resistente (*Passiflora setacea*). A avaliação foi feita em janeiro de 2007, utilizando escala de notas de 1 a 4, sendo 1 = sem sintoma de mosaico; 2 = mosaico leve e sem deformações foliares; 3 = mosaico intenso e sem deformações foliares e 4 = mosaico severo, bolhas e deformações foliares. Para cada planta RC4 foi calculada uma média das 10 folhas avaliadas. Embrapa Cerrados/2007.



**Figura 1.4** - Genitor recorrente *P. edulis* f. *flavicarpa* (A) e genitor resistente *P. setacea* (B) evidenciando a suscetibilidade e resistência à virose do endurecimento dos frutos. Embrapa Cerrados/2007.

## Avaliação dos sintomas de virose nas plantas RC5

As Figuras 1.5 e 1.6 foram obtidas a partir das médias da severidade de virose do endurecimento dos frutos de dez folhas das 40 plantas RC5, 20 plantas de *P. edulis* e de três plantas de *P. setacea*, nos meses de setembro e novembro de 2007.

Na avaliação feita em setembro de 2007, o genitor recorrente apresentou a média 2,7, o genitor resistente 1,4 e as plantas RC5 2,0. Todas as médias das plantas RC5 nessa avaliação foram menores que a média (2,7) do genitor *P. edulis*.

Em novembro de 2007, verificou-se a média de 3,1 em *P. edulis*, 1,3 no *P. setacea* e 2,7 nas plantas RC5. Não foi possível avaliar a planta 14 desse retrocruzamento pelo fato dela estar desfolhada. Das 39 plantas RC5 avaliadas, observou-se que, em geral, a média dessas plantas foi maior que as médias avaliadas em setembro e 77% apresentaram severidade de virose menor que média do genitor recorrente (3,1).

Na média das duas avaliações em RC5, a menor nota foi 1,9 e 35% das plantas avaliadas em setembro apresentaram notas menores ou iguais à média do genitor recorrente. Já na avaliação de novembro de 2007, apenas uma planta teve nota menor ou igual a 1,9 (planta 40). As plantas RC5 classificadas como menos susceptíveis ao vírus do endurecimento dos frutos foram 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 16, 19, 20, 23, 27, 39 e 40 por apresentarem média inferior a 2,3 (menor média de *P. edulis* nas duas avaliações).

Esses resultados confirmam os resultados obtidos na avaliação das plantas RC4, demonstrando a alta susceptibilidade das plantas *P. edulis* à virose do endurecimento dos frutos, a resistência da espécie *P. setacea* e a semelhança das plantas RCs com o genitor recorrente. Abreu (2006) também verificou susceptibilidade ao vírus do endurecimento dos frutos em seis genótipos (EC-3-0, EC-L-7, Gigante Amarelo, RC-03, Redondão e Rubi Gigante) de maracujazeiro-azedo.

Esses resultados foram contrastantes em relação à avaliação da severidade do vírus do endurecimento dos frutos (*Passionfruit Woodiness Virus* – PWV) realizada por Miranda (2004) em 50 genótipos de maracujazeiro-azedo, seguindo também uma escala de notas de 1 a 4. Desses genótipos, 14 apresentaram-se resistentes (nota 1) e 36 foram considerados moderadamente resistentes (nota 2).

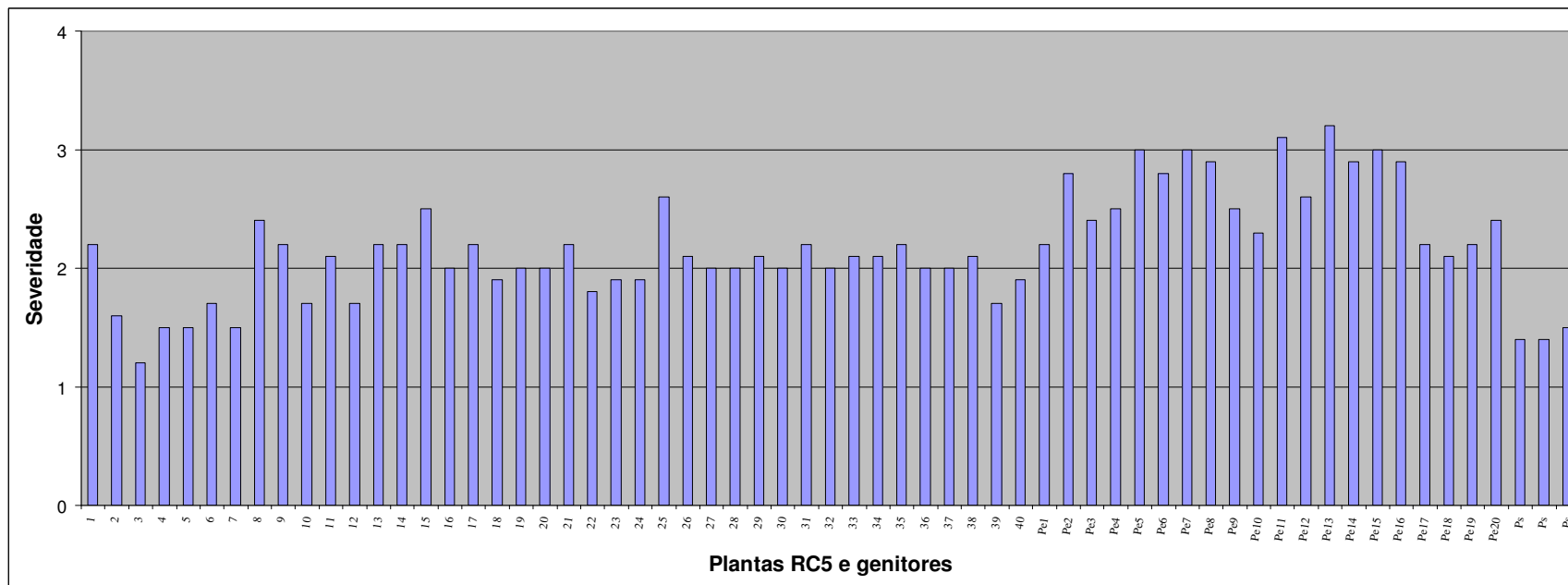
Alguns autores (Junqueira et al., 2003; Nascimento, 2003; Sousa, 2005) que trabalham com várias cultivares comerciais de maracujá-azedo, não constataram graus de resistência que pudessem oferecer resultados satisfatórios no controle de virose, bacteriose, antracnose e septoriose. Esses autores verificaram que a variabilidade para resistência a

essas doenças, entre as cultivares comerciais estudadas, é muito baixa. Junqueira et al. (2005) verificou resistência à virose nas folhas na espécie *P. setacea* e em plantas F1 do mesmo cruzamento base utilizado neste trabalho. Na geração RC1 as plantas foram classificadas como susceptíveis e a partir de RC2 a classificação foi de altamente susceptível.

Desse modo, acredita-se que resistência das plantas à virose foi diluída durante os retrocruzamentos conforme verificado por Junqueira et al. (2005) chegando a graus de susceptibilidade similares aos observado no recorrente, o que pode ser devido à natureza quantitativa ou poligênica dessa resistência. Por outro lado, foram identificadas plantas RC5 em níveis de resistência maiores que o genitor recorrente. Além disso, estas plantas RC5 tem um potencial de resistência à fusariose ou murcha (*Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*), uma doença de grande expressão econômica, principalmente na região Nordeste, a qual está sendo avaliada dentro do programa de melhoramento genético (Junqueira et al., 2006).

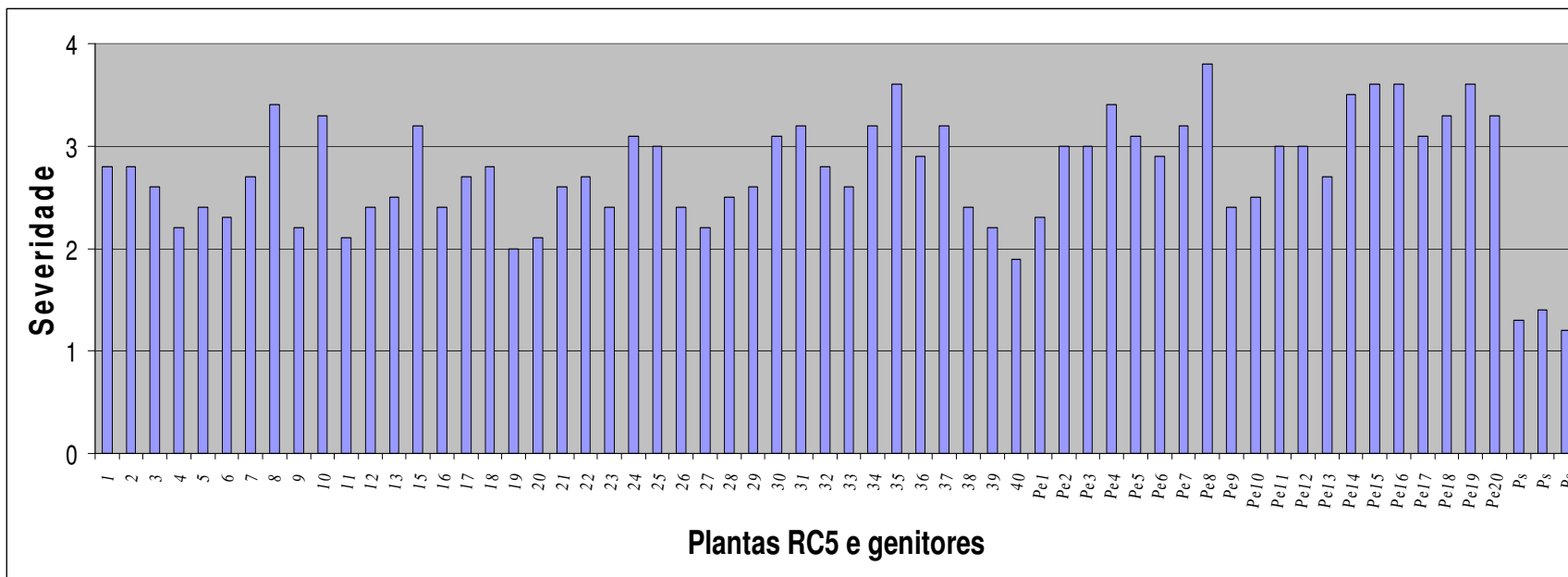
Na inoculação, em condições controladas, o vírus incidiu em 100 % das 60 plantas RC5 e 20 plantas *P.edulis*. Entretanto, não contaminou nenhuma planta *P. setacea*, confirmando a resistência dessa espécie em relação à espécie comercial e à geração de retrocruzamentos.

Ao avaliar em casa-de-vegetação, a incidência de sintomas de virose do endurecimento dos frutos em 62 materiais de nove genótipos superiores de maracujá-azedo, Pinto (2002) não observou diferenças estatísticas entre os genótipos, embora alguns genótipos tenham apresentado menor porcentagem de plantas doentes. Leão (2001) e Pinto (2002) em seus trabalhos com inoculação de mudas, observaram correlação positiva entre incidência e severidade, indicando que quanto maior a incidência maior a severidade e vice-versa. Também verificaram grande variabilidade na resposta dos genótipos ao vírus devido à concentração do PWV e pela heterogeneidade genética do gênero *Passiflora* (Novaes e Rezende, 1999). Viana (2007) também observou correlação positiva entre incidência e severidade, em seu trabalho de inoculação mecânica do vírus CABMV em maracujazeiro-azedo.



**Figura 1.5** - Severidade da virose do endurecimento dos frutos em plantas RC5, no genitor recorrente (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e no genitor resistente (*Passiflora setacea*). A avaliação foi feita em setembro de 2007, utilizando escala de notas de 1 a 4, sendo 1 = sem sintoma de mosaico; 2 = mosaico leve e sem deformações foliares; 3 = mosaico intenso e sem deformações foliares e 4 = mosaico severo, bolhas e deformações foliares. Para cada planta RC5 foi calculada uma média das 10 folhas avaliadas. Embrapa Cerrados/2007.





**Figura 1.6** - Severidade da virose do endurecimento dos frutos em plantas RC5, no genitor recorrente (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e no genitor resistente (*Passiflora setacea*). A avaliação foi feita em novembro de 2007, utilizando escala de notas de 1 a 4, sendo 1 = sem sintoma de mosaico; 2 = mosaico leve e sem deformações foliares; 3 = mosaico intenso e sem deformações foliares e 4 = mosaico severo, bolhas e deformações foliares. Para cada planta RC5 foi calculada uma média das 10 folhas avaliadas. Embrapa Cerrados/2007.

## CONCLUSÕES

A severidade da virose do endurecimento dos frutos nas populações RC4 e RC5 avaliadas em condições de campo foi muito próxima da severidade verificada no genitor recorrente, embora algumas plantas tenham se destacado como menos suscetíveis.

Como verificado nas populações RC4 e RC5, o grau de resistência à virose do genitor *P. setacea*, embora transferido eficientemente para as plantas F1, diminuiu ao longo dos ciclos de retrocruzamentos, possivelmente pelo fato de ser uma resistência de herança quantitativa.

Confirmou-se, com base na inoculação mecânica, a resistência do genitor silvestre *P.setacea* e a susceptibilidade do genitor recorrente e das plantas RC5.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, S. P. M. **Desempenho agrônômico, características físico-químicas e reação a doenças em genótipos de maracujazeiro-azedo cultivados no Distrito Federal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2006, 109p. Dissertação de Mestrado.

ANJOS, J.R.N. dos; JUNQUEIRA, N.T.V.; CHARCHAR, M.J.A. **Incidência e distribuição do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro no cerrado do Brasil central.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2001. 17p.

BERNARDO, S. **Manual de irrigação.** 6ª ed. Viçosa: UFV, Impr. Univ. 1995. 656 p.

FACHINELLO, J.C; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E. **Fruticultura: Fundamentos e práticas.** Pelotas: Editora UFPEL, 1996. 311p.

FALEIRO, F.G. JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: demandas para a pesquisa.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. 54p.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; BELLON, G.; PEIXOTO, J.R.; BARROS, A. M.; BORGES, T. A.; ALMEIDA, D. A.; COSTA, B. Obtenção de populações de retrocruzamentos e confirmação da fecundação cruzada no maracujazeiro com base em marcadores moleculares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 2005, Gramado. **Anais...** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2005a. 1 CD-ROM.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro - Desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2005b. p.187-209.

FERREIRA, F.R. Germoplasma de Passiflora no Brasil. In: SÃO JOSE, A.R. (Ed.) **Maracujá: produção e mercado.** Vitória da Conquista: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 1994. p. 24-26.

FERREIRA, F. R. Recursos genéticos de Passiflora. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 41-51.

JUNQUEIRA, N.T.V.; ANJOS, J.R.N.; SILVA, A.P.O.; CHAVES, R.C.; GOMES, A.C. Reação às doenças e produtividade de onze cultivares de maracujá-azedo cultivadas sem agrotóxico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.8, p. 1005-1010, 2003.

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; BERNACCI, L.C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81-108.

JUNQUEIRA, N.T.V.; FALEIRO, F.G.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. Uso de Espécies Silvestres de Passifloras no Pré-melhoramento do Maracujazeiro. In: LOPES, M.A.;

FÁVERO, A.P.; FERREIRA, M.A.J.F.; FALEIRO, F.G. **Curso Internacional de pré-melhoramento de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 2006. p. 133-137.

JUNQUEIRA, N. T. V.; ICUMA, I.M.; VERAS, M C M ; OLIVEIRA, M. A. S. ; ANJOS, J. R. N. Cultura do Maracujazeiro. In: Organização das Cooperativas do DF. (Org.). **Incentivo à fruticultura no Distrito Federal**. 2 ed. Brasília: OCDF, 1999, v. , p. 42-51.

LARANJEIRA, F.F. Problemas e perspectivas da avaliação de doenças como suporte ao melhoramento do maracujazeiro. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2005. p.161-184.

LEÃO, R. M. K. **Reação de genótipos de maracujá-azedo ao vírus do endurecimento dos frutos (“*Passionfruit woodiness virus*”- PWV) e à bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae***. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2001, 89 p. Dissertação de Mestrado.

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

MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R.S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 55-78.

MIRANDA, H.A. **Incidência e severidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Septoria passiflorae*, *Cladosporium herbarum* e *Passion fruit woodiness virus* em genótipos de maracujazeiro-azedo cultivados no Distrito Federal**. Brasília, 2004. 87p. Dissertação (mestrado).

NAKASONE, H. Y.; PAULL, R. E. **Tropical fruits**. New York: CAB International, 1999. 445 p. (Crop production science in horticulture series).

NASCIMENTO, A.C. **Produtividade, incidência e severidade de doenças em nove genótipos de maracujazeiro-azedo sob três níveis de adubação potássica no Distrito Federal**. 2003. 148 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2003.

NOVAES, Q. S.; REZENDE, J. A. M. Possível aplicação do DAS-ELISA indireto na seleção de maracujazeiro tolerante ao “*Passionfruit Woodiness Virus*”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 76-79, 1999.

OLIVEIRA, J.C.; CARNIER, P.E.; ASSIS, G.M. Preservação de germoplasma de maracujazeiros. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1, 1988. Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal, 1988. p.200.

PINTO, P.H.D. **Reação de genótipos de maracujá azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) ao vírus *Passionfruit Woodiness Virus* (PWV) e ao fungo *Septoria***

*passiflorae*. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2002, 62 p. Dissertação de Mestrado.

SOUSA, M. A. F. **Produtividade e reação a doenças em genótipos de maracujazeiro-azedo, cultivados no Distrito Federal**. Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília; 2005. 120p. Dissertação de Mestrado.

VIANA, C.A. dos S. **Resistência de genótipos de maracujá-azedo à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*) e à virose do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*)**. 2007. 210 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

## **CAPÍTULO 2**

### **CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS RC4 E RC5 DE MARACUJAZEIRO-AZEDO E QUANTIFICAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DO GENOMA RECORRENTE POR MEIO DE MARCADORES RAPD**

## CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS RC4 E RC5 DE MARACUJAZEIRO-AZEDO E DA RECUPERAÇÃO DO GENOMA RECORRENTE POR MEIO DE MARCADORES RAPD

**RESUMO** – O Brasil é o maior produtor de maracujá, entretanto, tem-se observado, nos últimos anos, redução na produtividade do maracujazeiro devido, principalmente, a fatores fitossanitários. O desenvolvimento de variedades resistentes a doenças é de extrema importância, sendo uma das atuais demandas para a pesquisa. A transferência de genes de resistência de espécies silvestres para as comerciais tem sido feita, na Embrapa Cerrados, por meio de hibridações interespecíficas seguidas de um programa de retrocruzamentos auxiliados por marcadores moleculares. Dentro deste programa, objetivou-se, neste, caracterizar plantas RC4 e RC5 [(*P.edulis* x *P.setacea*)x *P.edulis*] e verificar a recuperação do genoma recorrente com base em marcadores RAPD. A caracterização das plantas foi realizada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados. Selecionou-se 17 plantas RC4 e 16 plantas RC5 menos susceptíveis à virose do endurecimento dos frutos. Utilizou-se também folhas de três plantas *P. setacea* e *P. edulis*. Amostras de DNA de cada material genético foram amplificadas para obtenção de marcadores RAPD. Foram utilizados 12 *primers* decâmeros (OPD 02, OPE 09, 16 e 18, OPF 14 e 17, OPG 05 e 17 e OPH 08, 14, 16 e 17) para as plantas RC4 e 13 (OPD 02 e 19, OPE 09 e 16, OPF 17, 18 e 20, OPG 03 e 15 e OPH 04, 08, 14 e 17) para as plantas RC5. Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários para estimar as distâncias genéticas entre as diferentes plantas RC e os genitores recorrente (*P. edulis*) e resistente (*P. setacea*). Verificou-se uma alta porcentagem de marcadores polimórficos em consequência do cruzamento base interespecífico. A menor similaridade genética foi obtida entre as espécies *P. edulis* e *P.setacea*, evidenciando a grande distância genética dessas espécies. Na geração RC4, a maior similaridade genética (0,91) foi observada entre a planta 5 e o genitor recorrente *P.edulis*. Na geração RC5, a maior similaridade genética (0,96) foi obtida entre o genitor recorrente e a planta 9. Confirmando-se o que se esperava, com base em marcadores do DNA, as plantas RC5 apresentaram maior recuperação do genitor recorrente quando comparado com as plantas RC4. As plantas RC5 2, 6, 9 e 16 foram selecionadas por apresentarem, além da maior resistência à virose, maior recuperação do genoma recorrente.

**Palavras-chave:** retrocruzamentos, marcadores moleculares, similaridade genética, *P.edulis* f. *flavicarpa* e *P.setacea*.

## CHARACTERIZATION OF SOUR PASSION FRUIT PLANTS RC4 AND RC5 AND OF THE RECOVERY OF RECURRENT GENOME BASED ON RAPD MARKERS

**ABSTRACT** - Brazil is the largest producer of passion fruit, however, it has been observed in recent years, a reduction in the productivity due, mainly, to phytosanitary factors. The development of varieties resistant to diseases is extremely important and is one of the current demands for the research. The transfer of resistance genes from wild to commercial species has been made at Embrapa Cerrados through interspecific hybridations, followed by a backcrossing molecular marker-assisted program. In this program, the goal was to characterize plants RC4 and RC5 [*P. edulis* x *P. setacea*] x *P. edulis*] and to verify the recovery of recurrent genome based on RAPD markers. The characterization of the plants was carried on at Embrapa Cerrados Laboratory of Genetics and Molecular Biology. There were selected 17 RC4 plants and 16 RC5 plants less susceptible to the woodiness virus. It was also used leaves of three plants *P. setacea* and *P. edulis*. DNA samples of each genetic material were amplified to obtain RAPD markers. There were used 12 decamer primers (OPD 02, OPE 09, 16 and 18, OPF 14 and 17, OPG 05 and 17 and OPH 08, 14, 16 and 17) for plants RC4 and 13 (OPD 02 and 19, OPE 09 and 16, OPF 17, 18 and 20, OPG 03 and 15 and OPH 04, 08, 14 and 17) for plants RC5. The RAPD markers generated were converted into a matrix of binary data to estimate the genetic distances from different plants RC, and the recurrent (*P. edulis*) and resistant genitors (*P. setacea*). There was a high percentage of polymorphic markers as a result of interspecific base crossing. The smallest genetic similarity was obtained between species *P. edulis* and *P. setacea*, highlighting the large genetic distance of these commercial and wild varieties, respectively. In generation RC4, the major genetic similarity (0.91) was observed between plant 5 and the recurrent genitor *P. edulis*. In generation RC5, the major genetic similarity (0.96) was obtained between the recurrent genitor and plant 9. Confirming what was expected, based on DNA markers, plants RC5 showed greater recovery of recurrent genitor compared with plants RC4. Plants RC5 2, 6, 9 and 16 had been selected for presenting greater viruses resistance, besides greater recovery of recurrent genome.

Keywords: backcrossing, molecular markers, genetic similarity, *P. edulis* f. *flavicarpa* and *P. setacea*.



## INTRODUÇÃO

O cultivo do maracujá tem evoluído muito rapidamente no Brasil, sendo cultivado em quase todo território nacional. Entretanto, tem-se observado, nos últimos anos, redução na produtividade do maracujazeiro devido, principalmente, à ocorrência de doenças nessa cultura, depreciando a qualidade do fruto, e conseqüentemente diminuindo o seu valor comercial. Para modificar este quadro, o desenvolvimento de variedades resistentes a doenças é de extrema importância, sendo uma das atuais demandas para a pesquisa (Faleiro et al., 2005; Faleiro et al. 2006).

O melhoramento do maracujazeiro está diretamente relacionado ao fruto, focalizando três pontos principais: melhoramento visando atender às exigências do mercado “qualidade”, aumento da produtividade e resistência a doenças (Pio Viana & Gonçalves, 2005).

Estudos de melhoramento genético, normalmente, visam ao desenvolvimento de materiais superiores, principalmente com relação a caracteres de interesse agrônômico, e tendem a utilizar a hibridação intraespecífica para a transferência de genes de interesse (Bruckner, 1997).

Espécies silvestres de maracujá são alternativas para a ampliação da base genética da resistência, entretanto, trabalhos de melhoramento genético são necessários para combinar a resistência com características de produtividade e qualidade de frutos. A transferência de genes de resistência de espécies silvestres para as comerciais tem sido feita, na Embrapa Cerrados, por meio de hibridações interespecíficas seguidas de um programa de retrocruzamentos auxiliados por marcadores moleculares (Faleiro et al., 2004a, Faleiro et al., 2004b).

A utilização de marcadores moleculares em programas de introgressão de genes por retrocruzamento é o exemplo mais concreto de melhoramento genético assistido por marcadores (Guimarães & Moreira, 1999). O objetivo é utilizar marcadores moleculares distribuídos ao longo de todo o genoma para genotipar plantas obtidas por retrocruzamentos (RC) juntamente com o genitor recorrente. A escolha dos marcadores a serem utilizados pode ser feita por acaso ou pode-se utilizar dados de mapeamento genético para selecionar aqueles uniformemente distribuídos ao longo dos grupos de ligação. Após a genotipagem das plantas RC e do genitor recorrente, aquelas que possuem o gene que está sendo introduzido e constituição genética mais próxima do genitor recorrente, são selecionadas para o próximo ciclo de retrocruzamentos (Faleiro, 2003).

Tais marcadores têm sido propostos para auxiliar a recuperação do genoma recorrente por meio da metodologia de genótipos gráficos (Young & Tanksley, 1989). Dessa forma, o número de retrocruzamentos necessários para a recuperação do fenótipo recorrente é reduzido de forma acentuada, acelerando o desenvolvimento de variedades melhoradas (Openshaw et al., 1994).

Neste trabalho, objetivou-se caracterizar plantas RC4 e RC5 e verificar a recuperação do genoma recorrente por meio de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

## MATERIAL E MÉTODOS

A caracterização das plantas RC4 e RC5, utilizando marcadores RAPD foi realizada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados, Planaltina-DF.

A partir de uma população original de 59 plantas RC4, foram selecionadas 17 plantas (Tabela 2.1) com base na resistência a virose. No caso da população RC5, foram caracterizadas 16 plantas (Tabela 2.2) de uma população de 40 plantas, selecionadas com base nos resultados de maior nível de resistência à virose do endurecimento dos frutos obtidos no capítulo 1 deste trabalho. As plantas RC4, RC5 e seus genitores (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e *Passiflora setacea*) foram caracterizadas com base nos marcadores moleculares. Folhas em estágio intermediário de maturação de cada material genético foram coletadas e o DNA genômico foi extraído a partir do método CTAB modificado (Faleiro et al., 2003) e validado por Bellon et al. (2007). A concentração e a quantidade do DNA foram estimadas por espectrofotometria a 260 nm (Sambrook et al., 1989) e a relação A260/A280 utilizada para avaliar a pureza e qualidade do DNA extraído.

Amostras de DNA de cada material genético foram amplificadas para obtenção de marcadores RAPD. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13  $\mu$ L, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 100  $\mu$ M de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4  $\mu$ M de um *primer* (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Foram utilizados os *primers* decâmeros OPD (02), OPE (09, 16 e 18), OPF (14 e 17), OPG (05 e 17) e OPH (08, 14, 16 e 17) para as plantas RC4 (Tabela 2.3) e OPD (02 e 19), OPE (09 e 16), OPF (17, 18 e 20), OPG (03, e 15) e OPH (04, 08, 14 e 17) para as plantas RC5 (Tabela 2.5).

As amplificações foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência: 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 35 °C e 90 segundos a 72 °C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de seis minutos a 72 °C, e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C. Após a amplificação, adicionou-se a cada amostra, 3  $\mu$ L de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual estimou-se as distâncias genéticas entre as diferentes plantas RC e os genitores recorrente e resistente, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li (1979), utilizando-se o Programa Genes (Cruz, 1997). A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando-se o método do UPGMA (*Unweighted pair-group arithmetic average*) como critério de agrupamento, e a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS (SAS INSTITUTE INC., 1989) e Statistica (STATSOFT INC., 1999).

**Tabela 2.1** - Plantas RC4 analisadas. Embrapa Cerrados/2007.

Número	Plantas
1	RC4 P1
2	RC4 P3
3	RC4 P5
4	RC4 P13
5	RC4 P21
6	RC4 P22
7	RC4 P28
8	RC4 P33
9	RC4 P42
10	RC4 P43
11	RC4 P44
12	RC4 P45
13	RC4 P50
14	RC4 P53
15	RC4 P54
16	RC4 P56
17	RC4 P59
18	<i>P. edulis</i> (GA-2, AR-1, EC2-O)
19	<i>P. setacea</i> (CPAC M-12-03)

**Tabela 2.2** - Plantas RC5 analisadas. Embrapa Cerrados/2007.

Número	Plantas
1	RC5 P2
2	RC5 P3
3	RC5 P4
4	RC5 P5
5	RC5 P6
6	RC5 P7
7	RC5 P9
8	RC5 P11
9	RC5 P12
10	RC5 P16
11	RC5 P19
12	RC5 P20
13	RC5 P23
14	RC5 P27
15	RC5 P39
16	RC5 P40
17	<i>P. edulis</i> (GA-2, AR-1, EC2-O)
18	<i>P. setacea</i> (CPAC M-12-03)

Para complementar a caracterização das plantas RC, foram avaliados a massa fresca média e o teor médio de sólidos solúveis (°Brix) dos frutos das plantas RC4 e RC5.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Plantas RC4

A partir dos 12 *primers* decâmeros, foram gerados 146 marcadores RAPD, obtendo-se a média de 12,2 marcadores por *primer*. Do total de marcadores, 117 (80,14 %) foram polimórficos (Tabela 2.3), fato que pode ser explicado pela diferença genética da população RC4 em relação ao genitor resistente (*P. setacea*). A origem das plantas RC4 de um cruzamento base interespecífico também explica a alta porcentagem de marcadores polimórficos. A similaridade genética entre as plantas RC4 e seus genitores variaram entre 0,38 e 0,91 (Tabela 2.4). O menor valor de similaridade genética (0,38) foi obtido entre as espécies *P. edulis* e *P. setacea*, evidenciando a grande distância genética dessas variedades comercial e silvestre, respectivamente. A maior similaridade genética (0,91) foi obtida entre a planta 5 da geração RC4 e genitor recorrente *P. edulis* f. *flavicarpa*.

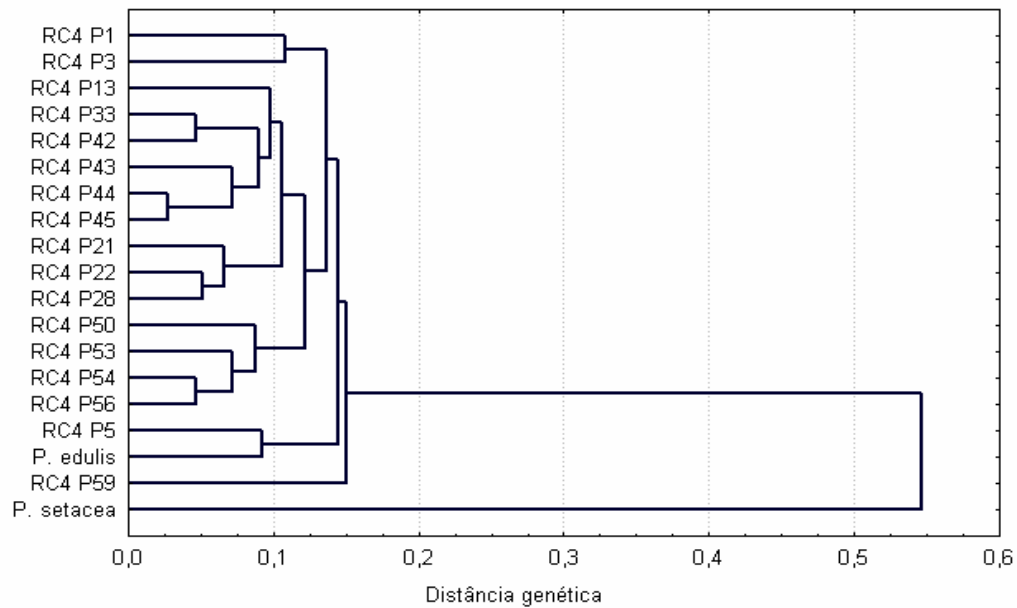
**Tabela 2.3** - *Primers* utilizados para obtenção dos marcadores RAPD e respectivos número de bandas polimórficas e monomórficas. Embrapa Cerrados/2007.

<b>Primer</b>	<b>Seqüência 5' → 3'</b>	<b>Nº de bandas polimórficas</b>	<b>Nº de bandas monomórficas</b>
OPD-02	GGACCCAACC	2	3
OPE-09	CTTCACCCGA	10	0
OPE-16	GGTGACTGTG	6	3
OPE-18	GGA CTGCAGA	0	6
OPF-14	TGCTGCAGGT	15	3
OPF-17	AACCCGGGAA	17	0
OPG-05	CTGAGACGGA	4	3
OPG-17	ACGACCGACA	15	1
OPH-08	GAAACACCCC	8	4
OPH-14	ACCAGGTTGG	9	0
OPH-16	TCTCAGCTGG	23	1
OPH-17	CACTCTCCTC	8	5
<b>Total</b>		<b>117</b>	<b>29</b>

**Tabela 2.4** - Matriz de similaridade entre 17 plantas RC4 e seus genitores *Passiflora edulis* e *P. setacea*, calculadas com base no coeficiente de Nei e Li, utilizando-se 146 marcadores RAPD. Embrapa Cerrados/2007.

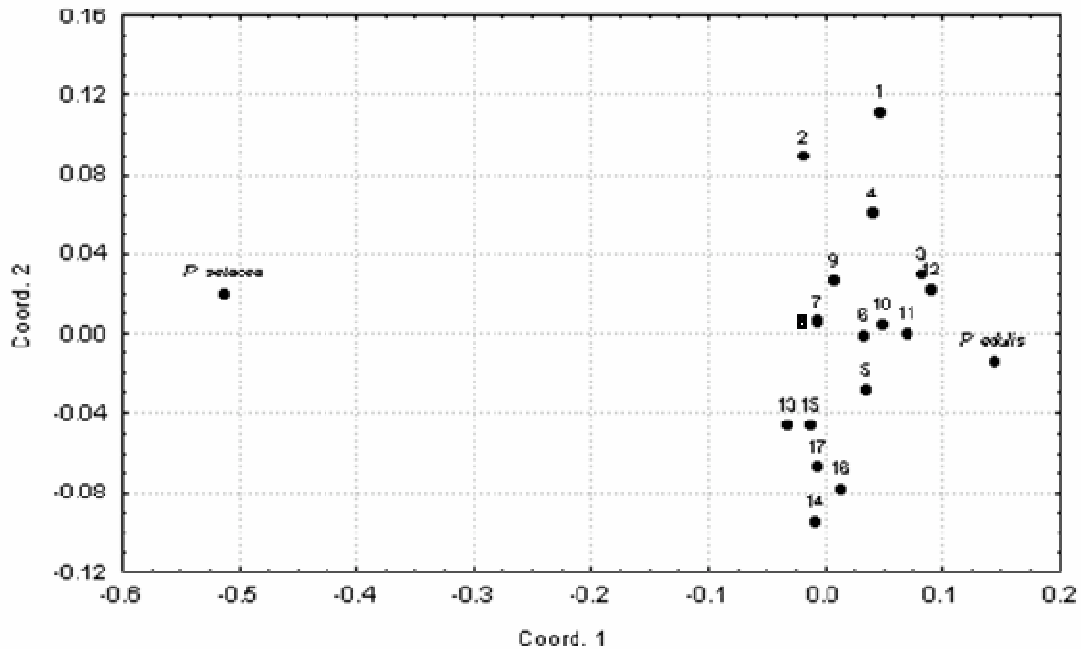
Nº	1	3	5	13	21	22	28	33	42	43	44	45	50	53	54	56	59	Pe	Ps
1	-																		
3	0,89	-																	
5	0,86	0,88	-																
13	0,89	0,90	0,90	-															
21	0,88	0,87	0,88	0,90	-														
22	0,89	0,90	0,92	0,91	0,93	-													
28	0,82	0,83	0,90	0,88	0,94	0,95	-												
33	0,86	0,90	0,86	0,89	0,89	0,95	0,90	-											
42	0,87	0,88	0,87	0,92	0,90	0,93	0,88	0,95	-										
43	0,85	0,85	0,86	0,90	0,87	0,92	0,86	0,90	0,94	-									
44	0,86	0,88	0,87	0,89	0,87	0,93	0,87	0,92	0,91	0,94	-								
45	0,87	0,89	0,88	0,92	0,87	0,92	0,86	0,90	0,88	0,91	0,97	-							
50	0,83	0,86	0,86	0,86	0,90	0,90	0,89	0,92	0,87	0,88	0,91	0,89	-						
53	0,83	0,85	0,83	0,84	0,89	0,89	0,83	0,88	0,88	0,88	0,86	0,86	0,92	-					
54	0,87	0,85	0,88	0,84	0,87	0,90	0,86	0,92	0,91	0,89	0,88	0,85	0,91	0,92	-				
56	0,84	0,84	0,83	0,85	0,87	0,90	0,84	0,90	0,88	0,86	0,89	0,87	0,91	0,94	0,95	-			
59	0,83	0,81	0,84	0,86	0,89	0,89	0,88	0,84	0,85	0,85	0,81	0,82	0,85	0,88	0,86	0,83	-		
Pe	0,83	0,82	0,91	0,87	0,85	0,88	0,82	0,84	0,86	0,86	0,88	0,84	0,80	0,81	0,81	0,82	0,85	-	
Ps	0,43	0,47	0,41	0,46	0,41	0,44	0,48	0,47	0,47	0,46	0,46	0,40	0,48	0,49	0,48	0,46	0,50	0,38	-

Na análise de agrupamento com base nas distâncias genéticas (Figura 2.1), como esperado, verificou-se a formação de um grupo contendo o genitor recorrente e as plantas RC4 e outro contendo o genitor resistente.



**Figura 2.1** - Análise de agrupamento de 17 plantas RC4 e seus genitores *Passiflora edulis* e *P. setacea*, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 146 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento. Embrapa Cerrados/2007.

A dispersão gráfica com base na matriz de distâncias genéticas (Figura 2.2) demonstra a separação dos genitores, que se localizam em pontos extremos do gráfico além da aproximação da população RC4 em relação ao *P. edulis* (genitor recorrente). Este gráfico ilustra o processo de recuperação do genoma recorrente pelo programa de retrocruzamentos.



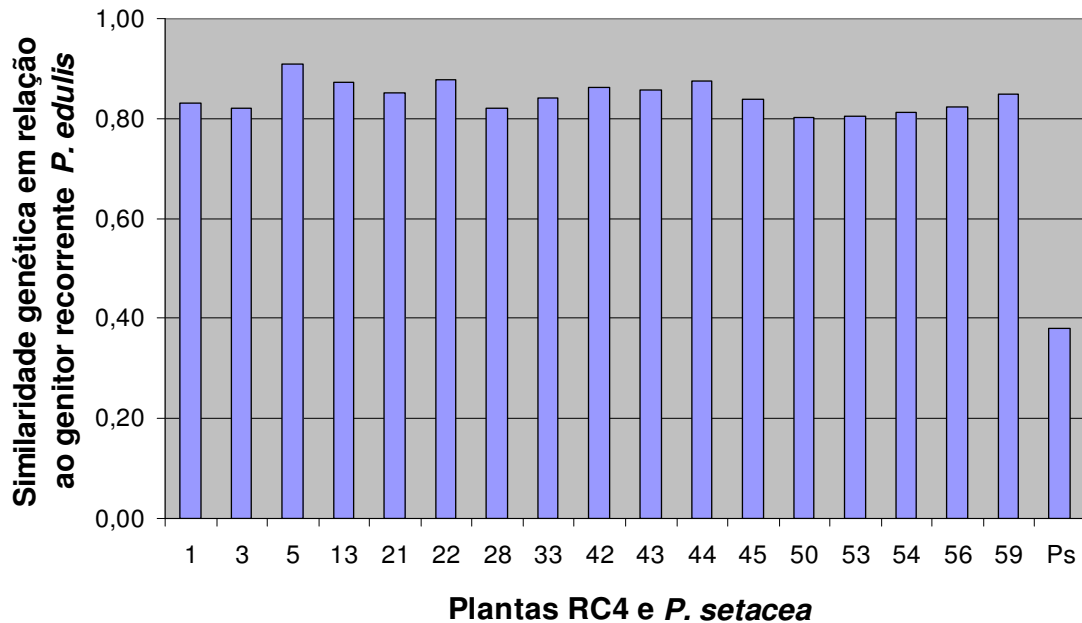
**Figura 2.2** - Dispersão gráfica de 17 plantas RC4 e seus genitores *Passiflora edulis* e *P. setacea* com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 146 marcadores RAPD. Os números correspondem aos acessos da Tabela 2.1. Embrapa Cerrados/2007.

Em RC4, teoricamente, espera-se uma recuperação do genoma recorrente de 96,875%, e em RC5 98,437 %, considerando a utilização do mesmo genitor recorrente. No caso do maracujazeiro, considerando os problemas de autoincompatibilidade, a estratégia do programa de retrocruzamentos é modificar, a cada ciclo de retrocruzamentos, a variedade comercial dentro da espécie *P. edulis* f. *flavicarpa*. As variedades utilizadas no programa são GA-2, AR-1 e EC2-O. Esta alternância do genitor recorrente explica a menor recuperação do genoma recorrente nas plantas RC4.

Esse fato pode ser verificado na Figura 2.3 que mostra as similaridades genéticas das plantas RC4 e do genitor resistente em relação ao genitor recorrente. A média de recuperação do genitor recorrente GA-2 foi de 84,4% nas plantas RC4. As plantas RC4



mais próximas do genitor recorrente foram as 5, 22 e 44.



**Figura 2.3** - Similaridade genética de 17 plantas RC4 e do genitor resistente *P. setacea* em relação ao genitor recorrente *P. edulis* GA-2. Embrapa Cerrados/2007

### Plantas RC5

Os 14 primers decâmeros geraram o total de 120 marcadores RAPD, perfazendo uma média de 8,6 marcadores por primer. Dos 120 marcadores, apenas 34 (28,3 %) foram monomórficos (Tabela 2.5). Observa-se um alto polimorfismo principalmente pelo fato das plantas *P. edulis* e RC5 divergirem da espécie *P. setacea*. Elevado polimorfismo tem sido verificado em diversos trabalhos como, por exemplo, o de Pio Viana et al. (2003), comprovando assim, a alta variabilidade genética interespecífica. Segundo Ganga et al. (2004), um dos fatores que podem explicar a elevada diversidade genética no maracujazeiro é o fato da maioria das espécies serem alógamas, com presença de um sistema genético de autoincompatibilidade que favorece a polinização cruzada e, conseqüentemente, o fluxo gênico entre genótipos distintos da mesma espécie ou de espécies diferentes.

As distâncias genéticas entre as plantas RC5 e seus genitores variaram entre 0,33 e 0,96 (Tabela 2.6). A média de recuperação do genitor recorrente GA-2 foi de 92,19 % nas plantas RC5. Assim como nos resultados obtidos em RC4, a maior distância genética (0,33) foi observada entre as espécies *P. setacea* e *P. edulis*. A menor distância genética

(0,96) foi obtida entre a planta RC5 9 e o genitor recorrente (*P.edulis* f. *flavicarpa*).

**Tabela 2.5** - Primers utilizados para obtenção dos marcadores RAPD e respectivos números de bandas polimórficas e monomórficas. Embrapa Cerrados/2007.

Primer	Seqüência 5'→3'	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas monomórficas
OPD-02	GGACCCAACC	4	3
OPD-19	CTGGGGACTT	7	3
OPE-09	CTTCACCCGA	3	4
OPE-16	GGTGACTGTG	9	2
OPF-16	GGAGTACTGG	6	2
OPF-17	AACCCGGGAA	6	3
OPF-18*	TCCCCGGGTT	0	5
OPF-20	GGTCTAGAGG	4	0
OPG-03	GAGCCCTCCA	12	0
OPG-15	ACTGGGACTC	7	1
OPH-04	GGAAGTCGCC	4	2
OPH-08	GAAACACCCC	5	4
OPH-14	ACCAGGTGG	9	3
OPH-17	CACTCTCCTC	10	2
<b>Total</b>		<b>86</b>	<b>34</b>

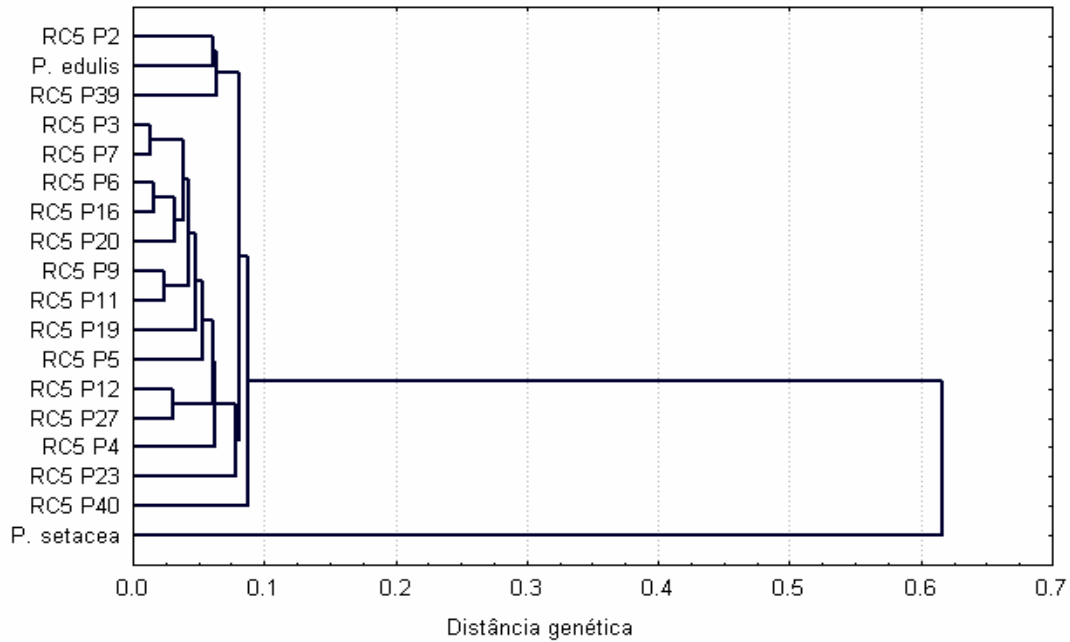
\* não amplificou o *P. setacea*

**Tabela 2.6** - Matriz de similaridade entre 16 plantas RC5 e seus genitores *Passiflora edulis* e *P. setacea*, calculadas com base no coeficiente de Nei e Li, utilizando-se 120 marcadores RAPD. Embrapa Cerrados/2007

Nº	2	3	4	5	6	7	9	11	12	16	19	20	23	27	39	40	Pe	Ps
2	-																	
3	0,92	-																
4	0,89	0,96	-															
5	0,95	0,95	0,95	-														
6	0,95	0,96	0,93	0,94	-													
7	0,92	0,99	0,94	0,94	0,96	-												
9	0,93	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96	-											
11	0,94	0,94	0,92	0,94	0,94	0,95	0,98	-										
12	0,89	0,94	0,94	0,90	0,92	0,95	0,93	0,93	-									
16	0,95	0,97	0,93	0,95	0,98	0,98	0,97	0,97	0,94	-								
19	0,92	0,94	0,94	0,95	0,96	0,95	0,95	0,94	0,92	0,97	-							
20	0,91	0,95	0,92	0,95	0,95	0,95	0,97	0,95	0,92	0,98	0,95	-						
23	0,89	0,94	0,90	0,91	0,95	0,94	0,93	0,90	0,89	0,94	0,89	0,94	-					
27	0,93	0,96	0,93	0,95	0,97	0,97	0,94	0,93	0,97	0,96	0,95	0,95	0,94	-				
39	0,94	0,90	0,88	0,93	0,93	0,89	0,92	0,91	0,92	0,93	0,89	0,95	0,89	0,95	-			
40	0,87	0,91	0,92	0,93	0,92	0,91	0,93	0,89	0,93	0,91	0,90	0,91	0,91	0,94	0,91	-		
Pe	0,94	0,92	0,90	0,92	0,94	0,91	0,96	0,93	0,89	0,94	0,90	0,92	0,92	0,92	0,93	0,91	-	
Ps	0,37	0,40	0,40	0,39	0,37	0,38	0,36	0,38	0,41	0,37	0,39	0,40	0,37	0,41	0,43	0,40	0,33	-

Verifica-se, na análise de agrupamento (Figura 2.4), a formação de um grupo com as plantas RC5 e o genitor *P. edulis* e um grupo contendo o genitor resistente *P. setacea*, o que foi observado também em RC4. Comparando-se as análises de agrupamentos das

populações RC4 (Figura 2.1) e RC5 (Figura 2.4) verifica-se que a distância genética dentro do grupo de plantas RC4 é maior que a distância dentro do grupo de plantas RC5, o que era esperado considerando o sucesso da recuperação do genoma recorrente, dentro do programa de retrocruzamentos.

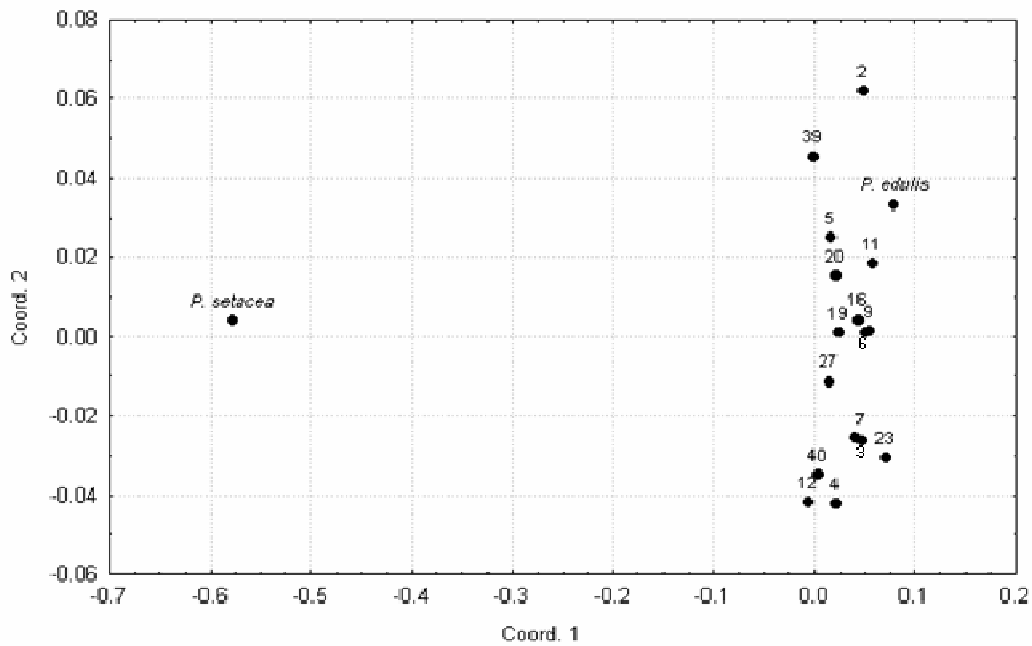


**Figura 2.4** - Análise de agrupamento de 16 plantas RC5 e seus genitores *Passiflora edulis* e *P. setacea*, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 120 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

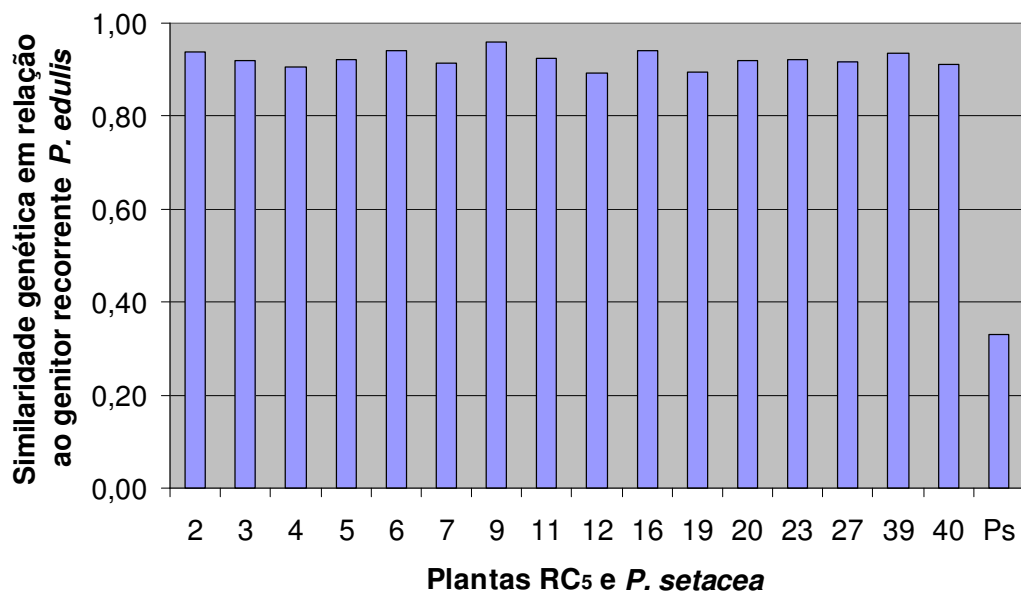
Ao comparar a dispersão gráfica baseada na matriz de distâncias genéticas das 16 plantas RC5 e seus genitores (Figura 2.5) com a mesma figura obtida para as 17 plantas RC4 e seus genitores (Figura 2.2), observa-se a maior aproximação das plantas RC5 em relação ao genitor recorrente, além da maior uniformidade de distribuição dessas plantas e o genitor resistente no outro ponto extremo da figura. Também pode-se observar isso na Figura 2.6 onde há maior similaridade genética da geração RC5 em relação ao genitor recorrente, diferentemente do que ocorre com o genitor resistente.

As hibridações inter-específicas e do programa de retrocruzamentos foram confirmadas com base em marcadores moleculares RAPD. Outra utilidade dos marcadores moleculares tem sido o acompanhamento e a recuperação mais rápida do genitor recorrente (Faleiro et al., 2007). Dessa maneira, verifica-se que as plantas 2, 6, 9 e 16 (Figura 2.6) são as mais próximas do genitor recorrente, sendo, portanto selecionadas como plantas mais

promissoras para serem genitoras de próximos cruzamentos.



**Figura 2.5** -Dispersão gráfica de 16 plantas RC5 e seus genitores *Passiflora edulis* e *P. setacea* com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 120 marcadores RAPD. Os números correspondem aos acessos da Tabela 2.2. Embrapa Cerrados/2007.



**Figura 2.6** - Similaridade genética de 16 plantas RC5 e do genitor resistente *P. setacea* em relação ao genitor recorrente *P. edulis* GA-2. Embrapa Cerrados/2007.

## Características dos frutos RC4 e RC5

As plantas RC5 apresentam folhas, flores e frutos semelhantes ao genitor recorrente (Figura 2.7). Essas características tendem a aproximar-se das características desse genitor à medida que ocorrem os retrocruzamentos como já foram observadas até a geração RC4 por Junqueira et al. (2005). Na Figura 2.8, nota-se a similaridade na cor e no formato das flores das plantas RC5 e do genitor *P.edulis*.

A produção de frutos em RC5 até o momento, tem sido maior que em RC4. A massa fresca dos frutos RC4 variou de 41,03 a 279,51 g, resultando em uma média de 148 g; nos frutos RC5, a média da massa fresca foi de 200,3 g, havendo uma variação de 77,69 a 290,77 g e em *P. edulis*, os frutos tiveram massa fresca entre 74,48 e 268,34 g, obtendo a média 183 g. Quanto ao teor de sólidos solúveis totais, os frutos RC4 apresentaram valores entre 8 e 14° Brix e uma média de 10° Brix, os frutos RC5 tiveram variação entre 10 e 15,4° Brix, sendo a média 13° Brix e os frutos de *P.edulis* apresentaram o teor entre 9 e 14° Brix e a média de 12,3°Brix.

Nota-se que há uma grande variação das características físico-químicas dos frutos entre as espécies e também entre as plantas da mesma espécie. Em avaliações da massa fresca de frutos de maracujá-azedo, Sousa (2005) obteve médias entre 183 e 290g, Rangel (2002) observou uma variação de 166g a 194 g, Abreu (2006) verificou médias entre 120,04 e 153,40 g e Veras (1997) obteve média de 163,3 g. As seis cultivares de maracujá avaliadas por Melo (1999) apresentaram massa média de 64,68 a 135,06g. Alguns autores citam médias de massa fresca ainda menores de 44 a 160 g (Meletti e Maia, 1999) e de 65 a 96,4g (Colauto et al.,1986; Müller et al., 1979; Ferreira et al., 1975). Em geral, verificou-se que os frutos avaliados neste trabalho, apresentaram massa fresca superior a outros trabalhos já realizados.

Nos frutos avaliados, alguns valores de teor de sólidos solúveis totais (SST) encontraram-se abaixo dos citados por Meletti e Maia (1999), Medeiros (2005), Abreu (2006), Fortaleza (2002) e Melo (1999) que obtiveram médias de 13 a 18 °Brix, 13,27 a 15,57° Brix; 12,81 a 13,47° Brix; 14,2 a 15° Brix e 14,56 a 17,56° Brix, respectivamente.



**Figura 2.7** - Flor e frutos de um híbrido RC5 de *P.edulis* f. *flavicarpa* x *P.setacea*.



**Figura 2.8** - Semelhança do formato e cor das flores de um híbrido RC5 (a) e *P. edulis* (b)

## **CONCLUSÕES**

A utilização de marcadores RAPD possibilitou a caracterização molecular das plantas RC4 e RC5 quantificando a recuperação do genoma recorrente e evidenciando a elevada distância genética entre os genitores do cruzamento base interespecífico.

As plantas RC4 que apresentaram maior recuperação do genitor recorrente foram 5, 22 e 44 e na caracterização das plantas RC5, as que se destacaram foram 2, 6, 9 e 16.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, S. P. M. **Desempenho agrônômico, características físico-químicas e reação a doenças em genótipos de maracujazeiro-azedo cultivados no Distrito Federal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2006, 109p. Dissertação de Mestrado.

BELLON, G. ; Faleiro, F, G ; FERREIRA, C.F ; KARIA, C, T ; FONSECA, K.G ; SANTOS, E. C.; SANTOS,J.R.P ; TEIXEIRA, M.A ; JUNQUEIRA, K. P. **Validação e otimização de protocolo simplificado para extração de DNA a partir de tecido foliar.** In: 4º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2007, São Lourenço- MG. 2007.

BRUCKNER, C.H. **Perspectivas do melhoramento do maracujazeiro.** In: Manica, I. (Ed). Maracujá: temas selecionados. Porto Alegre, RS: Cinco Continentes, 1997.

COLAUTO, N.M.; MANICA, I.; RIBOLDI, J.; MIELNICZUK, J. Efeito do N, P e K sob a produção, qualidade e estado nutricional do maracujazeiro amarelo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, n.7, p.691-695, 1986.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística.** Viçosa: UFV, 1997. 442p.

FALEIRO, F.G. **Seleção assistida por marcadores moleculares – Diferentes aplicações. Mesa Redonda.** In: 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Porto Seguro, Bahia, 2003. Unidade CD. 2003. 6p.

FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.S.G.; CORDEIRO, M.C.R., KARIA, C.T. **Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. (Comunicado Técnico No.92) 6p.

FALEIRO, F.G. JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: demandas para a pesquisa.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2006. 54p.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BELLON, G.; KRALH, L.L.; ANJOS, J.R.N.; PEIXOTO, J.R.; BRAGA, M.F.; REZENDE, A.M. Utilização de marcadores moleculares em retrocruzamentos visando a resistência do maracujazeiro-azedo a múltiplas doenças. In: **Fitopatologia brasileira** v. 29, (suplemento), XXXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA. Resumos... Pág. S325. 2004a.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro - Desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 187-209.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; MOREIRA, M.A. & BARROS, E.G. **Use of molecular markers to accelerate the breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose.** Euphytica, 138: 213-218. 2004b.

FALEIRO, F, G ; JUNQUEIRA, N,T,V ; BRAGA, M,F ; JUNQUEIRA, K. P. ; BELLON, G.; FONSECA, K.G; PEIXOTO, J,R . **Cruzamento inter-específicos e**



**retrocruzamentos visando á resistência do maracujazeiro a doenças.** In: 4º CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2007, São Lourenço- MG. 2007.

FERREIRA, F.R.; VALLINI, P.C.; RUGGIERO, C.; LAM-SANCHEZ, A.; OLIVEIRA, J.C. Correlações fenotípicas entre diversas características do fruto do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 3, **Anais...**, Rio de Janeiro, v.2, p.646, 1975.

FORTALEZA, J.M. **Influência da adubação potássica e da época de colheita sobre as características físico-químicas dos frutos de nove genótipos de maracujazeiro-azedo cultivados no Distrito Federal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2002, 59 p. Dissertação de Mestrado.

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

GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: Borém, A. **Melhoramento de espécies cultivadas.** Viçosa: UFV, 1999. 817p.

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; BERNACCI, L.C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81-108.

MEDEIROS, S.A.F. **Desempenho agrônomo e caracterização físico-química de genótipos de maracujá-roxo e maracujá-amarelo no Distrito Federal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2005, 95 p. Dissertação de Mestrado.

MELETTI, L.M.M. & MAIA, M.L. **Maracujá: Produção e comercialização.** Boletim técnico, 181. Campinas, Instituto Agrônomo, 1999. 64p.

MELO, K.T. **Comportamento de seis cultivares de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg) em Vargem Bonita, no Distrito Federal.** 1999. 75 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília.

MÜLLER, C.H.; PINHEIRO, R.V.R.; CASALI, V.W.D.; OLIVEIRA, L.M. de; MANICA, I.; SOUZA, A.C.G. de. Efeitos de doses de sulfato de amônio e de cloreto de potássio sobre a produtividade e sobre a qualidade de maracujás colhidos em épocas diferentes. **Revista Ceres**, Viçosa, v.26, n. 143, p.48-64, 1979.

NEI, M.; LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variations in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v.76, p. 5269-5273, 1979.

OPENSHAW, S.J.; JARBOE, S.G. and BEAVIS, W.D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: ASHS/CSSA Joint Plant. Breeding Symposium, 2, Corvallis **Proceedings...** Corvallis: Oregon State University. 1994

PIO VIANA, A.; GONÇALVES, G.M. Genética quantitativa aplicada ao melhoramento genético do maracujazeiro. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2005 p. 243-274.

PIO VIANA, A.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, M. M.; MALDONADO, F.; AMARAL JÚNIOR, A. T. Diversidade entre genótipos de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras determinada por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 489-493, dez. 2003.

RANGEL, L.E.D. **Desempenho agrônomo de nove genótipos de maracujazeiro-azedo cultivados sob três diferentes níveis de adubação potássica no Distrito Federal**, Brasília, 2002. 46p. Dissertação (Mestrado).

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor. 653p.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT user's guide**. Version 6, 4 ed. SAS Institute, North Caroline, Cary, 1989.

SOUSA, M. A. F. **Produtividade e reação a doenças em genótipos de maracujazeiro-azedo, cultivados no Distrito Federal**. Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília; 2005. 120p. Dissertação de Mestrado.

STATSOFT INC. **Statistica for Windows [Computer program manual]** Tulsa, OK. StatSoft Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa, 1999.

VERAS, M.C.M. **Fenologia, produção e caracterização físico-química dos maracujazeiros azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e doce (*Passiflora alata* Dryland) nas condições de Cerrado de Brasília, DF**. Lavras: UFLA, 1997. 103 p. Dissertação de mestrado.

YOUNG, N.D.; TANKSLEY, S.D. **Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes**. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v.77, 1989. p. 95-101.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura do maracujazeiro está em franca expansão, porém apresenta grande problema relacionado à sua baixa produtividade, que é causado principalmente pelos fatores fitossanitários. Programas de melhoramento genético são necessários para contornar esse entrave.

O método dos retrocruzamentos tem sido utilizado na Embrapa Cerrados para incorporação de genes de resistência a doenças à espécie comercial, porém são considerados demasiadamente longos. Para diminuir o tempo da seleção de plantas, marcadores moleculares são utilizados com o objetivo de auxiliar a seleção das plantas mais resistentes geneticamente mais próximas do genitor recorrente. No presente trabalho, foi possível selecionar plantas RC4 e RC5 que apresentaram maior porcentagem de recuperação do genitor recorrente e que se destacaram quanto à resistência à virose do endurecimento dos frutos.

Em geral, essas plantas apresentaram susceptibilidade à virose do endurecimento dos frutos semelhante à obtida no genitor recorrente, entretanto, algumas plantas se destacaram com menores níveis de susceptibilidade a essa doença, que possivelmente, podem ser tolerantes a essa virose.

As plantas RC5 apresentam coloração de polpa mais intensa (característica desejável para fins industriais) e visualmente, no campo, há menores índices de frutos com sintomas de endurecimento quando comparadas à espécie comercial *Passiflora edulis*.

Dessa forma, as plantas selecionadas poderão ser utilizadas como genitoras para o programa de melhoramento genético. Além disso, acredita-se, que essas plantas apresentem potencial de resistência à podridão-do-pé (causada por *Fusarium solani*). Para isso, avaliações para essa doença ainda serão realizadas, assim como avaliações de produtividade e qualidade físico-químicas dos frutos.

Como não se sabe qual espécie (PWV ou CABMV) causa o endurecimento dos frutos na Embrapa Cerrados, testes de RT-PCR são sugeridos para confirmar qual vírus provoca essa doença.

# **ANEXOS**

## ANEXO A: Médias da severidade da virose nas plantas RC4 e RC5 (Capítulo 1)

**Tabela A.1** - Médias das avaliações (RC4) em novembro de 2006 e janeiro de 2007. Embrapa Cerrados/2007.

RC4	M nov	M jan	Média
1	3,7	2,9	3,3
2	-	-	-
3	3,9	2,0	3,0
4	4,0	3,8	3,9
5	3,3	3,0	3,2
6	3,8	3,8	3,8
7	3,7	3,8	3,8
8	3,8	3,6	3,7
9	3,8	4,0	3,9
10	2,8	4,0	3,4
11	-	-	-
12	-	-	-
13	3,8	3,4	3,6
14			
15	2,9	3,9	3,4
16	4,0	4,0	4,0
17	3,8	4,0	3,9
18	-	-	-
19	-	-	-
20	-	-	-
21	4,0	2,9	3,5
22	3,5	3,0	3,3
23	3,0	-	3,0
24	4,0	4,0	4,0
25	3,8	4,0	3,9
26	3,0	4,0	3,5
27	4,0	3,8	3,9
28	2,8	3,6	3,2
29	3,9	3,9	3,9
30	3,6	4,0	3,8
31	4,0	4,0	4,0
32	3,7	4,0	3,9
33	4,0	3,8	3,9
34	3,8	4,0	3,9
35	3,8	3,8	3,8
36	3,6	4,0	3,8
37	4,0	3,8	3,9
38	3,9	-	3,9
39	3,6	4,0	3,8
40	-	-	-
41	3,8	4,0	3,9
42	3,9	3,5	3,7

Continua...

... Tabela A.1. (Cont.)

<b>RC4</b>	<b>M nov</b>	<b>M jan</b>	<b>Média</b>
43	3,5	4,0	3,8
44	3,4	3,3	3,4
45	3,4	4,0	3,7
46	-	-	-
47	3,8	3,9	3,9
48	3,7	3,8	3,8
49	-	-	-
50	3,9	3,4	3,7
51	3,6	3,8	3,7
52	-	-	-
53	4,0	3,4	3,7
54	3,9	3,5	3,7
55	3,9	3,7	3,8
56	3,9	3,5	3,7
57	4,0	4,0	4,0
58	-	-	-
59	3,4	3,3	3,4
<b>Média</b>	<b>3,7</b>	<b>3,7</b>	

Legenda:

- ausência de planta

**Tabela A.2** - Médias das avaliações (*P.edulis*) em novembro de 2006 e janeiro de 2007. Embrapa Cerrados/2007.

<i>P. edulis</i>	<b>M nov</b>	<b>M jan</b>	<b>Média</b>
<i>Pe1</i>	4,0	3,9	4,0
<i>Pe2</i>	3,8	4,0	3,9
<i>Pe3</i>	3,9	3,9	3,9
<b>Média</b>	<b>3,9</b>	<b>3,9</b>	

**Tabela A.3** - Médias das avaliações (*P.setacea*) em novembro de 2006 e janeiro de 2007. Embrapa Cerrados/2007.

<i>P.setacea</i>	<b>M nov</b>	<b>M jan</b>	<b>Média</b>
<i>Ps1</i>	1,3	1,6	1,5
<i>Ps2</i>	1,9	1,6	1,8
<i>Ps3</i>	1,8	1,6	1,7
<b>Média</b>	<b>1,7</b>	<b>1,6</b>	

**Tabela A.4** - Médias das avaliações (RC5) em setembro e novembro de 2007. Embrapa Cerrados/2007.

<b>RC5</b>	<b>M set</b>	<b>M nov</b>	<b>Média</b>
<b>1</b>	2,2	2,8	2,5
<b>2</b>	1,6	2,8	2,2
<b>3</b>	1,2	2,6	1,9
<b>4</b>	1,5	2,2	1,9
<b>5</b>	1,5	2,4	2,0
<b>6</b>	1,7	2,3	2,0
<b>7</b>	1,5	2,7	2,1
<b>8</b>	2,4	3,4	2,9
<b>9</b>	2,2	2,2	2,2
<b>10</b>	1,7	3,3	2,5
<b>11</b>	2,1	2,1	2,1
<b>12</b>	1,7	2,4	2,1
<b>13</b>	2,2	2,5	2,4
<b>14</b>	2,2	-	2,2
<b>15</b>	2,5	3,2	2,9
<b>16</b>	2,0	2,4	2,2
<b>17</b>	2,2	2,7	2,5
<b>18</b>	1,9	2,8	2,4
<b>19</b>	2,0	2,0	2,0
<b>20</b>	2,0	2,1	2,1
<b>21</b>	2,2	2,6	2,4
<b>22</b>	1,8	2,7	2,3
<b>23</b>	1,9	2,4	2,2
<b>24</b>	1,9	3,1	2,5
<b>25</b>	2,6	3,0	2,8
<b>26</b>	2,1	2,4	2,3
<b>27</b>	2,0	2,2	2,1
<b>28</b>	2,0	2,5	2,3
<b>29</b>	2,1	2,6	2,4
<b>30</b>	2,0	3,1	2,6
<b>31</b>	2,2	3,2	2,7
<b>32</b>	2,0	2,8	2,4
<b>33</b>	2,1	2,6	2,4
<b>34</b>	2,1	3,2	2,7
<b>35</b>	2,2	3,6	2,9
<b>36</b>	2,0	2,9	2,5
<b>37</b>	2,0	3,2	2,6
<b>38</b>	2,1	2,4	2,3
<b>39</b>	1,7	2,2	2,0
<b>40</b>	1,9	1,9	1,9
<b>Média</b>	<b>2,0</b>	<b>2,7</b>	

Legenda:

- ausência de planta

**Tabela A.5** - Médias das avaliações (*P.edulis*) em setembro e novembro de 2007. Embrapa Cerrados/2007.

<i>P. edulis</i>	M set	M nov	Média
<b>1</b>	2,2	2,3	2,3
<b>2</b>	2,8	3,0	2,9
<b>3</b>	2,4	3,0	2,7
<b>4</b>	2,5	3,4	3,0
<b>5</b>	3,0	3,1	3,1
<b>6</b>	2,8	2,9	2,9
<b>7</b>	3,0	3,2	3,1
<b>8</b>	2,9	3,8	3,4
<b>9</b>	2,5	2,4	2,5
<b>10</b>	2,3	2,5	2,4
<b>11</b>	3,1	3,0	3,1
<b>12</b>	2,6	3,0	2,8
<b>13</b>	3,2	2,7	3,0
<b>14</b>	2,9	3,5	3,2
<b>15</b>	3,0	3,6	3,3
<b>16</b>	2,9	3,6	3,3
<b>17</b>	2,2	3,1	2,7
<b>18</b>	2,1	3,3	2,7
<b>19</b>	2,2	3,6	2,9
<b>20</b>	2,4	3,3	2,9
<b>Média</b>	<b>2,7</b>	<b>3,1</b>	

**Tabela A.4** - Médias das avaliações (*P.setacea*) em setembro e novembro de 2007. Embrapa Cerrados/2007.

<i>P.setacea</i>	M set	M nov	Média
<b>1</b>	1,4	1,3	1,4
<b>2</b>	1,4	1,4	1,4
<b>3</b>	1,5	1,2	1,4
<b>Média</b>	<b>1,4</b>	<b>1,3</b>	