



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**FILOGENIA, VARIABILIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DE  
PASSIFLORAS SILVESTRES, COMERCIAIS E HÍBRIDOS  
INTERESPECÍFICOS COMO FONTES DE RESISTÊNCIA À DOENÇAS**

**GRACIELE BELLON**

**TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA/DF**  
**MARÇO/2014**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**FILOGENIA, VARIABILIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DE  
PASSIFLORAS SILVESTRES, COMERCIAIS E HÍBRIDOS  
INTERESPECÍFICOS COMO FONTES DE RESISTÊNCIA À DOENÇAS**

**GRACIELE BELLON**

**ORIENTADOR: FÁBIO GELAPE FALEIRO  
CO-ORIENTADOR: NILTON TADEU VILLELA JUNQUEIRA**

**TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**PUBLICAÇÃO: 025D/2014**

**BRASÍLIA/DF  
MARÇO/2014**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**FILOGENIA, VARIABILIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DE  
PASSIFLORAS SILVESTRES, COMERCIAIS E HÍBRIDOS  
INTERESPECÍFICOS COMO FONTES DE RESISTÊNCIA À DOENÇAS**

**GRACIELE BELLON**

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM AGRONOMIA DA FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA  
VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
AGRONOMIA, LINHA DE PESQUISA EM MELHORAMENTO E RECURSOS  
GENÉTICO.**

**APROVADA POR:**

---

Fábio Gelape Faleiro, D.Sc., Embrapa Cerrados, CPF: 739.634.706-82, fabio.faleiro@embrapa.br  
(Orientador)

---

Marcio Elias Ferreira D.Sc, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CPF: 317.541.981-04,  
marcio.ferreira@cenargen.embrapa.br (Examinador externo)

---

Keize Pereira Junqueira, D.Sc., Embrapa Produtos e Mercado, CPF: 717.667.741-72,  
keize.junqueira@embrapa.br (Examinadora externa)

---

Angelo Aparecido Barbosa Sussel. D.Sc, Embrapa Cerrados, CPF: 275.597.668-38,  
angelo.sussel@cpac.embrapa.br (Examinador Externo)

---

José Ricardo Peixoto D.Sc., Universidade de Brasília, CPF 354.356.236-34, peixoto@ unb.br  
(Examinador interno)

**BRASÍLIA 14 DE MARÇO DE 2014**

## FICHA CATALOGRÁFICA

---

Bellon, Graciele.

Filogenia, variabilidade genética e caracterização de *Passifloras* silvestres, comerciais e híbridos interespecíficos como fontes de resistência à doenças / Graciele Bellon. Brasília, 2014.

151 p. :il

Orientação de Fábio Gelape Faleiro; co-orientação de Nilton Tadeu Villela Junqueira.

Tese (Doutorado)–Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014.

1.*Passiflora* 2.Filogenia 3.Variabilidade genética 4.Antracnose. 5.Bacteriose. 6.virose. 7.Inoculação artificial

I. Faleiro, Fábio Gelape. II. Junqueira, Nilton Tadeu Villela.

CDD ou CDU  
Agris / FAO

---

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BELLON, G. **Filogenia, variabilidade genética e caracterização de *Passifloras* silvestres, comerciais e híbridos interespecíficos como fontes de resistência à doenças.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, 151 p. Tese de Doutorado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Graciele Bellon

TÍTULO DA TESE DE DOUTORADO: Filogenia, variabilidade genética e caracterização de *Passifloras* silvestres, comerciais e híbridos interespecíficos como fontes de resistência à doenças.

GRAU: DOUTOR ANO: 2014

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

---

NOME: GRACIELE BELLON  
CPF:993485941-68  
Tel. (61)99095451  
E-mail: gracibellon@yahoo.com.br

A DEUS,

**OFEREÇO**

Aos meus Orientadores, Fábio Gelape Faleiro e Nilton Tadeu Vilela Junqueira

**MINHA ETERNA GRATIDÃO**

Ao meu amado esposo Guilherme e aos meus amados pais, Renati e Aléxio

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as conquistas.

À Universidade de Brasília e ao Departamento de agronomia pela oportunidade de realização do Doutorado.

À CAPES, pelo fornecimento da bolsa no decorrer do curso de doutorado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (Embrapa Cerrados e Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia) pela disponibilidade da infraestrutura para o desenvolvimento científico deste trabalho.

Ao meu grande Orientador Fábio Gelape Faleiro, pelos 10 anos de ensinamentos. Obrigada pela dedicação, paciência, amizade, e por todos os ensinamentos adquiridos. Obrigada por acreditar na minha vocação pela pesquisa, e pelos incentivos quando tudo parecia dar errado. Consegui mais essa conquista em minha vida acadêmica, por causa do seu incentivo e dedicação. Nada mais justo que dedicar esse trabalho a você.

Ao meu querido pai do coração Nilton Tadeu Vilela Junqueira. Obrigada por todos os ensinamentos (científicos e de vida) pelas oportunidades e pela valiosa amizade. Obrigada

Aos pesquisadores Márcio Elias Ferreira e Peter W. Inglis e sua equipe, pela valiosa ajuda e contribuição neste trabalho.

Aos meus pais Renati e Aléxio, e ao meu irmão Tiago, pelo amor, pelos ensinamentos e por me apoiarem em tudo. Muito obrigada

Ao meu amado esposo Guilherme, pelo amor, apoio, paciência, compreensão, respeito e cumplicidade. Obrigada por tudo.

Ao Professor José Ricardo, pela doutrina acadêmica ministrada, pela amizade, pelas oportunidades oferecidas e conhecimentos transmitidos.

Ao Angelo Sussel e à Ana Beatriz, pela amizade e pela valiosa ajuda e aos grandes ensinamentos na condução dos experimentos.

A todos os amigos da Embrapa Cerrados que fiz durante esses 10 anos, aos pesquisadores aos laboratoristas, pessoal do campo, pessoal da limpeza, pessoal do transporte, pessoal do ônibus de Formosa, aos guardas, o meu muito obrigada pela amizade, pela alegria de todos os dias.

Aos grandes amigos, Kênia, Márcia, Ana Beatriz, Mariana, Karen, Keize, Giovana, Osmir, João Batista (Bola), Roberto Teixeira, Inaldo, Hélio, Juarez, Elisiane, Karina, Luciana Paniago, Erivanda, Laura, Renato, Ricardo, Rogério, Marlon, pela amizade, pelas risadas, pelo apoio e incentivo e pela valiosa ajuda na execução dos experimento. Muito Obrigada

As minhas eternas irmãzinhas do coração: Keize, Kênia, Erivanda, Giovana pela amizade inigualável.

À Sther Lenza minha grande amiga que conquistei no decorrer deste curso. Obrigada pela amizade, pelas conversas de apoio e de socorro, pelas risadas, pela descontração no período da escrita da tese.

As minhas pequenas Geovana e Sophia, pelo carinho, pelos momentos de distração e alegrias que me proporcionaram.

A todos aqueles que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Nada somos se não tivermos o apoio, o carinho e o amor de todos que nos cercam. Obrigada a todos.

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL .....	xv
ABSTRACT .....	xvii
1.INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 Produção de maracujá no Brasil .....	3
2.2 A família <i>Passifloraceae</i> e o gênero <i>Passiflora</i> .....	4
2.3 Marcadores moleculares e estudos filogenéticos em passifloras .....	6
2.4 Melhoramento genético do maracujazeiro .....	10
2.5 Resistência de espécies silvestres de maracujazeiro a doenças .....	13
2.6 Antracnose .....	15
2.7 Bacteriose .....	18
2.8 Virose do Endurecimento dos Frutos .....	20
2.9 Inoculação artificial de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> , <i>Xanthomonas axonopodis</i> e Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) .....	22
2.9.1 Quantificação de doenças de plantas .....	25
3.OBJETIVO GERAL.....	27
4.OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28

<b>CAPÍTULO 1.ANÁLISE FILOGENÉTICA DA REGIÃO, RIBOSSOMAL NUCLEAR ITS E DE QUATRO LOCUS DO CLOROPLASTO COMO FERRAMENTA PARA CARACTERIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DE UM BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE <i>PASSIFLORA</i> E SELEÇÃO DE ESPÉCIES PARA CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS.....</b>	<b>42</b>
RESUMO .....	43
ABSTRACT .....	44
1.1 INTRODUÇÃO.....	45
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
1.2.1 Seleção dos acessos .....	47
1.2.2 Técnicas moleculares.....	48
1.2.3 Análises filogenéticas .....	50
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
1.3.1 Utilidade e qualidade dos marcadores .....	51
1.3.2 Análises filogenéticas aplicadas ao banco de germoplasma de <i>Passiflora</i> .....	54
1.4 CONCLUSÃO.....	64
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65

<b>CAPÍTULO 2. VARIABILIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS ELITE DE MARACUJAZEIRO OBTIDOS EM PROGRAMAS DE RETROCRUZAMENTO ENVOLVENDO ESPÉCIES SILVESTRES E COMERCIAIS DE MARACUJAZEIRO COM BASE EM MARCADORES RAPD .....</b>	<b>69</b>
RESUMO .....	70
ABSTRACT .....	71
2.1 INTRODUÇÃO.....	72
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	73
2.2.1 Extração de DNA e amplificação via PCR .....	74
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	75
2.4 CONCLUSÕES .....	79
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	80
<b>CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA E DE METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO ARTIFICIAL DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> EM MARACUJAZEIRO AZEDO .....</b>	<b>82</b>
RESUMO .....	83
ABSTRACT .....	84
3.1 INTRODUÇÃO.....	85
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	86
3.2.1 Avaliação de meios de cultura.....	86
3.2.2 Avaliação dos métodos de inoculação.....	87
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	89
3.4 CONCLUSÕES .....	94
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	95
<b>CAPÍTULO 4. CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE MARACUJAZEIRO AZEDO QUANTO À RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM CONDIÇÕES DE CASA-DE-VEGETAÇÃO.....</b>	<b>98</b>
RESUMO .....	99
ABSTRACT .....	100
4.1 INTRODUÇÃO.....	101
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	102
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	104
4.4 CONCLUSÕES .....	107
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	108

<b>CAPÍTULO 5. RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS OBTIDOS POR RETROCRUZAMENTO E DE CULTIVARES DE MARACUJAZEIRO À ANTRACNOSE EM CASA DE VEGETAÇÃO.....</b>	<b>109</b>
RESUMO .....	110
ABSTRACT .....	111
5.1 INTRODUÇÃO.....	112
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	113
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	114
5.4 CONCLUSÕES .....	117
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	118
<b>CAPÍTULO 6. RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS OBTIDOS POR RETROCRUZAMENTOS E DE CULTIVARES DE MARACUJAZEIRO AZEDO À BACTERIOSE EM CASA DE VEGETAÇÃO.....</b>	<b>121</b>
RESUMO .....	122
ABSTRACT .....	123
6.1 INTRODUÇÃO.....	124
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	125
6.3 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	127
6.4 CONCLUSÕES .....	131
6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	132
<b>CAPÍTULO 7. RESISTÊNCIA DE ESPÉCIES SILVESTRES DE MARACUJAZEIRO E GENÓTIPOS OBTIDOS POR RETROCRUZAMENTOS À VIROSE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS .....</b>	<b>135</b>
RESUMO .....	136
ABSTRACT .....	137
7.1 INTRODUÇÃO.....	138
7.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	139
7.2.1 Avaliação da reação do vírus <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (CABMV) em espécies silvestres de maracujazeiro.....	139
7.2.2 Avaliação do vírus <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (CABMV) em genótipos obtidos por retrocruzamentos .....	140
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	143
7.4 CONCLUSÕES .....	148
7.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	149

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1-** Árvore filogenética baseada nas sequências da região ITS, obtidas através da inferência bayesiana. Os números sobre os ramos indicam valores de boodstrap. Embrapa Cerrados/UnB, Brasília, DF, 2014.....56
- Figura 2-** Árvore filogenética baseada nas sequências concatenadas das regiões de cloroplasto, obtidas através da inferência bayesiana. Os números sobre os ramos indicam valores de boodstrap. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....57
- Figura 3.** Banco de Germoplasma de *Passifloras* da Embrapa Cerrados (A e B), Híbrido ornamental BRS Estrela do Cerrado (C), *P. phoenicia*, acesso CPAC-MJ-53-01 (D), *P. alata* (E), *P. quadrangulares* (F), Fruto de *P. edulis* Sims (Amarelo) acesso CPAC-MJ-M-01) e Fruto de *P. edulis* “roxo” acesso CPAC-MJ-M-23(G), Flor do acesso *P. edulis* “roxo” acesso CPAC-MJ-M-23(H), *P. edulis* Sims”4 estigmas” acesso CPAC-MJ-21-03), *P. amethystina* “SP” acesso CPAC-MJ-13-01 (J), *P. amethystina* “verdadeiro” acesso CPAC-MJ-13-00 (K), *P. amethystina* “Rui” CPAC-MJ-13-00 (L) Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....59
- Figura 4.** Árvore filogenética baseada nas sequências concatenadas das regiões de cloroplasto dividida em quatro grupos filogenéticos, utilizada no estudo da compatibilidade genética das espécies envolvidas nos cruzamentos interespecíficos Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....63

### CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Análise de agrupamento de 32 genótipos de maracujazeiro com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 177 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....78
- Figura 2-** Dispersão gráfica de 32 genótipos de maracujazeiro com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 177 marcadores RAPD. Os números correspondem aos acessos da Tabela 1. Números representados pelas formas: ◇ (Genótipos de *Passiflora edulis* Sims cultivar 'BRS Gigante Amarelo' utilizado como genitor recorrente) ▲ (Genótipos de retrocruzamentos originados de *Passiflora edulis* x *Passiflora setacea*), ◆ (Genótipos de retrocruzamentos originados de *Passiflora edulis* x *Passiflora caerulea*), +( Genótipos de retrocruzamentos originados *Passiflora edulis* flavicarpa x *Passiflora edulis* “roxo silvestre.. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....79

### CAPÍTULO 3

- Figura 1:** Metodologia de Inoculação artificial Furador circular para cintos adaptado(A), Perfurador com 15 agulhas de costura finas, fixadas em Durepox® (B), Pulverizador com suspensão de conídios(C).. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....88
- Figura 2-** Contagem de conídios de *colletotrichum gloesporioides*, na câmara de Neubauer. conídios produzidos em meio de cultura de Aveia(A), conídios produzidos em de cultura BDA(B), conídios produzidos no meio de cultura V8 (C) e conídios produzidos no meio de cultura Ágar água (D).Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....91

#### **CAPÍTULO 4**

**Figura 1.** Comprimento da lesão aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação com isolado CEN 419 de *Colletotrichum gloeosporioides* no primeiro entre-nó (Ferimento1) em mudas de maracujazeiro azedo. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....106

**Figura 2.** Comprimento da lesão aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação com isolado CEN 419 de *Colletotrichum gloeosporioides* no segundo entre-nó (Ferimento 2) em mudas de maracujazeiro azedo. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....106

**Figura 3.** Comprimento médio da lesão aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação com isolado CEN-419 de *Colletotrichum gloeosporioides* no primeiro e segundo entre-nós (Ferimento 1 e Ferimento 2, respectivamente) em mudas de maracujazeiro azedo. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....107

#### **CAPITULO 7**

**Figura 1**-Escala de notas utilizado para avaliação da severidade da virose em plantas inoculadas com *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014 .....142

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1.</b> Acessos do gênero <i>Passiflora</i> mantidos no Banco de Germoplasma de Passifloras da Embrapa Cerrados, selecionados para as análises filogenéticas. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....	47
<b>Tabela 2.</b> Estatísticas dos caracteres e da máxima parcimônia dos agrupamentos. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....	52
<b>Tabela 3.</b> Cruzamentos interespecíficos, compatibilidade genética e localização das espécies utilizadas em cada cruzamento nos grupos filogenéticos estabelecidos com base em análises de sequências combinadas de DNA de cloroplasto. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....	62

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1-</b> Genótipos de maracujazeiros resultantes do processo de retrocruzamento e espécies silvestres utilizadas no estudo de variabilidade genética e suas respectivas origens. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....	74
<b>Tabela 2-</b> <i>Primers</i> utilizados para obtenção dos marcadores RAPD para acessos de <i>Passiflora alata</i> e respectivos número de bandas polimórficas e monomórficas. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....	76
<b>Tabela 3.</b> Matriz de dissimilaridade genética entre Híbridos intra e interespecíficos de <i>Passiflora</i> , calculada com base no complemento do coeficiente de Nei e Li, utilizando 177 marcadores RAPD. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....	77

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1-</b> Significância (Probabilidade em % pelo Teste F) de quatro meios de cultura quanto ao diâmetro médio da colônia (cm) e o número médio de conídios/ml (milhões). UnB/Embrapa Cerrados, Brasília, DF, 2014.....	89
<b>Tabela 2.</b> Médias, valores mínimos e máximos, coeficientes de variação (CV), variância e desvio padrão (DP) para os diferentes métodos de inoculação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em mudas de maracujazeiro-azedo.....	92

### CAPÍTULO 4

<b>Tabela 1.</b> Significância (Probabilidade em % pelo Teste F) do efeito de genótipo (G) e do local do ferimento (F) no comprimento da lesão (CL) aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação e área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL) observados em 5 cultivares de maracujazeiro azedo inoculados com o isolado CEN-419 de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . UnB/Embrapa Cerrados, Brasília, DF, 2014.....	104
<b>Tabela 2.</b> Comprimento da lesão (mm) aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação e área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL) observados em 5 genótipos de maracujazeiro azedo inoculados com o isolado CEN-419 de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> no primeiro e segundo entre-nó (FER 1 e FER 2, respectivamente). UnB/Embrapa Cerrados, Brasília, DF, 2011.....	105

## CAPÍTULO 5

**Tabela 1-** Genótipos de maracujazeiros resultantes do processo de retrocruzamento e cultivares utilizadas no estudo e suas respectivas origens. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....113

**Tabela 2-** Significância (Probabilidade em % pelo Teste F) do efeito de genótipo (G) no comprimento da lesão aos 7 e 14 dias após a inoculação observados em 9 genótipos de maracujazeiro azedo obtidos por retrocruzamento , 2 cultivares e 1 espécie silvestre (*P. maliformes*) inoculados com o isolado CEN-419 de *Colletotrichum gloeosporioides*. UnB/Embrapa Cerrados, Brasília, DF, 2014.....115

**Tabela 3-** Médias do comprimento da lesão avaliadas aos 7 e aos 14 dias após inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*, em 9 genótipos obtidos por retrocruzamento, 2 cultivares de maracujazeiro azedo e 1 espécie silvestre *P. maliformes*. UnB/Embrapa Cerrados, Brasília, DF, 2014.....115

## CAPÍTULO 6

**Tabela 1-** Genótipos (matrizes) de maracujazeiros resultantes do processo de retrocruzamento e cultivares utilizadas no estudo e suas respectivas origens. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....126

**Tabela 2-** Resumo da análise de variância e valores de probabilidade relativos aos efeitos de genótipos na área lesionada média (ALM) avaliada aos 7, 14 e 21 dias, área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL), e porcentagem de folhas caídas. UnB/Embrapa Cerrados, Brasília, DF, 2014.....127

**Tabela 3-** Médias da área lesionada média (ALM) avaliadas aos 14 e 21 dias após inoculação de *X. axonopodis* , área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL) e porcentagem de folhas caídas de 10 matrizes e 2 cultivares de maracujazeiro azedo. UnB/Embrapa Cerrados, Brasília, DF, 2014.....128

## CAPÍTULO 7

**Tabela 1-** Reação de espécies silvestres de maracujazeiro ao vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), em casa de vegetação. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....139

**Tabela 2-** Genótipos (matrizes) de maracujazeiros resultantes do processo de retrocruzamento e cultivares utilizadas no estudo e suas respectivas origens. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....141

**Tabela 3-** Escala de notas proposta por JUNQUEIRA et al. (2003) com modificações, utilizada para avaliação da severidade de virose em folhas de genótipos de maracujazeiro. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....142

**Tabela 4-** Reação de espécies silvestres de maracujazeiro ao vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), em casa de vegetação. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.....143

**Tabela 5-** Resumo da análise de variância e valores de probabilidade dados relativos ao número de folhas, média da nota da severidade da virose nas folhas, numero de folhas com nota máxima (4) e porcentagem de folhas com nota 4. UnB/Embrapa Cerrados, Brasília, DF, 2014.....145

**Tabela 6-** Médias dos dados relativos ao número de folhas, média da nota, numero de folhas com nota máxima (4) e porcentagem de folhas com nota 4 de 12 genótipos de maracujazeiro em duas épocas de avaliação (30 e 45 dias). UnB/Embrapa Cerrados, Brasília, DF, 2014.....146

# FILOGENIA, VARIABILIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DE PASSIFLORAS SILVESTRES, COMERCIAIS E HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS COMO FONTES DE RESISTÊNCIA À DOENÇAS

## RESUMO GERAL

O trabalho teve como objetivo estudar a filogenia, a variabilidade genética e caracterizar espécies silvestres, comerciais e híbridos interespecíficos de maracujazeiro como fontes de resistência à antracnose, bacteriose e virose. A análise filogenética foi utilizada para verificar a identidade de 48 acessos de um banco ativo de germoplasma de *Passiflora*, representando 43 diferentes espécies de interesse para o melhoramento genético do maracujazeiro azedo, doce e ornamental. As regiões de DNA utilizadas foram um loco ITS de DNA nuclear ribossomal e quatro locos do DNA de cloroplasto (*matK*, espaço intergênico *psbA-trnH*, *rbcL* e *trnL-F*). Correlacionando os dados obtidos de filogenia com as informações do programa de melhoramento de espécies de *Passiflora*, observou-se que a compatibilidade dos cruzamentos interespecíficos é maior quando os genitores foram selecionados a partir do mesmo subgênero. Tais análises permitiram também a obtenção de importantes informações taxonômicas, evolutivas e filogenéticas. No estudo da variabilidade genética de genótipos elites de maracujazeiro obtidos por programas de retrocruzamento, envolvendo espécies silvestres e comerciais com base em marcadores moleculares RAPD, foram analisados 32 genótipos de *Passiflora*. Os marcadores evidenciaram variabilidade genética entre os genótipos estudados e confirmaram a eficiência da recuperação do genoma recorrente dentro do programa de retrocruzamento. Também foi avaliado meios de cultura e métodos de inoculação artificial de *Colletotrichum gloeosporioides* em maracujazeiro azedo. Foram avaliados quatro meios de cultura (Aveia, BD, V8 e Ágar) e 3 três metodologias de inoculação baseadas em ferimentos com furador de couro adaptado, agulhas e atomização da suspensão de conídios. O meio de aveia (farinha de aveia Quaker© 6% + ágar 1,2% em água) apresentou a melhor condição para a produção de conídios de *C. gloeosporioides* e o método de inoculação que proporcionou maior desenvolvimento de sintomas e maior precisão na avaliação da antracnose em mudas de maracujazeiro foi o ferimento por agulhas no caule. No estudo da caracterização e quantificação da resistência de cultivares comerciais de maracujazeiro azedo à antracnose foram caracterizados os cultivares BRS Gigante Amarelo, BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro Vermelho, Sol Amarelo Azedo Graúdo Brilhante (Feltrin) e BRS Rubi do Cerrado. As cultivares que apresentaram maior resistência a antracnose foram

BRS Rubi do Cerrado seguido das cultivares BRS Sol do Cerrado e BRS Ouro Vermelho. A cultivar com maior susceptibilidade a antracnose foi BRS Gigante Amarelo seguido da cultivar Sol Amarelo Azedo Graúdo Brillhante (Feltrin). No estudo da caracterização e quantificação da resistência de espécies silvestres de maracujazeiro e genótipos obtidos por retrocruzamento à antracnose, o acesso da espécie silvestre *Passiflora maliformes* foi o que apresentou menor comprimento de lesão. Entre os genótipos obtidos por retrocruzamento, EC4-121 EC4-128 e a cultivar BRS Rubi do Cerrado apresentaram resistência à antracnose com comprimento de lesão estatisticamente iguais às obtidas pelo *P. maliformes*. No estudo da caracterização e quantificação da resistência de genótipos obtidos por retrocruzamento e de cultivares de maracujazeiro azedo à bacteriose, a cultivar BRS Rubi do Cerrado foi a mais resistente à bacteriose, e a cultivar BRS Gigante Amarelo foi a mais suscetível. Entre os genótipos obtidos por retrocruzamento, destacam-se EC4-223, ES4-239, EC4-325, EC4-124 e ERE-476 que apresentaram níveis de resistência iguais à cultivar BRS Rubi do Cerrado em pelo menos uma das características avaliadas. No estudo da caracterização e quantificação de espécies silvestres de maracujazeiro e genótipos obtidos por retrocruzamento à virose do endurecimento dos frutos, considerando apenas a incidência no estudo das espécies silvestres, verificou-se que *P. misera* e *P. suberosa* não manifestaram sintomas. Os acessos das espécies *Passiflora cerradense*, *P. coccinea* e *P. setacea* apresentaram resistência moderada com incidência de 10%, 25% e 30% respectivamente. Na avaliação da resistência dos genótipos obtidos por retrocruzamento à virose, observou-se 100% de incidência, porém com diferentes níveis de resistência com base na severidade. As cultivares comerciais apresentaram maior severidade da doença quando comparadas com os genótipos obtidos por retrocruzamento.

**Palavras chave:** *Passiflora*, análise filogenética, marcadores moleculares, resistência genética, inoculação artificial, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Xanthomonas axonopodis* pv *Passiflorae*, *Cowpea aphid-borne mosaic virus*

**PHYLOGENY, GENETIC VARIABILITY AND CHARACTERIZATION OF  
PASSIFLORAS COMMERCIAL SPECIES AND INTERSPECIFIC HYBRIDS OF  
RESISTANT TO DISEASES**

**ABSTRACT**

The work aimed to study the phylogeny, genetic variability and to characterize wild and commercial species and interspecific hybrids of passion fruit as sources of resistance to anthracnose, bacterial disease and viruses. Phylogenetic analysis was used to verify the identity of 48 accessions of *Passiflora* active germplasm bank, representing 43 different species of potential interest for the improvement of sour, sweet and ornamental passionfruit. The DNA loci used were nuclear ribosomal ITS and four chloroplast loci, matK, psbA-trnH intergenic spacer, rbcL and trnL-trnF. Correlating the obtained phylogenies with data from breeding programs, *Passiflora* species were much more likely to be compatible in interspecific crosses if the parents were selected from the same subgenus. These analyzes also allowed us to obtain important taxonomic, evolutionary and phylogenetic informations. In the study of genetic variability of elite genotypes of passion fruit obtained in backcross programs involving wild and commercial species based on RAPD markers, we analyzed 32 genotypes of *Passiflora*. Cluster analysis showed that the elite genotypes were grouped with the commercial cultivars used as recurrent parent. The markers showed genetic variability among genotypes and confirmed the efficiency of recurrent genome recovery within the backcross program. In the evaluation of the culture media and inoculations methods of *C. gloeosporioides* in passionfruit plants, we analyzed four culture media (Oatmeal, BDA, V8 and Agar) and three inoculation methods based on injuries by adapted leather puncher and needles and leaves atomization with conidia suspension. The culture media Quaker© oatmeal 6% + Agar 1.2% in water showed the best condition for conidia production of *C. gloesporioisdes* and the inoculation method based on injuries in the stem by needles proportioned the best results. In the characterization and quantification of the resistance of passion fruit cultivars to anthracnose were characterized BRS Gigante Amarelo, BRS Sol Cerrado, BRS Ouro Vermelho, Sol Amarelo Azedo Graúdo Brilhante (Feltrin) and BRS Rubi do Cerrado Cerrado cultivars. The cultivar with highest resistance to anthracnose was BRS Rubi do Cerrado followed by BRS Sol do Cerrado and BRS Ouro Vermelho. The cultivar more susceptible to anthracnose was BRS Gigante Amarelo followed by Sol Amarelo Azedo Graúdo Brilhante (Feltrin) cultivar. In the study of characterization and quantification of the resistance of passion fruit wild species and genotypes to anthracnose obtained by backcrossing, the access of *P. maliformes* showed the lowest mean of lesion length. Among

the genotypes obtained by backcrossing EC4-121, EC4-128 and BRS Rubi do Cerrado cultivar, showed the same level of resistance to that obtained by *P. maliformes* access. In the study of characterization and quantification of the resistance genotypes obtained by backcrossing and passionfruit cultivars to bacterial, the BRS Rubi do Cerrado cultivar was the most resistant to bacterial disease and BRS Gigante Amarelo was the most susceptible. Among the genotypes obtained by backcrossing CPAC-EC4-223, CPAC-ES4-239, CPAC-EC4-325, CPAC-EC4-124 e CPAC-ERE-476 showed the same resistance level of the BRS Rubi do Cerrado at least one of the characteristic analyzed. In the evaluation of the resistance of accessions of wild species of passion fruit and backcrossing genotypes to the CABMV, considering only the disease incidence, *P. misera* and *P. suberosa* did not express symptom the virus. *Passiflora cerradence*, *P. coccinia* and *P. setacea* showed moderate resistance with disease incidence of 10%, 25% and 30% respectively. In the backcross breeding study, 12 genotypes were evaluated and showed 100% of CABMV incidence, but with different resistance levels considering the disease severity. The cultivars showed more disease severity compared with the genotypes obtained by backcrossing.

**Keywords:** *Passiflora*, phylogenetic analysis, molecular markers, genetic resistance, artificial inoculation, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Xanthomonas axonopodis*, Cowpea aphid-borne mosaic virus

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui um grande número de espécies de *Passiflora*, o que o posiciona como grande possuidor de germoplasma. Apesar de abrigar quase um terço das espécies atualmente conhecidas, no país são exploradas comercialmente apenas duas espécies: *P. edulis* (maracujá-azedo) e *P. alata* (maracujá-doce).

A família *Passifloraceae* é amplamente distribuída nos trópicos e regiões temperadas e é composta de mais de 500 espécies. No Brasil, são conhecidas 129 espécies de *Passiflora*, das quais 83 são endêmicas do Brasil (CERVI et al., 2010), podendo ser utilizadas como alimento, remédios e ornamento. O Brasil é considerado o centro de dispersão de muitas espécies do gênero *Passiflora* (FERREIRA, 1994), oferecendo ao país uma condição privilegiada com relação aos recursos genéticos dessas espécies.

A cultura do maracujazeiro enfrenta muitos problemas fitossanitários. Com a expansão dessa cultura no país, várias doenças como a bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*), a virose do endurecimento dos frutos (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*-CABMV), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp), fusariose ou murcha (*Fusarium axysporum* f. sp. *passiflorae*) e podridão-do-pé (*Fusarium solani*) vêm provocando perdas expressivas (JUNQUEIRA et al. 2005). Uma crescente demanda por informações técnicas tem levado à ampliação dos estudos sobre a família *Passifloraceae*, visando caracterizar os recursos genéticos disponíveis e diferentes aspectos da tecnologia de produção (BERNACCI et al., 2003). O desenvolvimento de variedades resistentes a doenças é estratégico para todas culturas agrícolas visando à redução de custos de produção, segurança de trabalhadores agrícolas e consumidores, qualidade mercadológica, preservação do ambiente e sustentabilidade do agronegócio (QUIRINO, 1998). No caso do maracujá azedo (*Passiflora edulis*), tal estratégia se faz necessária considerando a alta suscetibilidade das atuais cultivares à bacteriose, virose do endurecimento dos frutos e antracnose (JUNQUEIRA et al., 2003).

Dessa forma, há grande necessidade de pesquisas que visem buscar fontes de resistência à essas doenças e novas variedades resistentes. Espécies silvestres do gênero *Passiflora* têm apresentado variabilidade para resistência às principais doenças do maracujazeiro. A caracterização e exploração da variabilidade genética entre as espécies de *Passiflora*, e também dentro da espécie cultivada (*P. edulis*), podem revelar fontes de resistência ou tolerância de grande valor para o controle destas doenças no campo ou para a utilização em programas de melhoramento genético. A fim de que toda esta variabilidade

genética para resistência a doenças seja aproveitada em programas de melhoramento, torna-se necessária a realização de hibridações intra-específicas ou o uso da biotecnologia moderna na obtenção de híbridos somáticos ou na utilização da tecnologia do DNA recombinante e engenharia genética. O uso de espécies silvestres de maracujá como fontes de resistência em programas de melhoramento apresenta grande potencial e resultados interessantes já estão sendo obtidos (JUNQUEIRA et al., 2005; FALEIRO e JUNQUEIRA, 2009).

O uso das espécies silvestres como doadoras de genes de resistência confirmam a eficiência dos métodos de melhoramento para aumento da produtividade, melhoria da resistência a doenças e qualidade do fruto (JUNQUEIRA et al., 2005; FALEIRO et al., 2005; FALEIRO et al., 2006, FONSECA, et al., 2008, FALEIRO e JUNQUEIRA, 2009). O conhecimento da evolução das espécies e a relação entre as espécies cultivadas e seus parentes silvestres tem sido de considerável valor na conservação e utilização dos recursos genéticos e é fundamental para a sistemática que visa o estudo dos padrões evolucionários da diversidade biológica (BUSO, 2001). Apesar de sua importância econômica e diversidade de espécies, o gênero *Passiflora* é carente no que diz respeito a estudos genéticos e evolutivos. Estes estudos visam determinar os mecanismos genéticos e ecológicos associados às mudanças evolutivas. O conhecimento da relação entre as espécies é de extrema importância para a utilização eficiente dos recursos genéticos. Segundo Cunha (1998) e Faleiro et al. (2005), estudos acurados e detalhados da variabilidade genética do maracujazeiro poderão indicar recursos genéticos valiosos, sejam novas espécies nos sistemas de produção, sejam genes de espécies silvestres ou selvagens úteis ao melhoramento das atuais espécies cultivadas. Nesse sentido, tais estudos são prioritários para as pesquisas com o maracujá.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Produção de maracujá no Brasil

A fruticultura brasileira é um dos segmentos da economia mais destacados e em franca expansão. Possui um mercado interno em crescimento constante e vem ganhando espaço no mercado internacional, com frutas tropicais, subtropicais e de clima temperado. Nos últimos anos houve aumento significativo no volume das exportações, no número de empresas exportadoras, nas variedades de frutas exportadas, bem como no número de países compradores (BRAZILIANFRUIT, 2010).

O maracujá tem adquirido grande importância no contexto mundial, notadamente a partir das últimas três décadas, sendo que o Brasil ocupa uma situação de destaque como maior produtor e consumidor mundial (FALEIRO et al., 2008a). Os primeiros cultivos de maracujá surgiram na década de 1960, e a produção, em torno de 1.444 t/ano, era suficiente apenas para atender às necessidades da família e do pequeno mercado. No período de 1960 a 1970, a cultura do maracujazeiro passou a assumir importância em termos econômicos, fato que, provavelmente, representou o início de sua exploração para fins industriais.

Desde 1995, o Brasil vem se destacando como o maior produtor mundial de maracujá, apresentando, naquele ano, área colhida de 38.522 hectares e produção na ordem de 405.535 toneladas (AGRIANUAL, 2006). Em 2009, a produção foi de 718.798 t numa área de 50.795 ha. Em 2010, o Brasil bateu o recorde de produção e área plantada de 920.000 ton e 62.200 ha, respectivamente (IBGE, 2012). O rendimento médio nacional foi de 14,7 t/ha. Considerando todas as espécies de maracujá cultivadas, o maracujá azedo (*Passiflora edulis*) e o maracujá doce (*Passiflora alata*) são responsáveis por 95% da área plantada no Brasil (IBGE, 2011). O maracujá azedo tem uma cadeia produtiva desenvolvida e organizada no Brasil com cultivares comerciais registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, entre as quais o IAC-275 e IAC-277 desenvolvidos pelo Instituto Agrônomo-IAC, FB 100 e FB 200 desenvolvidas pelo Viveiro Flora Brasil e variedades lançadas pela Embrapa Cerrados e parceiros, denominadas BRS Gigante Amarelo, BRS Ouro Vermelho, BRS Sol do Cerrado e BRS Rubi do Cerrado.

A cultura do maracujá está em franca expansão no Brasil e sua importância cresce a cada ano. As principais regiões produtoras de maracujá são: Nordeste responsável por (72,59% da produção), região Sudeste (14,79% da produção), região Norte (5,90% da produção), Região Centro Oeste (5,90% da produção) e região Sul (2,50% da produção)

(IBGE, 2012). Em 2012, houve uma produção do maracujá no Brasil de 776.097 ton com rendimento médio de 13,4 ton/ha (IBGE, 2013). Nos últimos anos a produção nacional não foi suficiente para abastecer o consumo interno, havendo necessidade de importação de polpa de outros países para abastecer a indústria de sucos nacional.

## **2.2 A família *Passifloraceae* e o gênero *Passiflora***

A família *Passifloraceae* é amplamente distribuída nos trópicos e regiões temperadas e é composta por mais de 500 espécies. No Brasil são conhecidas 129 espécies, das quais 83 são endêmicas do Brasil (CERVI et al. 2010) podendo ser utilizadas como alimento, remédios e ornamentos. Escobar (1988) considerou que a família teria pouco menos de 600 espécies. Já Bernacci et al (2003) consideraram 530 espécies. Segundo Souza e Melletti. (1997), há mais de 580 espécies, sendo a maioria oriunda da América tropical e, principalmente, do Brasil.

Com relação ao número de gêneros da família, segundo Bernacci et al. (2005), não existe consenso entre os autores. Killip (1938) e Sacco (1980) listaram 12 gêneros. Escobar (1988) e Cervi (1997) listaram 20 gêneros, enquanto Brummitt (1992) considerou apenas 17 gêneros na família. Segundo Vanderplank (1996), a família *Passifloraceae* é formada por 630 espécies dentro de 18 gêneros. Bernacci et al. (2003) consideraram 530 espécies e 19 gêneros.

A classificação infragenérica para *Passiflora* tem sofrido várias alterações, em sua composição, quanto a seções e séries botânicas (Killip 1939). Feuillet e MacDougal (2003), baseados em caracteres morfológicos e ecológicos, sugeriram o agrupamento das espécies de *Passiflora*, que compunham, até então, os 23 subgêneros, em, apenas, quatro subgêneros: *Astrophea* (DC.) Mast., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) Rchb. e *Passiflora*. Essa classificação foi corroborada por outros autores que realizaram trabalhos de sistemática filogenética, utilizando marcadores moleculares e genoma citoplasmático, mitocondrial (Muschner, 2005).

O subgênero *Astrophea* abrange 57 espécies de arbustos e lianas lenhosas, sendo que as espécies que o compõem são as mais diferenciadas morfológicamente, guardando pequena semelhança com as passifloras típicas. A maioria das espécies do grupo ocorre em regiões de baixa altitude, no norte da América do Sul, mas existem registros de ocorrência no Brasil, Andes e América Central, esta última com, apenas, duas espécies, *Passiflora pittieri* e *Passiflora tica* (Ulmer e MacDougal, 2004). Feuillet e MacDougal (2003) organizaram esse subgênero em duas superseções: *Astrophea* e *Pseudosastrophea*.

O subgênero *Deidamioides* é composto por, apenas, 13 espécies. Em 11 destas, as flores se originam, diretamente, das gavinhas, uma característica rara e considerada ancestral para o gênero. *Deidamioides* é subdividido em cinco seções, duas das quais são monoespecíficas. Sua distribuição é sul-americana, localizada no noroeste da América do Sul. Segundo Ulmer e MacDougal (2004), essa região é o centro de diversidade do gênero, pois, lá, são encontradas diversas espécies de *Passiflora*, além das pertencentes ao subgênero *Deidamioides*, de morfologia bastante ancestral. O subgênero *Decaloba* contém, aproximadamente, 215 espécies distribuídas nas Américas do Sul e do Norte, no sudeste do continente asiático e na Austrália. As espécies de *Decaloba* ocorrem desde o nível do mar até 300 metros de altitude. A maioria tem porte pequeno e hábito escandente, com flores diminutas, geralmente, brancas ou esverdeadas e frutos pequenos (ULMER E MACDOUGAL, 2004); algumas espécies desse subgênero são autocompatíveis. Conforme a proposição de Feuillet e MacDougal (2003), as espécies do subgênero *Decaloba* estão distribuídas em oito superseções, sendo *Decaloba* a maior delas com 120 espécies.

O maior subgênero é o *Passiflora* com 236 espécies, agrupando, morfologicamente, as espécies, tipicamente, reconhecidas como maracujá, sendo *P. ligularis* e *P. tarminiana* (no hemisfério norte), *P. edulis*, *P. alata* e *P. incarnata* (no hemisfério sul) as espécies, economicamente, mais importantes. A área de distribuição desse subgênero abrange a metade sul dos Estados Unidos, a América Central e a América do Sul, exceto seu extremo sul (ORTEGA e SCHMIDT, 1995). O Brasil é um dos mais importantes centros de diversidade do maracujá, pois muitas espécies selvagens de *Passiflora* são nativas, notadamente no Centro-Norte do País (FERREIRA, 1994).

O gênero *Passiflora* é composto por cerca de 400 espécies (BERNACCI et al., 2005), classificadas em quatro subgêneros. Embora algumas análises filogenéticas tenham sido realizadas nos últimos anos, sua classificação infra-subgenérica permanece em aberto (ZAMBERLAN, 2007).

As flores de espécies do gênero *Passiflora* atraem uma gama de polinizadores: desde abelhas e vespas, borboletas e mariposas, até vertebrados como morcegos e pássaros.

Muitas das espécies do gênero *Passiflora* são cultivadas pelas propriedades alimentícias, ornamentais e medicinais, mas principalmente pela qualidade de seus frutos (SOUZA e MELLETTI, 1997; TOCCHINI et al., 1994). O uso medicinal, bastante difundido, baseia-se nas propriedades calmantes, sendo um sedativo natural encontrado nos frutos e nas folhas, nas propriedades como vermífugo e febrífugo e também nos efeitos diuréticos, antiblenorrágicos, hipnóticos entre outros (COSTA e TUPINAMBÁ, 2005). Vários autores,

entre eles Bernacci et al. (2005) e Ferreira e Oliveira (2002), relatam a grande variabilidade genética a ser explorada dentro do gênero *Passiflora*, visto serem observadas variações no florescimento, produtividade, resistência a pragas e doenças, tolerância ao frio e características de fruto. Ferreira (1998) e Castellen et al.(2005) destacam que grande parte dessa variabilidade está dispersa no território brasileiro, o que coloca o país entre um dos principais centros de diversidade genética desse gênero. Nesse contexto, ressalta que é de grande importância a intensificação das pesquisas visando o maior conhecimento do germoplasma do maracujazeiro silvestre.

### **2.3 Marcadores moleculares e estudos filogenéticos em passifloras**

Com os avanços das pesquisas na área da biologia molecular, o desenvolvimento de equipamentos cada vez mais automatizados e da bioinformática têm possibilitado a geração de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares, permitindo a cobertura completa do genoma de interesse. Tais avanços vêm potencializar a incorporação dos marcadores moleculares nas diferentes etapas dos programas de melhoramento genético (PEREIRA et al.,2005). A partir de 2000, as equipes envolvidas no melhoramento genético vêm desenvolvendo pesquisas bastante sedimentadas em novas tecnologias, com objetivos definidos, multiplicidade de métodos e, mais recentemente, com a adoção de ferramentas importantes para o melhoramento genético, como a biotecnologia. A utilização de todas as ferramentas disponíveis da genética molecular e quantitativa é considerada estratégica para que o melhoramento do maracujazeiro consiga atender as demandas do setor produtivo, industrial e dos consumidores (FALEIRO et al., 2006). Marcadores moleculares do DNA e tecnologias da engenharia genética têm sido utilizados como ferramentas auxiliares nas diferentes etapas do melhoramento genético, desde a caracterização do germoplasma até as etapas finais de desenvolvimento e seleção de plantas melhoradas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998, VIEIRA et al., 2005; PEREIRA et al., 2005; FALEIRO, 2007; FERREIRA e FALEIRO, 2008; FALEIRO, 2011a). Tratando-se de plantas semiperenes, como é o caso do maracujazeiro, a utilização desses marcadores se reveste ainda de maior importância (PEREIRA et al, 2005).

Diversas técnicas de marcadores moleculares têm permitido indicar, com precisão, as variações genéticas presentes no DNA de um determinado organismo. Entre os marcadores moleculares usados atualmente estão o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) ou polimorfismo do DNA amplificado ao acaso, o SSR (*Single Sequence Repeat*) ou

polimorfismo de microssatélite (pequenas seqüências com um a quatro nucleotídeos de comprimento repetidas em tandem) e o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados, Minissatélites ou VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) unidades de 10 a 100 pb repetidas em tandem), PCR-RFLP ou CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), o qual é muito interessante para estudos intraespecíficos, mapeamento genético e principalmente na diferenciação de alelos do mesmo gene (FALEIRO, 2007).

Novas tecnologias de seqüenciamento estão evoluindo rapidamente. Denominadas de tecnologias de seqüenciamento de nova geração, começaram a ser utilizadas em 2005. Todas essas tecnologias promovem o seqüenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida. Dentre as novas plataformas de seqüenciamento, duas já possuem ampla utilização em todo o mundo: a plataforma 454 FLX da Roche e a Solexa da Illumina. Outros dois sistemas de seqüenciamento que começam a ser utilizados são a plataforma da *Applied Biosystems*, denominada *SOLiD System*, e o *Heliscope True Single Molecule Sequencing* (TSMS), da Helicos (CARVALHO e SILVA, 2010). Essas novas plataformas possuem como características comuns um poder de gerar informação muitas vezes maior que o seqüenciamento de Sanger, com uma grande economia de tempo e custo por base para o seqüenciamento. Essa maior eficiência advém do uso da clonagem *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de seqüenciamento, não precisando mais do intensivo trabalho laboratorial de produção de clones bacterianos, da montagem das placas de seqüenciamento e da separação dos fragmentos em géis. A clonagem *in vitro* em suporte sólido permite que milhares de leituras possam ser produzidas de uma só vez com as novas plataformas de seqüenciamento (CARVALHO e SILVA, 2010).

Dentre as várias aplicações práticas dos marcadores moleculares em programas de melhoramento genético (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; FALEIRO, 2011), a possibilidade de acelerar a recuperação do genoma recorrente por meio da metodologia de genótipos gráficos (YOUNG e TANKSLEY, 1989) e particularmente importante para espécies perenes e semi-perenes como o maracujazeiro. O potencial desta metodologia foi levantado por Openshaw et al. (1994) e vem sendo utilizada com sucesso no melhoramento do maracujazeiro (FALEIRO et al., 2004; FONSECA et al., 2008, 2009), visando resistência a doenças. Os marcadores moleculares também vem sendo úteis no desenvolvimento de mapas

genéticos visando à identificação de QTL (*Quantitative trait loci*) para resistência à bacteriose (BRAGA, 2011), além de inúmeras aplicações em programas de conservação e uso de recursos genéticos (FALEIRO et.al., 2007; FALEIRO, 2011).

O uso de marcadores moleculares é altamente viável por permitir um rápido estudo da variabilidade genética presente (PEREIRA et al., 2005; STEPHEN et al., 1997, PIO VIANA et al., 2003). Alguns autores realizaram trabalhos referentes à diversidade genética no gênero *Passiflora*, utilizando marcadores RAPD (ANGEL et al., 1998; CASSIANO et al., 1998; PIO VIANA et al., 2003; VIEIRA et al., 1997; FALEIRO et al., 2004; GANGA et al., 2004; BELLON et al., 2007). Outros trabalhos realizados vêm utilizando marcadores RAPD, AFLP na construção de mapas de ligação em maracujazeiro azedo e maracujazeiro doce (CARNEIRO et al., 2002, LOPES et al., 2003, PÁDUA.,2004, BRAGA., 2011).

Com o aprimoramento e facilidade das técnicas moleculares, os marcadores tem se tornado ferramentas poderosas na análise filogenética. A sistemática filogenética é utilizada para identificar características similares e definir a relação histórica ou evolucionária com base nessas características incluindo genes ou fragmentos de DNA. Com base nessas relações, árvores filogenéticas são desenvolvidas mostrando as relações evolucionárias ou agrupamentos de organismos (BUSO, 2005).

Os estudos clássicos de taxonomia vegetal utilizaram caracteres morfológicos para separar as espécies, mas atualmente os marcadores moleculares têm demonstrado ser grandes aliados na resuspensão de questões que não puderam ser esclarecidas em estudos anteriores (LORENZ, 2002). A maior vantagem dos métodos moleculares é a investigação direta da situação genotípica, o que permite a detecção de variação ao nível de DNA, excluindo, portanto, influências ambientais.

Assim, as análises filogenéticas têm contribuído muito, principalmente na área da sistemática (SCHERER., 1999; MUSCHNER et al., 2005; MUSCHNER et al., 2001; HANSEN et al., 2006 ZANBERLAN., 2007). As análises baseadas em dados moleculares fornecem uma enorme quantidade de dados filogeneticamente informativos. A escolha do marcador é de grande importância nestes estudos. Nos trabalhos que utilizam a técnica de seqüenciamento, a região do DNA a ser analisada deve variar de acordo com o nível taxonômico que está sendo considerado. As regiões não codificadoras são mais usadas em estudos de níveis taxonômicos baixos, pois não são funcionais, estando livres para variar e fornecer um maior número de caracteres informativos por unidade seqüenciada (SMALL et al., 1998). Já nos estudos de taxa mais elevados, as seqüências a serem analisadas devem corresponder a regiões codificadoras, que sofrem alta pressão seletiva sendo, portanto, mais

conservadas. O estudo simultâneo de vários marcadores moleculares fornece resultados mais robustos sobre as relações filogenéticas de um grupo, uma vez que filogenias baseadas em um único marcador molecular podem representar principalmente a evolução da sequência analisada (LORENZ,2002).

Em termos de aplicação, as análises filogenéticas mostram-se importantes para traçar rotas de disseminação de doenças infecciosas, desenvolvimento de drogas para fins médicos e agrícolas e na detecção de restrições estruturais e funcionais de proteínas. No caso do gênero *Passiflora*, a reconstrução filogenética pode elucidar alguns aspectos evolutivos como a origem de *P. edulis* e *P. alata*, a determinação do número básico cromossômico ancestral e mapear o surgimento de caracteres de importância agrônômica que possam vir a ser incorporados em espécies de valor comercial como *P. edulis* e *P. alata* (PÁDUA, 2004).

Os primeiros estudos de filogenia molecular desenvolvido para o gênero *Passiflora* foram realizados por Scherer (1999), Muschner (2001), Muschner et al. (2003) e Muschner (2005).

Scherer (1999) estabeleceu as relações filogenéticas de 12 espécies de *Passiflora* através das sequências dos espaçadores internos transcritos do nrDNA, ITS1 e ITS2. Paralelamente, Muschner (2001) investigou, além dos marcadores ITS e trnLtrnF, as sequências do espaçador intergênico cloroplasmático psbA-trnH para 21 espécies, distribuídas em cinco subgêneros. Muschner et al. (2003), avaliaram três marcadores moleculares em 61 espécies do gênero e encontraram sustentação para a nova proposição taxonômica do gênero, que passava a contar com apenas quatro subgêneros (FEUILLET e MACDUGAL 2003) e não mais com os 22 ou 23 propostos por Killip (1938) e Escobar (1984), respectivamente.

Muschner (2005) realizou um estudo envolvendo taxas evolutivas e tempo de diversificação para as espécies de *Passiflora*. Verificou que a separação do gênero *Passiflora* de outros da família tenha ocorrido há 44 milhões de anos atrás (Mya), tendo os eventos de diversificação iniciado há 42 Mya. A autora verificou que os subgêneros *Decaloba* e *Passiflora*, iniciaram seus eventos de especiação há 35 e 30 milhões de anos, respectivamente, podendo-se observar um segundo evento de diversificação há 24 milhões de anos, no subgênero *Passiflora*, que permitiu sua estruturação em quatro clados internos maiores. Estes resultados estão de acordo com o fato da origem do gênero ter ocorrido nos Andes e sua diversificação estar associada aos padrões de migração e especiação da flora Neotropical influenciados pelo Quaternário, como proposto por Rull (2008) para outras espécies. Outro achado importante neste estudo foi o fato que as espécies do subgênero *Passiflora* parecem ter

sofrido um padrão de radiação mais acelerado que aquelas representadas pelo subgênero *Decaloba*.

Zamberlan (2007) realizou um estudo filogenético com 121 espécies de *Passiflora*, com a análise de um dos marcadores usados por Muschner et al. (2003) e outro usado por Hansen et al. (2006), de forma a comparar os dois trabalhos com um mesmo conjunto de espécies. Os resultados obtidos pela autora permitiram um maior detalhamento nas relações evolutivas internas, inerentes a cada um dos quatro subgêneros.

De acordo com Freitas (2011), estudos que visam identificar os estados ancestrais de diversos caracteres não moleculares através das filogenias vem sendo desenvolvidos. Foram realizados estudos da variabilidade em determinados caracteres e para os marcadores moleculares, foram escolhidos quatro marcadores plastidiais que apresentaram sinal filogenético robusto e que foram capazes de diferenciar todas as espécies. Até o momento, já foram analisadas características como conteúdo de DNA, nível de ploidia e número cromossômico, agentes polinizadores e tamanho médio das flores (FREITAS, 2011, ).

## **2.4 Melhoramento genético do maracujazeiro**

A maioria das passifloras são plantas perenes, sendo poucas as espécies anuais, e dentre elas pode-se citar *P. gracilis*, *P. tenella* e algumas formas de *P. foetida*, poucas espécies também são encontradas em zonas temperadas como *P. lutea* e *P. incarnata*, (ULMER; MACDOUGAL, 2004) sendo esta última utilizada em hibridações com *P. edulis* especialmente por ser considerada tolerante ao frio (BRUCKNER; OTONI, 1999). A maioria das espécies floresce abundantemente durante vários meses no ano. Habitualmente as flores permanecem abertas por um dia, embora algumas espécies como *P. aurantia*, *P. cinnabarina*, *P. herbertiana* e *P. jorullensis* mantenha suas flores abertas por até três dias (ULMER; MACDOUGAL, 2004).

A semelhança das demais culturas de interesse econômico, os principais procedimentos em um programa de melhoramento do maracujazeiro são: caracterização e avaliação de germoplasma (silvestre e cultivado); estudo da herança dos principais caracteres agronômicos; seleção de genitores para hibridação, melhoramento intra e interpopulacional e logística de produção de sementes e transferência de tecnologia, envolvendo dessa forma atividades de pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento (FALEIRO et al., 2008).

Além das características citadas, o programa de melhoramento do maracujazeiro possui algumas particularidades no que diz respeito à auto-incompatibilidade, com implicações não somente nos procedimentos de melhoramento, como também na recomendação de cultivares, se clonal ou seminal, na multiplicação e conservação dos genótipos-elite (PEREIRA et al., 2005; BRUCKNER et al., 2005).

A hibridação interespecífica tem sido extensivamente utilizada, mas seu sucesso depende do relacionamento filogenético entre as espécies envolvidas no cruzamento. Dessa forma, um dos problemas desse tipo de hibridação é o referente à 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. O gênero *Passiflora*, tem sido pouco estudado citologicamente. As mais amplas contagens cromossômicas foram realizadas por Bowden (1945), Beal (1973), Storey (1950), Guerra (1986) e Snow e MacDougal (1993). Segundo Soares-Scott (1998), existem informações citogenéticas registradas na literatura para apenas 68 espécies do gênero *Passiflora*, 8 subespécies e 14 híbridos interespecíficos, mostrando que do total de espécies conhecidas apenas 20% apresentam identificação cromossômica. Portanto, o conhecimento das relações genômicas é necessário para o sucesso de um programa de hibridação. Melo et al., (2001) dividiram as espécies de *Passiflora* com contagem cromossômica já realizada, em quatro grupos: ( $2n=2x=12, 24, 36$ ), ( $2n=2x=24$ ), ( $2n=2x=18, 72$ ), ( $2n=2x=20$ ).

Atualmente, busca-se aumentar a base genética dos programas de melhoramento visando a seleção de genótipos de maracujá-azedo e maracujá-doce mais produtivos, mais resistentes a doenças e com melhor qualidade física e química dos frutos, sendo que uma das alternativas é o pré-melhoramento com a identificação de características de interesse em espécies silvestre e suas transferências para genótipos elite por meio da hibridação interespecífica e ações sucessivas de seleção e recombinação (FALEIRO et al., 2011). Dessa forma, torna-se essencial conhecer as características agrônômicas, físicas e químicas das espécies silvestres utilizadas na base dos cruzamentos (BRAGA et al., 2005). Produtos tecnológicos têm sido obtido pela Embrapa Cerrados a partir do trabalho básico de pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento do maracujazeiro, sendo exemplo, os híbridos BRS Gigante Amarelo, BRS Ouro Vermelho, BRS Sol do Cerrado, BRS Rubi do Cerrado, BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubi do Cerradoflora, BRS Roseflora, BRS Pérola do Cerrado.

A caracterização e a avaliação das espécies de interesse são ferramentas indispensáveis aos trabalhos de fitomelhoramento. Devido ao fato do maracujá ser uma planta alógama, vários são os métodos de melhoramento aplicados a essa cultura. Métodos de melhoramento de plantas alógamas baseiam-se, principalmente, no aumento da frequência de genes favoráveis ou na exploração do vigor híbrido (MELETTI e BRUCKNER, 2001). A caracterização da variabilidade genética existente nas populações de maracujazeiro permite a identificação de genótipos superiores para os fins específicos. No entanto, MELETTI (2002) chama a atenção para o fato de que a seleção visando apenas determinadas características pode induzir a perdas de outras também importantes para a cultura, como a resistência a determinadas doenças.

Os principais métodos de melhoramento genético utilizados para o maracujazeiro são introdução de plantas, seleção massal, hibridação sexual interespecífica, hibridação sexual intervarietal e a seleção por teste de progênies (BRUCKNER e OTONI, 1999). NASCIMENTO et al. (2003), trabalhando com seleção massal em *P. edulis* lograram êxito em selecionar progênies promissoras, contribuindo inclusive para o lançamento de cultivares comerciais.

Espécies de maracujá nativas e silvestres no Centro-Norte brasileiro 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. Os métodos de melhoramento baseados em hibridações interespecíficas têm sido citados como promissores, embora possam existir alguns problemas dos híbridos F1 relacionados a macho esterilidade, viabilidade de pólen, falta de adaptação e suscetibilidade às doenças de parte aérea (OLIVEIRA E RUGGIERO, 1998). Na Embrapa Cerrados, o método de retrocruzamento tem sido utilizado para incorporação de genes de resistência em variedades comerciais (JUNQUEIRA et al., 2005, FONSCECA, 2008, FALEIRO e JUNQUEIRA, 2009, FUHRMANN, 2011).

O volume de trabalhos relatando o uso de espécies silvestres em cruzamentos interespecíficos vem sendo amplamente registrado na literatura (JUNQUEIRA et al., 2008; CERQUEIRA-SILVA et al., 2008; SOUZA et al., 2008, BELO, 2010; AMORIM et al., 2011; CONCEIÇÃO et al., 2011; SANTOS et al., 2012).

As espécies não cultivadas *P. setacea*, *P. cincinnata*, *P. caerulea*, *P. incarnata*, *P. maliformes*, *P. foetida*, *P. nitida* e *P. quadrangularis*, por apresentarem 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, têm grande potencial para o melhoramento genético do maracujazeiro (FALEIRO et al., 2005).

## 2.5 Resistência de espécies silvestres de maracujazeiro a doenças

Com o crescimento da cultura do maracujazeiro no País, muitas doenças como a antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, a virose do endurecimento do fruto causada pelo (CABMV) e o nematóide das galhas *Meloedogyne* spp. apareceram e se tornaram endêmicas e limitantes ao seu cultivo. Até o momento, não tem sido observada, em níveis práticos, resistência ou tolerância a esses patógenos nas populações cultivadas. Em populações nativas no Cerrado, tem sido observada alguma tolerância à bacteriose, mas não ao vírus do endurecimento dos frutos nem ao nematóide das galhas (JUNQUEIRA et al., 2004, JUNQUEIRA et al., 2010).

Souza et al. (2008a) encontraram 100% de compatibilidade no cruzamento entre *P. edulis* e *P. setacea*. Contudo, em se tratando de hibridações interespecíficas visando à obtenção de híbridos resistentes ao CABMV, embora as plantas F1 tenham-se mostrado resistentes, os autores, ao realizarem retrocruzamentos para recuperar o genoma do genitor recorrente (*P. edulis*), verificaram que a resistência era ‘diluída’ gradativamente com o avanço dos ciclos de retrocruzamento, possivelmente, pelo fato de ser uma resistência de herança quantitativa (JUNQUEIRA et al., 2005; FONSECA, 2008; FONSECA et al., 2009).

Alguns autores, trabalhando com várias cultivares comerciais de maracujá-azedo, não constataram níveis de resistência que pudessem oferecer resultados satisfatórios no controle da virose, bacteriose, antracnose e septoriose (JUNQUEIRA et al., 2003; NASCIMENTO, 2003; SOUSA, 2005, BOUZA, 2009; COLLATO, 2010; SOUSA, 2009). Esses autores verificaram que a variabilidade para resistência a essas doenças, entre as variedades comerciais estudadas é baixa.

Oliveira e Rugieiro (1998) citam as espécies *P. gibertii*, *P. maliformes*, *P. cincinnata*, *P. laurifolia*, *P. caerulea* e *P. setacea* como promissoras fontes de resistência à bacteriose e as espécies *P. edulis*, *P. laurifolia*, *P. setacea*, *P. giberti* e *P. alata* à verrugose.

Leite Jr. (2002) relatam *P. cincinnata*, *P. molissima* e *P. foetida* como resistentes a bacteriose, *P. maliformes* como altamente resistente e *P. alata* e *P. quadrangulares* como altamente suscetíveis a bacteriose. Tais fatos indicam haver variabilidade no germoplasma de *Passiflora* spp., o que possibilita a obtenção de materiais comerciais de maracujazeiro com resistência a doenças. OLIVEIRA et al. (1994) relataram que *P. nitida* mostrou-se imune à

morte prematura ou amarelecimento precoce, enquanto *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. gibertii*, *P. cincinnata*, *P. molissima*, *P. caerulea*, *P. setacea*, *P. serrato-digitata*, *P. coccinea*, *P. edulis* x *P. setacea*, *P. edulis* x *P. alata* mostraram-se suscetíveis..

Junqueira et al. (2005) relataram que as plantas de *P. coccinea* e de seu híbrido F1 com *P. edulis* comercial não exibiram sintomas de bacteriose, mas vários indivíduos de progênes obtidas por retrocruzamentos RC1, RC2 e RC3 do genitor recorrente *P. edulis* foram altamente suscetíveis. As plantas de *P. caerulea*, *P. giberti*, *P. mucronata*, *P. actinia* e de alguns acessos de *P. nitida* e *P. laurifolia* também não mostraram sintomas. Por outro lado, *P. amethystina*, *P. cincinnata*, *P. quadrangulares* e *P. alata* mostraram-se altamente suscetíveis para os isolados da região do Distrito Federal (JUNQUEIRA et al., 2005).

Fuhrmann (2011), trabalhando com inoculações artificiais de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, em condições de casa de vegetação observou resistência de progênes obtidas a partir de cruzamentos interespecíficos na base de cruzamentos. As progênes com menor incidência de bacteriose foi o CPAC-ERE (*P. edulis* “*flavicarpa*” x *P. edulis* “*roxo*” silvestre) e, em campo as progênes mais resistentes foram CPAC-ES4 (*P. setacea* x *P. edulis* “*flavicarpa*”), CPAC-EC-5 (*P. caerulea* x *P. edulis* “*flavicarpa*”) e CPAC-ERE (*P. edulis* “*flavicarpa*” x *P. edulis* “*roxo*” silvestre). Tais progênes estão sendo utilizadas em novos ciclos de recombinação e seleção recorrente do programa de melhoramento do maracujazeiro visando resistência à bacteriose realizado na Embrapa.

Junqueira et al. (2010) avaliaram a reação de *P. caerulea*, *P. mucronata*, *P. vitifolia*, *P. giberti*, *P. cerradense*, *P. edulis*, *P. caerulea* x *P. edulis*, *P. caerulea* x *P. mucronata*, *P. vitifolia* x *P. edulis* e *P. mucronata* x *P. edulis* a diferentes isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e verificaram elevada resistência dos híbridos de *P. edulis* com as espécies silvestres *P. caerulea*, *P. vitifolia* e *P. mucronata*. Este resultado ressalta a importância dessas espécies para programas de melhoramento genético de maracujazeiro azedo como fontes de resistência à bacteriose. Fuhrmann (2011), trabalhando com os mesmos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, verificou que os progenitores silvestres *P. caerulea* e *P. setacea* foram os mais resistentes indicando a importância desses materiais como fontes de resistência à bacteriose.

Segundo Oliveira e Ruggiero (1998), *P. nitida*, *P. incarnata*, *P. cincinnata*, *P. giberti*, *P. setacea*, *P. alata*, *P. laurifolia*, *P. serrato-digitata* e *P. coccinea* são espécies vigorosas e apresentam ampla adaptação, além de possuírem características de resistência a doenças, o que as torna promissoras para o uso no melhoramento genético. Também foi relatada a maior longevidade das espécies *P. nitida* e *P. setacea* em campo.

JUNQUEIRA et al. (2005) estudando as espécies *P. setacea*, *P. coccinea*, *P. caerulea*, *P. giberti*, *P. amethystina*, *P. odontophylla*, alguns acessos de *P. edulis* f. *edulis*, *P. serrato digitata*, *P. morifolia*, *P. mucronata* e *P. nitida*, verificaram que estas vêm se comportando como resistentes à antracnose. Estes resultados mostram que tais espécies apresentam um grande potencial, entretanto o aprofundamento dos estudos básicos e essenciais de caracterização molecular e da resistência genética destas espécies e sua interação com diferentes isolados do patógeno praticamente não existem. Outro ponto a ser considerando na utilização de espécies silvestres como fontes de resistência à doenças é a ocorrência da variabilidade genética intra-específica.

## 2.6 Antracnose

A antracnose, doença causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, é uma das doenças mais importantes em muitas plantas cultivadas. Segundo Junqueira et al. (1999), em muitas regiões, a antracnose é a principal doença do maracujazeiro e está disseminada em todas as regiões produtoras de maracujá do Brasil e de outros países. Assume maior importância quando em condições climáticas favoráveis, o que dificulta seu controle. Ocorre em todos os órgãos da planta e se constitui na mais importante doença pós-colheita da cultura, reduzindo o período de conservação dos frutos. Sua ocorrência, associada à mancha bacteriana, pode agravar ainda mais o problema (KIMATI et al., 2005). O gênero *Colletotrichum*, descrito por Corda em 1837, compreende várias espécies, incluindo saprófitas e fitopatogênicas, sendo estas responsáveis pela doença denominada antracnose em várias plantas hospedeiras, causando enormes prejuízos (ARX, 1957; MENEZES, 2002).

O gênero *Colletotrichum* abrange os fungos imperfeitos. As espécies de *Colletotrichum* apresentam uma ampla distribuição geográfica, particularmente em ambientes quentes e úmidos dos trópicos (JEFFRIES et al., 1990; WALLER, 1992) e são extremamente diversas, incluindo saprófitas e fitopatógenos.

Os patógenos ocorrem em diversas espécies de hospedeiros, desde culturas agrícolas e plantas medicinais, aos arbustos e árvores silvestres, causando podridões de colmos, caules e frutos, seca de ponteiros, manchas foliares, infecções latentes e antracnoses. Os prejuízos causados pelo gênero *Colletotrichum*, em especial em países tropicais, resultam tanto na redução direta da qualidade e quantidade dos produtos, como no aumento dos custos de produção e de pós-colheita. Dentre as espécies deste gênero, *Colletotrichum gloeosporioides* é considerada a mais disseminada, heterogênea e importante, principalmente nos trópicos.

JUNIOR et al. (2010) relatam em seus estudos o *Colletotrichum boninense*, infectando maracujá amarelo no estado de São Paulo. A confirmação foi baseada em características morfológicas, culturais e análises moleculares baseadas em regiões (ITS).

A taxonomia de *Colletotrichum* ainda é bastante confusa, tanto para as espécies anamórficas (assexuadas) como as teleomórficas (sexuadas). Existem cerca de 900 espécies descritas ou transferidas para o gênero *Colletotrichum*. Somente para a espécie *Colletotrichum gloeosporioides*, são citadas cerca de 600 sinonímias (ARX, 1957; BAILEY et al. 1992). Como a classificação dos fungos era baseada apenas em características morfológica e fisiológica, geravam-se muitas discordâncias por parte dos pesquisadores. Os conídios formados por esta espécie são clavados, ovóides, obovados ou lobados, de coloração castanha e medindo 6-20 µm x 4-12 µm. Forma colônias variáveis de coloração branco-gelo a cinza escuro e micélios aéreos, geralmente uniformes e aveludados (SUTTON, 1992).

Fungos do gênero *Colletotrichum* são altamente especializados no processo de infecção. Segundo Bailey et al. (1992), as espécies do gênero podem apresentar três tipos iniciais de estratégias de infecção: as espécies hemibiotróficas intracelulares são capazes de penetrar na parede celular e crescer dentro do lúmen da célula; as espécies intramurais subcuticulares podem crescer na cutícula, não entrando no lúmen da célula e finalmente as espécies consideradas hemibiotróficas intracelulares e intramurais subcuticulares, podem apresentar simultaneamente ambas as estratégias.

Sutton (1992) refere-se à habilidade de *Colletotrichum* em causar infecção latente ou quiescente, não mostrando as plantas sintomas da doença. Além disso, o micélio permanece viável por longo período de tempo em sementes infectadas, restos culturais e frutos, manifestando-se logo que as condições se tornam favoráveis para o seu desenvolvimento, ocasionando sérios problemas para as plantas e também na pós-colheita.

A infecção latente nos tecidos do hospedeiro ocorre através da formação de apressórios ou hifas subcuticulares, sendo que o tipo de estrutura latente depende do hospedeiro infectado. O *C. gloeosporioides* é um fungo cosmopolita, atacando uma extensa gama de hospedeiras, causando lesões necróticas ou manchas em folhas, ramos, pecíolos, flores e frutos. Causa prejuízos variáveis, dependendo das condições ambientais favoráveis, do grau de suscetibilidade da planta e, também, na pós-colheita em diferentes regiões produtoras no Brasil e no mundo. Como os propágulos desse fungo são disseminados por respingos de água, o *C. gloeosporioides* é favorecida por alta umidade, principalmente chuvas abundantes. Temperaturas próximas de 27 °C favorece a produção dos conídios. Chuvas menos intensas favorecem o progresso da doença numa mesma planta já infectada, enquanto

que chuvas acompanhadas de ventos tendem a transportar o fungo para outras plantas. Em períodos de temperaturas mais baixas, a importância da doença diminui, sendo pequena a sua incidência nos meses de inverno, mesmo que ocorram chuvas (RUGGIERO et al., 1996).

Nas folhas são produzidas manchas inicialmente pequenas, de 2 a 3 mm, de aspecto oleoso, adquirindo, posteriormente, cor pardo-escuro, de formato irregular e diâmetro superior a 1 cm. Na parte central das manchas, os tecidos tornam-se acinzentados, podendo ocorrer fendilhamento. Sob condições ambientais favoráveis (temperatura e umidade elevadas), surgem várias lesões no limbo foliar, provocando coalescência e ocupando grandes áreas, causando queda de folhas (GOES, 1998). Nos ramos e gavinhas afetados, são produzidas manchas pardo-escuro de 4 a 6 mm que, posteriormente, se transformam em cancos, expondo os tecidos lesionados. Dependendo da intensidade da doença, pode ocorrer morte dos ponteiros e seca parcial da planta (GOES, 1998). Os frutos são infectados ainda verdes, mas a doença só se manifesta na fase de maturação e pós-colheita, aparecendo em forma de lesões arredondadas e de coloração escura, às vezes em depressão. Com o passar do tempo, as lesões evoluem para podridão seca e profunda, afetando também toda a parte interna do fruto, induzindo a fermentação do suco e descoloração das sementes (DIAS, 1990). Sobre as lesões, em condições de alta umidade, podem surgir frutificações de cor rosa e/ou pontuações escuras dispostas na forma de anéis concêntricos. A doença é mais severa nos frutos desenvolvidos durante o período chuvoso (JUNQUEIRA et al., 2003).

Para o controle da doença recomenda-se: uso de mudas saudáveis, quebra vento com plantas não hospedeiras, já que vento forte pode causar desfolha, provocando ferimentos na planta os quais servem de portas de entradas para o fungo; poda e limpeza, para a eliminação das partes afetadas pela doença; uso de ferramentas agrícolas higienizadas, evitando transferência de inóculo de plantas infectadas para plantas saudáveis; e pulverização de fungicidas. O tratamento térmico dos frutos entre 42,5 e 45° C, durante oito minutos, reduz significativamente o índice de doença nos frutos (CARVALHO et al, 2001, KIMATI, et al, 2005).

Alguns autores acreditam que o controle químico de doenças de plantas é, em muitos casos, a única medida viável empregada para garantir a produtividade e qualidade da produção (ROCHA, 1997). Entretanto, os fungicidas podem promover o aumento na severidade de doenças em plantas, pela interferência e morte de antagonista ou pela ação nociva sobre a microflora benéfica da planta, levando a desequilíbrio biológico (MEDEIROS e MENEZES, 1994).

O controle químico preventivo da antracnose vem sendo feito através da pulverização de fungicidas cúpricos, à base de oxiclreto de cobre (50%) a 0,25%, acrescido de um espalhante adesivo. Atualmente, os produtos recomendados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pelo Ministério da Saúde (MS) através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o controle químico da antracnose abrangem os seguintes ingredientes ativos: tebuconazol + trifloxistrobina (estrobilurina), como o Nativo®, tebuconazol (triazol), como Constant®, Elite®, Folicur 200 EC® e Triade®, difenoconazol (triazol), como o Score® e tiabendazol (benzimidazol), como o Tecto®, de acordo com informações do Agrofite).

## 2.7 Bacteriose

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* é a que causa maiores prejuízos à cultura do maracujazeiro no Brasil e na Austrália, sendo classificada, até o ano de 2000, como *X. campestris* pv. *passiflorae* (Pereira) Dye. Esta bactéria apresenta forma de bastonete, é gram negativa e monótrica, ou seja possui um único flagelo, cuja a finalidade é o de locomoção em meios aquosos, facilitando sua disseminação por toda planta, tanto de forma epífita quanto sistêmica. Forma colônias amareladas em meio de cultura, sendo esta coloração conferida pela substância xanthomonadina (GONÇALVES e ROSATO, 2000).

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira) Dye foi identificada por Pereira (1969), na cidade de Araraquara, São Paulo, sendo inicialmente denominada *X. passiflorae*. Posteriormente, Dye et al. (1980), reclassificaram esta espécie, que passou a ser denominada *X. campestris* pv. *passiflorae*. Gonçalves (2000), analisando 54 linhagens do patógeno, detectou, por meio de hibridizações DNA:DNA, um nível de 67% de homologia com a espécie *X. axonopodis*, determinando, portanto, que as linhagens de *Xanthomonas* de maracujazeiro pertencem a esta espécie. O autor sugeriu, desta forma, que tais linhagens fossem denominadas *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* é específica do gênero *Passiflora* (Liberato, 2002) e causa a bacteriose do maracujazeiro-azedo, crestamento bacteriano ou mancha oleosa dos frutos. Esta doença já foi relatada também no maracujá-doce, *P. alata*, e em espécies silvestres de *Passiflora*, tais como *P. cincinnata*, *P. nitida*, *P. quadrangularis*, *P. amethystina* e *P. setacea* (Junqueira et al., 2005).

Segundo Pio-Ribeiro e Mariano (1997), os sintomas iniciais nas folhas, principalmente as mais internas, são lesões pequenas, encharcadas, oleosas, translúcidas, frequentemente

localizadas próximas às nervuras, com halos visíveis, podendo ocorrer o enegrecimento vascular a partir das bordas foliares. Essas lesões tornam-se marrons, deprimidas, sobretudo na face dorsal da folha, de formato variado, raramente circulares, com tamanho médio de 3 a 4 mm, podendo coalescer em grandes áreas necrosadas e causar seca total da folha.

A partir das lesões foliares, a infecção pode se tornar sistêmica e atingir os ramos, que sofrem uma seca progressiva, apresentando caneluras longitudinais acompanhadas de escurecimento dos feixes vasculares. Cortes transversais de ramos e pecíolos infectados, se comprimidos, apresentam exsudação de pus bacteriano (MALAVOLTA JUNIOR, 1998). A doença pode causar imensa desfolha, que reduz drasticamente ou mesmo impede a formação de frutos (DIAS e TAKATSU, 1987). Nos frutos, as lesões são de cor verde-escura a pardacenta, oleosas, circulares ou irregulares, com margens bem definidas. Exsudados bacterianos, quando secos, formam uma crosta dura sobre as lesões. Essas manchas podem aprofundar até as sementes, inviabilizando a comercialização dos frutos (KIMATI, 2005).

Segundo JUNQUEIRA et al. (2003), esta doença uma vez instalada no pomar, torna-se de difícil controle, sendo requeridas medidas relacionadas ao controle cultural, químico e genético. Os mesmos autores observaram que a bactéria pode sobreviver em restos de cultura e, em condições de Cerrado, ela pode ser observada de forma endêmica em várias espécies de *Passiflora* nativas, entre elas *P. alata*, *P. cincinnata* e *P. amethystina*. A bactéria *X. axonopodis* pv. *passiflorae* pode sobreviver em sementes (VILLANOVA et al., 2007) e material vegetativo infectados, sendo estes veículos para sua disseminação. Entre as condições favoráveis, estão ambientes chuvosos com alta umidade e temperatura em torno de 35°C.

O controle da doença baseia-se na utilização de mudas e sementes sadias, poda de limpeza, uso de quebra ventos, aplicação de bactericidas e uso de plantas resistentes ou tolerantes à bacteriose. A termoterapia das sementes em água, a 50 °C, por 15 minutos é eficiente em eliminar o patógeno, sem afetar o poder germinativo. Em plantas adultas, aplicações quinzenais de oxiclreto de cobre a 30-50% ou oxiclreto de cobre + maneb + zineb, reduzem a intensidade da doença. A erradicação das porções vegetais doentes pode ajudar a reduzir a epidemia, atentando-se para a desinfestação das ferramentas de poda com um produto de ação bactericida, como o hipoclorito de sódio ou amônia quaternária (KIMATI, et al, 2005).

Com relação ao controle genético, cultivares com maior nível de resistência tem sido desenvolvidas nos últimos anos pela Embrapa Cerrados. Estratégias de engenharia genética para desenvolvimento de plantas transgênicas de maracujazeiro com resistência causada por

*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* têm sido desenvolvidas e envolvem a introdução de genes que codificam proteínas bactericidas (FALEIRO et al., 2011b). Tais proteínas isoladas a partir de insetos, como as cecropinas e análogos, as lisozimas e as atacinas têm sido usados para induzir resistência a patógenos. Particularmente as atacinas têm ação contra bactérias resultando em um desarranjo na membrana externa bacteriana, e drástica redução no seu crescimento (VIEIRA et al., 2005).

## 2.8 Virose do Endurecimento dos Frutos

A virose do endurecimento dos frutos, que pode ser causado por duas espécies de vírus (*Passionfruit woodiness virus*, PWV e *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, CABMV), é a principal doença de etiologia viral do maracujazeiro no Brasil e atualmente está disseminada na maioria das regiões produtoras (KITAJIMA e REZENDE, 2001; BUENO et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2004).

O primeiro relato da virose do endurecimento dos frutos do maracujazeiro foi feito na Austrália há mais de cem anos (COBB, 1901). O *Passionfruit woodiness virus* (PWV) família *Potyviriidae*, gênero *Potyvirus* foi descrito como agente causador da doença. SHUKLA e WARD (1988) determinaram a seqüência de aminoácidos da proteína capsidial (CP) de três isolados de PWV provenientes da Austrália. BRAND et al. (1993) clonaram e seqüenciaram o gene da proteína capsidial de uma estirpe de PWV da África do Sul e, ao compará-la com a seqüência de estirpes de PWV da Austrália, concluíram que se tratava de uma nova espécie viral, por eles denominada South African Passiflora virus (SAPV). Essa denominação não foi aceita pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), uma vez que o SAPV apresentava alta identidade na seqüência de sua proteína capsidial com isolados de CABMV (MCKERN et al., 1994). Estudos adicionais identificaram o SAPV como uma estirpe do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (SITHOLE-NIANG et al., 1996). Assim, o ICTV reclassificou-o como pertencente à espécie CABMV (VAN REGENMORTEL et al., 2000), como relatado por ZERBINI et al.(2005). Dessa forma, reconhece-se atualmente que o endurecimento dos frutos do maracujazeiro pode ser causado pelo PWV ou pelo CABMV (VAN REGENMORTEL et al., 2000). Ambos os vírus pertencem ao gênero *Potyvirus* da família *Potyviriidae*. Estudos baseados em caracterização sorológica e biológica, no Brasil, consideraram o *Passionfruit woodiness virus* (PWV) como o agente etiológico da doença (CHAGAS et al., 1981; KITAJIMA et al., 1986). Entretanto, com a caracterização molecular, constatou-se que os isolados virais responsáveis pelo endurecimento dos frutos do

maracujazeiro no Brasil pertenciam à espécie *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (NASCIMENTO et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2006; CERQUEIRA-SILVA et al., 2008b).

No Brasil, o endurecimento dos frutos já foi relatado 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). Em todos os casos, o PWV foi identificado como agente etiológico da doença, com base em características biológicas e sorológicas. Entretanto, estudos realizados por Braz et al. (1998) e SANTANA et al. (1999), baseados em análise comparativa da seqüência de aminoácidos da CP de diversos isolados brasileiros de potyvírus causadores de endurecimento dos frutos do maracujazeiro, previamente identificados como PWV, apontaram alta identidade das seqüências desses isolados com isolados de CABMV, e baixa identidade com isolados de PWV.

Os potyvírus 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). Nas plantas afetadas, são observados mosaicos, clareamento das nervuras, manchas anelares, rugosidade, distorção e mosqueado amarelo. Bezerra et al. (1995) isolaram um vírus de *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá amarelo) no estado do Ceará, determinaram suas características sorológicas, propriedades físicas “in vitro”, peso molecular da proteína capsidial, transmissibilidade por pulgão, sintomatologia e gama de hospedeiros, graus de severidade dos sintomas em condições de campo e identificaram-no como uma estirpe do PWV capaz de induzir sintomas de mosaico em maracujá amarelo, sem causar endurecimento dos frutos. Testes sorológicos mostraram que esta estirpe do PWV foi relacionada com alguns potyvírus: vírus do mosaico do caupi, da clitoria e do siratro

O vírus do endurecimento dos frutos reduz significativamente a área foliar e o peso da parte aérea e do sistema radicular da planta. Como a produção do maracujazeiro está diretamente relacionada ao enfolhamento da planta, os efeitos são nítidos. Quanto mais cedo a planta é infectada, maior o efeito negativo. O vírus causa danos quantitativos e qualitativos à produção, reduzindo número, peso e valor comercial dos frutos (GIORIA, 1999).

Os sintomas nos frutos infectados são redução do tamanho, deformação e endurecimento o que pode tornar o fruto inviável para o comércio, dependendo da intensidade dos sintomas. O vírus é facilmente transmissível mecanicamente e por afídeos, principalmente da espécie *Aphis gossypii*, de maneira não persistente (KITAJIMA et al., 1986), não havendo transmissão por sementes (VILLANOVA et al., 2007), porém pode haver transmissão

mecânica (KITAJIMA et al. 1986). A transmissão por *A. gossypii* ocorre no momento das picadas de prova do inseto, o que caracteriza a relação vírus-vetor como sendo do tipo não-persistente e não circulativa. Outras espécies relatadas como vetoras do PWV no Brasil são *Aphis fabae* Scopoli, *Aphis nerii* Boyer de Fonscolombe, *Myzus nicotianae* Blackman e *Myzus persicae* (Sulzer) (COSTA 1998). Apesar de esses afídeos serem vetores do vírus, a maioria dos relatos não os inclui como pragas do maracujazeiro.

O controle do vírus tem sido preventivo, evitando-se a disseminação do vírus em áreas onde ele não ocorre. Há pesquisadores empenhados em desenvolver métodos de controle por meio de resistência ou tolerância e pré-imunização com estirpes fracas (KITAJIMA et al., 1986; REZENDE, 1994) e também o uso da engenharia genética no desenvolvimento de plantas transgênicas (FALEIRO et al., 2011). Segundo Vieira et al. (2005), além do uso do gene da proteína capsidial do vírus, outras estratégias de engenharia genética podem ser utilizadas para obtenção de plantas transgênicas resistentes à virose, como a expressão da replicase viral, a expressão de proteínas envolvidas no movimento do vírus na planta, o uso de RNA anti-senso (“antisense RNA”), o uso de RNA satélite, que tem a propriedade de reduzir a replicação do vírus e atenuar o sintoma, e o uso de RNA defeituoso interferente, estratégia frequentemente associada a uma diminuição dos sintomas da doença. Estas estratégias ainda não foram utilizadas no caso do maracujazeiro.

## **2.9 Inoculação artificial de *Colletotrichum gloesporioides*, *Xanthomonas axonopodis* e *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)**

A resistência genética às doenças por meio do uso de cultivares melhoradas é um importante método de controle por ser barato, eficiente e ambientalmente correto, reduzindo o uso de defensivos agrícolas e o custo de produção. O desenvolvimento de programas de melhoramento genético visando a aumentar a resistência das cultivares a uma determinada doença requer o conhecimento prévio da variabilidade do patógeno, devendo-se utilizar isolados com níveis de virulência e agressividade adequados (MELLO et al., 1996). A utilização dos isolados mais virulentos pode possibilitar a obtenção de variedades com maior nível de resistência conferido por diferentes genes, diminuindo a agressividade da doença e aumentando a longevidade da resistência que pode ser superada pela seleção natural de formas mais virulentas do patógeno.

A avaliação da resistência de genótipos a diferentes doenças é comumente realizada por meio da inoculação artificial dos patógenos em condições controladas que favoreçam o

seu desenvolvimento. Deve-se entender por inocular, o ato de colocar propágulos do patógeno em contato com os órgãos de uma planta, de forma que propicie a penetração e a colonização dos tecidos desta, sob condições ideais de meio ambiente, para que a interação planta-patógeno, a que chamamos doença, tenha curso e culmine na reprodução dos sintomas típicos de enfermidade (ROMEIRO, 2001). A reação das plantas à inoculação pode ser influenciada por uma série de fatores: a) ambientais, tais como temperatura, umidade e luminosidade; b) da planta, tais como cultivar, idade, aberturas dos estômatos, nutrição, tratamentos subsequentes à inoculação e condições fisiológicas; c) relacionados ao parasitismo, tais como concentração e idade do inóculo, condições para obtenção e preparação do inóculo e virulência e agressividade do patógeno (COYNE e SCHUSTER, 1983).

Um bom método de inoculação deve atender alguns critérios, como a possibilidade de discriminação entre genótipos resistentes e suscetíveis, rapidez e uniformidade nas reações das plantas inoculadas, repetibilidade, ser de fácil execução, inexistência de escape e a possibilidade de que a infecção possa ser avaliada quantitativamente de forma acurada e precisa (TORRES e MARINGONI, 1999; SANTOS, 2000; LARANJEIRA, 2005).

Existem várias metodologias adotadas entre os autores para a inoculação artificial de fungos e bactérias. Carvajal e Kimati,(1988) utilizaram suspensão de conídios inoculada através de pequenos ferimentos na casca de abacate, banana, mamão e manga para avaliar a patogenicidade de isolados de *C. gloeosporioides*, causadores de podridões de frutos.

Mafacioli et al. (2008), em seus estudos, realizaram testes de agressividade de *Colletotrichum gloeosporioides* em pupunheira, inoculando artificialmente o fungo, depositando um disco de papel filtro de 10mm de diâmetro, previamente embebido no inóculo, na concentração de  $3,0 \times 10^5$  esporos por ml, sobre as folhas previamente feridas com um conjunto de seis agulhas esterilizadas afixadas em rolha de cortiça e espaçadas 5mm entre si.

Silva (2005) avaliou a agressividade de *C. gloeosporioides* em manga, mamão, maracujá e goiaba na pós colheita, onde realizou a inoculação em frutos, perfurando-os com um furador flambado de 7 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade, onde um disco de meio de cultura contendo o micélio do *C. gloeosporioides*, com a mesma dimensão, foi retirado e sobreposto sobre o orifício feito nos frutos. A avaliação da severidade da doença foi realizada a cada 48 horas, medindo-se o diâmetro das lesões com régua em dois sentidos diametralmente opostos.

Henz et al. (1992) avaliaram 52 genótipos de *Capsicum* spp. em relação à resistência do fruto a *C. gloeosporioides*. Os frutos foram inoculados através de um ferimento com

alfinete na parte mediana onde, posteriormente, foi depositado o inóculo em suspensão. A avaliação foi feita 4 dias após a inoculação, com base no diâmetro médio da lesão. Menezes e Hanlin (1987) fizeram inoculações cruzadas para avaliar a patogenicidade de cinco isolados de *C. gloeosporioides* em frutos de abacate, banana, citros, manga e chuchu, através da inoculação, por deposição de suspensão de conídios na superfície intacta dos frutos. Os sintomas de antracnose foram avaliados 12 dias após a inoculação. Madeira e Reifshneider (1987) testaram sete métodos de inoculação de *C. gloeosporioides* em frutos de berinjela, constatando que o método de inoculação onde se utilizava 0,1ml de suspensão de conídios do fungo (104 conídios/ml) na subepiderme do fruto, foi o mais indicado para avaliação de genótipos quanto à resistência ao patógeno. Martins et al. (2008); Bouza (2009) e Gonçalves (2001), em seus trabalhos, inocularam *C. gloeosporioides* em folhas de maracujá utilizando a metodologia de aspersão da suspensão sobre a face adaxial e abaxial das folhas previamente perfuradas com escova de cerdas de aço fina .

Rocha et al. (1998) testaram oito métodos de inoculação de *C. gloeosporioides* em frutos de maracujazeiro e verificaram que o método de deposição de disco de micélio-ágar sobre a epiderme do fruto, ferida com agulha hipodérmica foi o mais eficiente, pois todos os isolados estudados foram capazes de causar necrose.

Francisco Neto et al. (1995), utilizando um isolado de *C. gloeosporioides*, obtido de fruto de maracujazeiro, para inoculação em folhas, ramos e frutos constatou que os sintomas de antracnose só apareceram quando a inoculação foi feita através de ferimentos.

Viana (2007) testou duas metodologias de inoculação de *Xanthomonas axonopodis* em folhas de maracujazeiro, uma por meio da metodologia da agulha, onde duas agulhas foram imersas em suspensão bacteriana em plantas com seis meses de idade na concentração de  $10^8$  UFC/ml e quatro furos foram feitos na parte abaxial de cada folha inoculada e a outra metodologia testada foi a inoculação em plantas com sete meses de idade, utilizando o método do corte com tesoura, onde o ápice da folha foi cortado com uma tesoura imersa na suspensão bacteriana, na concentração de  $10^8$  UFC/ml.

Nakatani et al. (2009), no estudo da variabilidade genética de isolados de *Xanthomonas axonopodis* em maracujazeiro, utilizaram a metodologia da tesoura, na realização de testes de patogenicidade dos isolados. Miranda (2004), em seu trabalho, também fez uso da inoculação artificial, utilizando a metodologia da tesoura.

Bouza (2009) inoculou mudas de maracujazeiro com *Xanthomonas axonopodis*, em casa de vegetação com a metodologia de aspersão da suspensão bacteriana na concentração

de  $10^6$  UFC/ml sobre a face adaxial e abaxial das folhas previamente perfuradas com escova de cerdas de aço fina.

Junqueira (2010); Furhmann (2011) e Villela (2012) utilizaram nas inoculações artificiais de *Xanthomonas axonopodis* em maracujazeiro, um furador circular para cintos adaptado, de 6 mm de diâmetro, previamente imerso na suspensão bacteriana, na concentração de  $10^8$  UFC/ml. Os orifícios foram feitos na segunda e terceira folhas, a partir do ápice. Os autores tem realizado com sucesso essa metodologia.

Nas inoculações artificiais do vírus (CABMV ou PWV), muitos autores tem utilizado o extrato preparado em almofariz, macerando a proporção de 1 g de tecido (folha infectada) para 10 ml de suspensão tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. Uma pequena quantidade de “celite” (abrasivo) é adicionada ao extrato obtido e a inoculação do vírus é realizada friccionando as partes superiores das folhas com o dedo molhado com o extrato (PINTO et al., 2008; CERQUEIRA-SILVA et al., 2008b; ANJOS et al., 2002; BELLON, 2008; FONSECA, 2008, VIANA, 2007; GONÇALVES, 2011).

### **2.9.1 Quantificação de doenças de plantas**

A quantificação dos danos é o passo inicial para o desenvolvimento de qualquer programa de manejo de doenças. A quantificação de doenças é o processo que visa avaliar os sintomas causados pelos agentes patogênicos nas plantas e seus sinais (estruturas do patógeno associadas aos tecidos doentes). Os sintomas são mensurados e expressos em unidades que permitam comparações objetivas. O objetivo da quantificação é fornecer dados que permitam: estimar a extensão dos danos e realizar estudos de perda, comparar a eficiência de métodos de controle, realizar estudos básicos de ecologia do fitopatógeno e epidemiologia, comparar seleções e variedades em programas de melhoramento genético (LARANJEIRA, 2005). As medidas básicas para a mensuração desses sintomas são: incidência (é a porcentagem ou frequência de plantas doentes ou partes de plantas doentes em uma amostra ou população); severidade (é a porcentagem da área ou do volume do tecido doente); intensidade de doença (significa nível de doença combinando informações de incidência e severidade) e densidade do patógeno (é a quantidade de propágulos ou outros sinais do patógeno por unidade amostral ou mesmo por unidade de área, volume ou massa do hospedeiro). Os principais métodos de avaliação são: frequência de amostras doente, escalas diagramáticas e chaves descritivas (LARANJEIRA, 2005).

A incidência tem como principal vantagem a rapidez de execução, reprodutibilidade dos resultados, o que permite realizar estimativas acuradas das curvas de progresso da doença (BERGAMIN FILHO e AMORIM, 1996). A severidade é a variável mais utilizada para quantificar doenças foliares e, em geral, é avaliada visualmente, sendo as estimativas subjetivas. A grande vantagem de se quantificar a severidade é a capacidade de expressar o dano real causado pelos patógenos e caracterizar o nível de resistência da planta estudada. Porém, é um método trabalhoso e demorado, subjetivo e muito dependente da acurácia do avaliador e da escala (BERGAMIN FILHO e AMORIM, 1996). A curva de progresso de doença mostra o desenvolvimento de uma epidemia num período de tempo (MADDEN, 1980) e é considerada a melhor representação da epidemia (BERGAMIN FILHO, 1995). Através dela, a interação entre patógeno, hospedeiro e ambiente pode ser caracterizada e, com isso, diferentes e possíveis estratégias de controle podem ser avaliadas. A quantificação de doenças quer seja pela incidência ou pela severidade, é fundamental para estudos epidemiológicos e de manejo. Avaliações precisas e acuradas são essenciais para definir as estratégias de manejo das doenças, para quantificar e modelar o progresso da doença no tempo e no espaço, para prever a intensidade das doenças no futuro e para elucidar a relação entre injúria e dano (MADDEN e NUTTER, 1995; NUTTER e SCHUTZ, 1995).

### **3.OBJETIVO GERAL**

Estudar a filogenia, variabilidade genética e caracterizar espécies de *Passifloras* silvestres, comerciais e híbridos interespecíficos como fontes de resistência a doenças.

### **4.OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**4.1** Obter e analisar seqüências de DNA ribossomal nuclear, ITS e DNA de cloroplasto das principais espécies do gênero *Passiflora* do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Cerrados, a fim de esclarecer questões taxonômicas dos acessos e colocá-los em seu contexto filogenético, servindo de base para a compreensão da compatibilidade genética interespecífica de espécies utilizadas em programas de melhoramento;

**4.2** Analisar a variabilidade genética de genótipos elite de maracujazeiro obtidos em programas de retrocruzamento envolvendo espécies silvestres e comerciais de maracujazeiro com base em marcadores moleculares do DNA;

**4.3** Avaliar meios de cultura e métodos de inoculação artificial de *Colletotrichum gloeosporioides* em maracujazeiro azedo;

**4.4** Caracterizar e quantificar a resistência de cultivares comerciais de maracujazeiro azedo à resistência à antracnose em condições controladas.

**4.5** Caracterizar e quantificar a resistência de espécies silvestres de maracujazeiro e genótipos obtidos por retrocruzamentos à antracnose em condições controladas;

**4.6** Caracterizar e quantificar a resistência de genótipos obtidos por retrocruzamentos e de cultivares de maracujazeiro azedo à bacteriose em condições controladas;

**4.7** Caracterizar e quantificar a resistência de espécies silvestres de maracujazeiro e genótipos obtidos por retrocruzamentos à virose do endurecimento dos frutos em condições controladas.

## 5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL.2006:-Anuário estatístico da agricultura brasileira. Maracujá. São Paulo: FNP-**Consultoria e Comercio**, 2006.p.370-375.

ALMEIDA, L. C. C. Identificação específica de *Colletotrichum* caracterização da agressividade e efeito indutores químicos no controle da antracnose em maracujá amarelo. 2005. 79 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - **Universidades Federal Rural de Pernambuco**, Recife.

AMORIM, J. D. S., SOUZA, M. M., JOSÉ, A., VIANA, C., FREITAS, J. C. O. (2011) Self-, cross- and interspecific pollinations in *Passiflora capsularis* and *P. rubra*. **Revista Brasileira de Botânica**, 34(4):537–544.

ANGEL, E. O.; FARJADO, D.; GRUM, M.; TOHME, J.; LOBO, M. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. **Euphytica, Dordrecht**, v. 101, n. 3, p. 341-347, 1998.

ANJOS, J.R.N.; 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: Embrapa Cerrados, 2001. 17p.

ARX, J. A. Von. Die arten der gattung *Colletotrichum corda*. **Phytopathologische Zeitschrift, Berlin**, v. 29, n. 4, p. 413-468, 1957.

BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford, UK: **CABI International**, 1992. 388 p.

BEAL, P.R. Cytology of native Australian and several exotic *Passiflora* species. Chromosome morphology. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences*, V. 30, n.1, p.17-18, 1973.

BELLON, G. Variabilidade genética de acessos de *passiflora alata* curtis com base em marcadores rapd e na resistência à doenças-Brasília,. **Dissertação** de Mestrado Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia. 112p. il. (2008)

BELLON, G.; FALEIRO, FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SANTOS, E. C.dos .; BRAGA, M. F.; GUIMARÃES, C. T. Genetic variability of wild and commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) accessions using RAPD markers. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2007, vol.29, n. 1, ISSN 0100-2945.

BELO, G. (2010) Análises morfológicas e genéticas em progênie híbrida F1 do cruzamento *Passiflora gardneri* Mast X *Passiflora gibertii* N.E. Brow. **Tese** (Mestrado) – Ilheus- BA, Universidade Estadual de Santa Cruz, 128p.

BERGAMIN FILHO, A. Curvas de progresso de doença. In: Bergamin Filho, A.; KIMATI, H.; AMORIN, A. Manual de fitopatologia. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, v. 1. p. 602-625.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 299p.

BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; PASSOS, I. R. S. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 559-586.

BERNACCI, L.C. (Coord.) Passifloraceae. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; GIULIETTI, A.M.; MELHEM, T.S. (Ed.) **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: RiMa/FAPESP, 2003. v.3, p. 247-274.

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

BOUZA, R.B. Reação em progênies de maracujá-azedo à antracnose, septoriose, cladosporiose e bacteriose em condições de campo e casa de vegetação. 2009. 160p. **Dissertação** (Mestrado em Fitopatologia). Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

BOWDEN, M.W.A. A list of chromosome numbers in higher plants. II Menispermaceae to Verbanaceae. *American Journal of Botany*, v.32, p. 191-201, 1945.

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. IV **Reunião técnica de pesquisas em maracujazeiro**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 86- 90.

BRAGA, M. F.; Mapeamento de QTL (Quantitative Trait Loci) associados à resistência do maracujá-doce à bacteriose / Marcelo Fideles Braga. - - Piracicaba, 2011. 286 p. : il. **Tese** (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

BRAZ, A.S.K., SANTANA, E.N., ZAMBOLIM, E.M., COSTA, A.F., OTONI, W.C. e ZERBINI, F.M. **Molecular characterization of two isolates of South African Passiflora virus infecting passionfruit in Brazil**. *Virus Reviews and Research* 3:146. 1998. (Abstract).

BRAZILIANFRUIT- Programa de promoção das exportações de frutas brasileiras e derivados. Perfil das Exportações. Disponível em: <http://www.brazilianfruit.org.br>. Acesso em: 28 de out. 2010.

BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. H. Hibridação em maracujá. In: BORÉM, A (Ed). **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 379-399.

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.; Braga, M.F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 317-338.

BRUMMATT, R.K. Vascular plant families and genera. Kew: **Royal Botanic Gardens**, 1992. 804 p.

BUENO, P. A. de O.;MIRANDA, H. A.; PEIXOTO, J. R. JUNQUEIRA, N. T. V.; SOUZA, M. A. de F.; PIRES, M de C. Incidência e severidade de passionfruit woodiness vírus ( PWV) em 50 genótipos de maracujazeiro azedo, sob condições de campo no Distrito Federal. In: CONGRESSO BRASIELIRO DE FRUTICULTURA , n 18, 2004, Fortaleza. **Anais....Fortaleza: SBF, 2004.** 1 CD-ROM.

BUSO, G. S. C. Marcadores moleculares e análise filogenética, **Documento** 1370- Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia(ISSN 0102-0110), 22 p. 2005

CARNEIRO, M. S.; CAMARGO, L. E. A; COELHO, AS. G.; VENCOVSKY, R.; LEITE, R. P.; STENZEL, N. M. C.; VIEIRA, M. L. C. RAPD-based genetic linkage maps of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **Genome**, v. 45, p. 670-678, 2002.

CARVALHO, M.C.G. e SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.3, p.735-744, 2010.

CARVALHO, A.J.C. de; SILVEIRA, S.F.da; MIRANDA, R.B.de; PINTO,R.S. **Manejo de pragas do maracujazeiro.** Campos dos Goytacazes, RJ: UENF,2001. 38 p.

CASSIANO, A. P. A. A.; LEMOS, E. G. M. OLIVEIRA, J. C. Avaliação de espécies de *Passiflora* através de marcadores moleculares RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 3, p. 214, 1998. Suplemento.

CASTELLEN, M. S.; CERVI, A. C.; AMARAL, W. A. N. **O gênero *Passiflora* L. nos Tabuleiros Costeiros.** In: SILVA Jr., J. F. (Org.). Recursos genéticos dos tabuleiros e seus ecossistemas associados- fruteiras. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2005. 32 p.

CERQUEIRA-SILVA C.B, MOREIRA C.N, FIGUEIRA A.R, CORRÊA R.X, OLIVEIRA A.C.Detection of a resistance gradient to Passion fruit woodiness virus and selection of 'yellow' passion fruit plants under field conditions. **Genetics and Molecular Research - ISSN- 1675680- p.1209-1216 (2008).**

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M., CARDOSO-SILVA, C.B., NONATO, J.V.A., CORRÊA, R.X., OLIVEIRA, A.C. (2008a) Confirmação de híbridos interespecíficos obtidos de cruzamentos entre *Passiflora watsoniana* e *Passiflora alata*. CD-Room dos **Anais do XX Congresso Brasileiro de Fruticultura**, 2008, Vitória – ES.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M., MOREIRA, C.N., FIGUEIRA, A.R., CORREA, R.X. (2008) Detection of a resistance gradient to *Passion fruit woodiness virus* and selection of 'yellow' passion fruit plants under field conditions. **Genetics and molecular research**, 7:1209-1216.

CERVI AC (1997) Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria** 45: 1-92.

CERVI, A.C.; Milward-de-Azevedo, M.A.; Bernacci, L.C. Passifloraceae. In Forzza, R.F. et al. (eds.) **Catálogo de plantas e fungos do Brasil.** Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. v. 2, p.1432-1436, 2010.

CHAGAS, C.M., KITAJIMA, E.W. e LIN, M.T. **Grave moléstia em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Estado da Bahia causada por um isolado do vírus do "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. e BELLUZI, B.M. **Ocorrência do endurecimento do fruto do maracujazeiro no Estado de São Paulo.** Revista Brasileira de Fruticultura 14:187-190. 1992.

COBB, N. A. Woodiness of the passionfruit. Agric. Gaz. N. S. W. 12: 407-418, 1901. In: KITAJIMA, E. W.; CHAGAS, C. M. e CRESTANI, O. A. **Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiros no Brasil.** **Fitopatologia Brasileira**, 11: 409-432, 1986.

COLATTO, U.L.D. **Reação de progênes de maracujazeiro azedo à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), à verrugose (*Cladosporium herbarum*) e à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*).** 97p. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia). Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

CONCEICÃO, L.D.H.C.S., SOUZA, M. M., BELO, G.O., SANTOS, S.F., FREITAS, J.C.O. (2011) Hybridization among wild passionflower species. **Revista Brasileira de Botânica** (Impresso), 34:237-240.

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

CUNHA, M.A.P. da. Prioridades de pesquisa por subárea e objetivo. In: REUNIÃO TÉCNICA: PESQUISA EM MARACUJAZEIRO NO BRASIL, 1998, Cruz das Almas, BA: EMBRAPA/CNPMF, 1998. p.11-14 (EMBRAPA-CNPMF. **Documentos**, 77).

DIAS, S. C. Morte precoce do maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) causado por patógenos que afetam a parte aérea da planta. 1990. 132 f. **Dissertação** (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

DIAS, S. C.; TAKATSU, A. Ocorrência de bacteriose do maracujazeiro (*Passiflora* sp.) causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, n.2, p. 140, 1987.

DYE, D.; BRADBURY, W.; GOTO, M.; HAYWARD, M.; LELLIOTT, A.C. e SCHROTH, M.N. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. **Review of Plant Pathology** 59: 153-168. 1980.

ESCOBAR, L.K. A new subgenus and five new species in *Passiflora* (Passifloraceae) from South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 76, p. 877-885, 1988.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BELLON, G.; BORGES, T. A.; ANJOS, J. R. N.; PEIXOTO, J. R.; BRAGA, M. F.; SANTOS, D. G. Diversidade genética de espécies

silvestres de maracujazeiro com resistência múltipla a doenças com base em marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. S325, 2004. Suplemento

FALEIRO, F.; **Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina –DF, Embrapa Cerrados, 102 p, 2007.

FALEIRO, F.G. et al. Importância e avanços do pré-melhoramento de Passiflora. In: Lopes, M.A.; Fávero, A.P.; Ferreira, M.A.J.F.; Faleiro, F.G. (Eds.) **Curso Internacional de pré-melhoramento de plantas**. Brasília: Embrapa, 2006.p. 138-142.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. Recursos genéticos: conservação, caracterização e uso. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M.; REIS JÚNIOR, F.B. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2011a. p. 513-551.

FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA N T V., BRAGA, M.F.,OLIVEIRA, E. J. de.,PEIXOTO,J.R, COSTA, A.M. **Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro: histórico e perspectivas** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011b.36 p.ISSN 1517-5111;ISSN Online 2176-5081;307).

FALEIRO, F.G.; FARIAS NETO, A.L.; RIBEIRO JÚNIOR, W.Q. **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios**. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2008b. 184p. il.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. Passionfruit (Passiflora spp.) improvement using wild species. In: MARIANTE, A.S.; SAMPAIO, M.J.A.; INGLIS, M.C.V. The state of Brazil's plant genetic resources. Second National Report. Conservation and Sustainable Utilization for food and agriculture. **Embrapa Technological Information**: Brasília, DF. 2009. p. 101-106.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – desafios da pesquisa In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 187-210.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Pesquisa e desenvolvimento do maracujá**. In: ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, R.C.; (Eds.). Agricultura Tropical: Quatro Décadas de Inovações Tecnológicas, Institucionais e Políticas. 1 ed. Brasília: Embrapa, 2008a. p. 411-416

FERREIRA, E R.; OLIVEIRA, J. C. Germoplasma de Passiflora no Brasil. In: SÃO JOSÉ, I A. R. A cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEp, 1991. p. 187-200. **FRUTISÉRIES 2**, Maracujá. Brasília: MI/SIN/DDH, 2002. 8 p.

FERREIRA, E. R. Germoplasma de maracujá. In: Reunião técnica de pesquisa em maracujazeiro no Brasil. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 1998. p. 48-53. (**EMBRAPA/CNPME Documentos 77**).

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, M.E.; FALEIRO, F.G. Biotecnologia: avanços e aplicações no melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F.G.; FARIAS NETO, A.L. **Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais**. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2008. p. 765-792.

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

FEUILLET, C., MACDOUGAL, J. (2003). A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Passiflora: The journal e Newsletter of Passiflora Society International*. 13(2): 34-38.

FONSECA, K. G. da. Retrocruzamentos visando à obtenção de resistência do maracujazeiro-azedo à virose do endurecimento dos frutos, auxiliando por marcadores moleculares. 96 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Agrárias)-Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

FONSECA, K.G.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; PEIXOTO, J.R.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, E.C. Análise da recuperação do genoma recorrente em maracujazeiro-azedo com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 145-153. 2009.

FRANCISCO NETO, E.; OLIVEIRA, J. C.; CENTURION, M. A. P. C. e NAKAMURA, K. Influência da idade da folha, da luz e do método de inoculação na infecção de *Passiflora* por *Colletotrichum gloeosporioides*. **Summa Phytopathologica**, v.21, p.25-30, 1995.

FREITAS, L.B. História evolutiva das espécies de *Passiflora* L. de ocorrência no Rio Grande do Sul: aspectos genéticos, estrutura populacional e filogenia. **Revista Brasileira de Bioci.** Porto Alegre, v. 9, s.1, p. 41-47, abr. 2011. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1776>.

FURMANN, E. Reação de híbridos interespecíficos de maracujazeiro à bacteriose e características físico-químicas de frutos. Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2011; 95 p. (Dissertação de Mestrado em Agronomia).

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

GIORIA, R. Viroses do maracujazeiro: incidência na Alta Paulista, SP, danos causados pelo “passion fruit woodness vírus” (PWV) e sintomatologia do “cucumber mosaic vírus” (CMV). Piracicaba, SP: ESALQ, 1999. 67p. (**Dissertação de Mestrado**).

GOES, A. Doenças fúngicas da parte aérea da cultura do maracujá. In: Simpósio Brasileiro sobre a cultura do maracujazeiro. Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal : FUNEP, 1998. p. 208-216.

GONÇALVES, I.M.P. Produtividade e reação de progênies de maracujazeiro azedo a doenças em campo e casa de vegetação. **Dissertação** de Mestrado – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2011. 121p.

GONÇALVES, E.R. *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*: taxonomia polifásica, filogenia e detecção. 81f. **Tese** (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP. 2000.

GUERRA, M.S. Citogenética de Angiospermas coletadas em Pernambuco. **Rev Bras. Genet.**, v.9 p.21-40, 1986.

HANSEN AK, GILBERT LE, SIMPSON BB, DOWNIE SR, CERVI AC e JANSEN RK (2006) Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in Passiflora. **Syst Bot** 31:138-150.

HENZ, G. P.; BOITEUX, L. S. e LIMA, M. F. Reação de frutos de *Capsicum* spp a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Fitopatol. Bras.**, v.17, n.2., 1992.

IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Consulta em: 12/12/2012

IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Consulta em: 20/08/2011.

JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEGER e PUMBLEY, R.A. The biology and control of *Colletotrichum* sp. on tropical fruit crops. **Plant Pathology**. 39: p. 343-366. 1990.

JÚNIOR, H.J.T, FISCHER, I.H., CÂMARA, M.P.S. E MASSOLA JÚNIOR, N.S. First report of *Colletotrichum boninense* infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, 2010, **5**, 70–72

JUNQUEIRA, K. P. Resistência genética e induzida de maracujazeiro à bacteriose. 143p. Brasília, 2010. **Tese** (Doutorado Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

JUNQUEIRA, N. T. V.; ANJOS, J. R. N.; JUNQUEIRA, L. P.; SHARMA, R. D. Doenças do maracujá-doce. In: MANICA, I.; BRANCHER, A.; SANZONOWICZ, C.; ICUMA, I. M.; AGUIAR, J. L. P.; AZEVEDO, J. A.; VASCONCELLOS, M. A. S.; JUNQUEIRA, N. T. V. Maracujá-doce: tecnologia de produção e pós-colheita. Porto Alegre, RS: ed. **Cinco Continentes**, 2004. p. 113-144.

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.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81-106.

JUNQUEIRA, N.T.V.; ANJOS, J.R.N.; SHARMA, R.D.; SANZONWICZ, C.; ANDRADE, L.R.M. 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.; 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**, Brasília, v.38, n.8, p. 1005-1010, 2003.

KILLIP, E. P. The American species of Passifloraceae. Chicago, Field Museum of **Natural History**, 1938. 613p. (Bot. Series, 19, Part I).

KIMATI, H; AMORIM, L.;REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO,L. E. A. **Manual de Fitopatologia**. 4 ed. São Paulo: Agronomica Ceres, 2005, v2.

KITAJIMA, E.W e REZENDE, J.A.M. Enfermidades de etiologia viral e fitoplasmática.In: BRUCKNER, C.H.; PIKANÇO, M.C. (Ed.). **Maracujá, tecnologia de produção,24 pós colhieta, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco continentes, 2001. p. 277-282.

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

LARANJEIRA, F.F., Problemas e perspectivas de avaliação de doenças como suporte ao melhoramento do maracujazeiro. IN: FALEIRO,F.G., JUNQUEIRA, N.T.V., BRAGA, M.F.(Ed). **Maracujá, germoplasma e melhoramento genético**. Brasília – Embrapa Cerrados 2005, p.161-183.

LEITE JR., R.P. Bacteriose do maracujazeiro e estratégias para seu controle. In: **REUNIÃO TECNICA DA CULTURA DO MARACUJAZEIRO**, 3., Viçosa, 2002. Anais, Viçosa: UFV/DFT, 2002. p. 97-98.

LIBERATO, J.R. Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides em maracujazeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; MONTEIRO, A.J.A. e COSTA, H (Ed). Controle de doenças de plantas fruteiras. Viçosa: **Suprema**, 2002. v.2. pp.699-825.

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

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; OLIVEIRA, A. V.; CAMARGO, L. E. A; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biociência**, v. 29, p. 64-68, 2003.

LORENZ, A.P. Relações evolutivas entre *Passiflora actinia* Hoocker e *Passiflora elegans* Masters (Passifloraceae)- **Dissertação de mestrado**,Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Porto Alegre, 95 p. 2002.

MADDEN, L.V. e NUTTER, F.W. JR. Modeling crop losses at the field scale. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 17:154-166, 1995.

MADDEN, L.V. Quantification of disease progression. **Protection Ecology**, 1980, v. 2, p. 159-176, 1980.

MADEIRA, M. C. B. e REIFSHNEIDER, F. J. B. Avaliação de métodos de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de berinjela. **Fitopatol. Bras.** , v.12, n.4, 1987.

MAFACIOLI, R; TESSMANN, D.J; SANTOS, A.F. dos e VIDA, J. B. Variabilidade patogênica e efeito de carboidratos no crescimento micelial, esporulação e agressividade de *Colletotrichum gloeosporioides* da pupunheira. **Summa phytopathol.** [online]. 2008, vol.34, n.1 [cited 2014-01 26], pp. 18-21 . Available from:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010054052008000100004&lng=ene&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010054052008000100004&lng=ene&nrm=iso)>. ISSN 0100-5405. [http://dx.doi.org/10.1590/S0100\\_54052008000100004](http://dx.doi.org/10.1590/S0100_54052008000100004)

MALAVOLTA Jr. V. A. **Bacteriose do maracujazeiro**. In: Maracujá do plantio à colheita, Jaboticabal: Funep, 1998. P. 217-229.

MARTINS, Irene; PEIXOTO, José Ricardo; JUNQUEIRA, Nilton Vilela Tadeu and MELLO, Sueli Corrêa Marques de. Reação de genótipos de maracujazeiro-amarelo ao *Colletotrichum gloeosporioides*. **Rev. Bras. Frutic.** [online]. 2008, vol.30, n.3, pp. 639-643. ISSN 0100-2945. doi: 10.1590/S0100-29452008000300013.

MCKERN, N. M.; STRIKE, P. M.; BARNETT, O.W.; DIJKSTRA,J.;SHUKLA, D. D.; WARD, C. W. Cowpea aphid borne mosaic virus- Morocco and South African Passiflora virus are strains of the same potyvirus. **Archives of virology**, v. 136, p.207- 217, 1994.

MEDEIROS, S.A.F; MENEZES,M. Potencial antagônico de alguns fungos a *colletotrichum gloeosporioides* agente da antracnose do cajueiro, *Anacardium occidentale*. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, n.1, p.84-91, 1994.

MELETTI, L. M. M. Tendências e Perspectivas da Pesquisa em Melhoramento genético do maracujazeiro. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, 3., 2002, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, 2002. p. 81- 87.

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

MELLO, S. C. M.; LOPES, C. A. e TAKATSU, A. Avaliação da virulência de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ao tomateiro. **Fitopatol. Bras.**, v.21, p.39-43, 1996.

MELO, N. F., CERVI, A. C., GUERRA, M. (2001). Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Plant Systematic and Evolution** 226(1): 69-84.

MENEZES, M. e HANLIN, R. T. Avaliação da patogenicidade de *Colletotrichum gloeosporioides* através de inoculações cruzadas. **Fitopatol. Bras.**, v.12, n.2, 1987.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, DF, v. 27, suplemento, p. 23-27, ago. 2002.

MUSCHNER, V.C.; LORENZ, A.P.; CERVI, A.C.; BONATTO, S.L.; SOUZA -CHIES, T.T.; SALZANO, F.M. e FREITAS, L.B. 2003. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany**, 90: 1229-1238.

MUSCHNER VC (2005) Filogenia molecular, taxas evolutivas, tempo de divergência e herança organelar em *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Tese de doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 162pp.

MUSCHNER, V.C. 2001. Análise filogenética comparada de três marcadores de DNA no gênero *Passiflora* (Passifloraceae). **Dissertação de Mestrado**, Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

NAKATANI, Andreia K.; LOPES, Ricardo; CAMARGO, Luis E.A.. Variabilidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. **Summa phytopathol.**, Botucatu, v.35, n.2, June 2009. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-54052009000200006&lng=en&rm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052009000200006&lng=en&rm=iso)>. access on 04 Feb. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052009000200006>.

NASCIMENTO, A.V., SANTANA, E.N., BRAZ, A.S., ALFENAS, P.F., PIO-RIBEIRO, G., ANDRADE, G.P., DE CARVALHO, M.G., ZERBINI, F.M. (2006). Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. *Archives of virology*, 151(9):1797–809.

NASCIMENTO, A.V.S., SOUZA, A.R.R., ALFENAS, P.S., ANDRADE, G.P., CARVALHO, M.G., PIO-RIBEIRO, G., ZERBINI, F.M. (2004) Análise filogenética de potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 29(4):378-383.

NASCIMENTO, W. O.; TOMÉ, A T.; OLIVEIRA, M. S. P.; MÜLLER, C. H.; CARVALHO, J.E.U. Seleção de progênies de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) quanto à qualidade de frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 186-188, 2003.

NOGUEIRA, E. A.; MELLO, N. T. C. de; RIGHETTO, P. R.; SANNAZZARO. Produção integrada de frutas: a inserção do maracujá paulista. Disponível em: <[www.iea.sp.gov.br](http://www.iea.sp.gov.br)>. 2007, Acesso em: 10.out.2010.

NUTTER, F.W. JR. e SCHULTZ, P.M. Improving the accuracy and precision of diseases assessments: selection of methods and use of computer -aided training programs. *Canadian Journal of plant pathology*, 17:174 -184, 1995.

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, BA. **Anais...** . Salvador, BA: SBF, 1994. v. 3, p. 827. (Resumo 347).

OLIVEIRA, J.C. e RUGGIERO, C. Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo. In: RUGGIERO, C. (Ed.) *Maracujá: do plantio à colheita*. Jaboticabal: FUNEP. **Anais do 5º Simpósio Brasileiro sobre a cultura do maracujazeiro**, 1998. p. 291-310.

OPENSHAW, S.J.; JARBOE, S.G.; BEAVIS, W.D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: R. LOWER (ed.). *ASHS/CSSA Joint Plant Breeding Symposium on Analysis of Molecular Marker Data*, Oregon State University, Corvallis, 1994. p. 41-43.p.

ORTEGA G.G., SCHMIDT P.C. (1995) Obtención de comprimidos conteniendo extractos atomizados de flor de la pasión (*Passiflora incarnata* L.) **Acta Farmacêutica Bonaerense** 14(3): 173-180.

PÁDUA, J.G. Análises genéticas de espécies do gênero *Passiflora* L. com base em abordagens filogenéticas, morfométricas e em marcadores microssatélites. ESALQ/USP, Piracicaba 112p. 2004. (Tese de Doutorado).

PEREIRA, M.G.; PEREIRA, T.N.S.; PIO VIANA, A. Marcadores moleculares aplicados ao melhoramento do maracujazeiro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds). **Maracujá- germoplasma e melhoramento genético. Planaltina Distrito Federal: Embrapa Cerrados**, 2005. p.277-292.

PINTO, P.H.D., PEIXOTO, J.R., JUNQUEIRA, N.T.V., RESENDE, R.O., MATTOS, J.K.A., MELO, B. Reação de genótipos de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (Cowpea aphid-borne mosaic virus – CABMV). *Bioscience journal*, Uberlândia, 24(2):19-26, 2008.

PIO RIBEIRO, G.; MARIANO, R. de L.R.D. Doenças do maracujazeiro (*Passiflora* spp.) In: KIMATI, L.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, I.E.A.; REZENDE, J.A. (ed.) Manual de fitopatologia : doenças das plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo: Agrônômica Ceres, 1997. v.2, p.525-534.

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.

QUIRINO, T. R. Agricultura e meio ambiente: tendências. In: SILVEIRA, M. A. da; VILELA, S. L. de O. (Ed.). Globalização e sustentabilidade da agricultura. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 109-138. (**Embrapa-CNPMA. Documentos, n. 15**).

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, BA, DFZ, UESB, 1994. p. 116-125.

ROCHA, J. DE R DE S., OLIVEIRA, N.T.DE., MENEZES, M. Comparação da eficiência de métodos de inoculação na avaliação da patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de maracujá (*passiflora edulis*) Brazilian **Archives of Biology and Technology**, v.41, n.1, p.140-148, mar. 1998

ROCHA, J. de R. de S. Controle biológico de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da antracnose do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), com espécies de *Trichoderma*. 1997. 147 f. **Dissertação Mestrado**- Universidade de Pernambuco, Recife.

RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A. R.; VOLPE, C. A.; OLIVEIRA, J. C.; DURIGAN, J. F.; BAUMGARTNER, J. G.; SILVA, J. R. da; NAKAMURA, K.; FERREIRA, M. E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V. de P. Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção. Brasília, DF: EMBRAPA - SPI, 1996. 64 p. (**Publicações técnicas frupex**, 19).

RULL, V. 2008. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary- Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. **Molecular Ecology**, 17: 2722-2729.

SACCO, J.C. **Passifloráceas**. In: Flora Ilustrada Catarinense, I. Itajaí, 1980. 131p.

SANTANA, E.N., BRAZ, A.S.K., TORRES, L.B., ZAMBOLIM, E.M. e ZERBINI, F.M. **Molecular characterization of Potyvirus isolates causing passionfruit woodiness in Brazil**. Virus Reviews and Research 4(Supplement):153. 1999 (Abstract).

SANTOS, E.A., SOUZA, M.M., ABREU, P.P., DA CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S., ARAÚJO, I.S., VIANA, A.P., ALMEIDA, A.A.F., (2012) Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. **Euphytica**, 184(3):389–399.

SCHERER, N.M. 1999. Aplicação das seqüências dos espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal nuclear para estudos filogenéticos com o gênero *Passiflora* (Passifloraceae). **Relatório de Bacharelado em Ciências Biológicas**, Ênfase Molecular, Celular e Funcional, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SHUKLA, D.D. e WARD, C.W. **Amino acid sequence homology of coat protein as a basis for identification and classification of the potyvirus group**. *Journal of General Virology* 69:2703-2710. 1988.

SITHOLE-NIANG, I.; NYATHI, T.; MAXWELL, D.P.; CANDRESSE, T. Sequence of the 3'- terminal of a Zimbabwe isolate of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). **Archives of Virology**, v.141, p. 935-943. 1996.

SMALL, R.L.; RYBURN, J.A.; CRONN, R.C.; SEELANAN, T. e WENDEL, J.F. 1998. The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear *Adh* sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. **Am. J. Bot.** 85: 1301-1315.

SNOW, N.; MACDOUGAL, J.P. New Chromosomes Reports in *Passiflora* (Passifloraceae). **Syst. Bot.**, v.18, n.2, p.261- 273, 1993.

SOARES-SCOTT, M.D.; MELETTI, L.M.M.; ROSA, C.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Análise citológica em híbridos interespecíficos de *Passiflora* L. **Genetics and Molecular Biology**, v. 18, p. 427, 1998. Suppl.

SOUSA, M.A.F. Avaliação da produtividade, incidência e severidade de doenças em frutos de 17 genótipos de maracujazeiro-amarelo, cultivados no Distrito Federal. Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília; 2005, 120p. **Dissertação de Mestrado**.

SOUSA, M.A.F. Produtividade e reação de progênies de maracujazeiro azedo a doenças em campo e casa de vegetação. 248p. **Tese** (Doutorado em Fitopatologia). Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

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

SOUZA, L.S., JUNQUEIRA, N.T.V., LIMA, C.A., SILVA, D.G.P., FALEIRO, F.G., CAMPOS NETO, F.C., BERNACCI, L.C. (2008) Determinação da compatibilidade genética entre espécies de *Passifloras* visando a obtenção de híbridos resistentes a doença. **Anais do IX Simpósio Nacional do Cerrado, Brasília, DF, Brasil**.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and anamorph. In: BAILEY, J. A.; JEGGER, M. J. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: **CAB International**, 1992. 388

TOCCHINI, R.P.; NISIDA, A.L.A.C.; HASHIZUME, T.; MEDINA, J.C.; TURATTI, J.M. Processamento: produtos, caracterização e utilização. In: Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. 2ª ed. rev. e ampl. Campinas: ITAL, 1994. p. 161-195. (**Série Frutas Tropicais**, 9).

ULMER T., MACDOUGAL J.M. (2004) Passiflora: **Passionflowers of the World**. Portland-Cambridge: Timber Press, 430p.

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. e WICKNER, R. (Eds.) Virus taxonomy. **Classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses**. New York: Academic Press. 2000.

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

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

VIEIRA, M.L.C. et al. **Métodos biotecnológicos aplicados ao melhoramento genético do maracujá**. In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. (Eds.) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 411-453.

VILLANOVA, A. C. C.; SILVA, D. G.P. D.;CASTIGLIONI, G. L.; JUNQUEIRA, N. T.V.; BRAGA, M. F.; SANTOS, E. C. dos.; SOBRAL, L.; LIMA, C. A. D.; Trasmissoão via semente da virose do Endurecimento do Fruto e da bacteriose do maracujazeiro. **XL Congresso Brasileiro de Fitopatologia**.Maringá-Paraná.Vol. 32, Suplemento, ISSN 0100-4158. p. 312, 2007.

VILLELA, J. G. A. RESISTÊNCIA DE CULTIVARES COMERCIAIS DE MARACUJAZEIRO AZEDO A ISOLADOS DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* EM CONDIÇÕES CONTROLADAS DE CASA DE VEGETAÇÃO. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília; 2012. 36 p. **Monografia**.

WALLER, J.M. Colletotrichum diseases of perennial and other cash crops. In: BAILEY, J.A. e JEGER, M.J. (Ed.) Colletotrichum: biology, pathology and control. England, **CAB International Wallingford**, 1992. p. 167-185.

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, p. 95-101. 1989.

ZAMBERLAN, P.M. 2007. Filogenia de *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) questões infra-subgenéricas. **Dissertação de mestrado** apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 105, p.

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. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 589-597.

## **CAPÍTULO 1**

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DA REGIÃO, RIBOSSOMAL  
NUCLEAR ITS E DE QUATRO LOCUS DO CLOROPLASTO  
COMO FERRAMENTA PARA CARACTERIZAÇÃO E  
ORGANIZAÇÃO DE UM BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE  
*PASSIFLORA* E SELEÇÃO DE ESPÉCIES PARA CRUZAMENTOS  
INTERESPECÍFICOS**

**PHYLOGENETIC ANALYSIS OF NUCLEAR RIBOSOMAL ITS  
AND FOUR CHLOROPLAST DNA LOCI AS A TOOL FOR THE  
CHARACTERIZATION AND ORGANIZATION OF A  
*PASSIFLORA* ACTIVE GERMPLASM BANK AND THE  
SELECTION OF SPECIES FOR INTERSPECIFIC CROSSES**

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DA REGIÃO ITS DE DNA NUCLEAR  
RIBOSSOMAL E DE QUATRO LOCOS DE DNA DE CLOROPLASTO DE  
ACESSOS DE *PASSIFLORA* COMO FERRAMENTA PARA  
CARACTERIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DE UM BANCO ATIVO DE  
GERMOPLASMA E SELEÇÃO DE ESPÉCIES PARA CRUZAMENTOS  
INTERESPECÍFICOS**

**RESUMO**

A análise filogenética foi utilizada para verificar a identidade de 48 acessos de um banco ativo de germoplasma de *Passiflora*, representando 43 diferentes espécies de interesse para o melhoramento genético do maracujazeiro azedo, doce e ornamental. As regiões de DNA utilizadas foram um loco ITS de DNA nuclear ribossomal e quatro locos do DNA de cloroplasto (*matK*, espaço intergênico *psbA-trnH*, *rbcL* e *trnL-F*). Em termos de resuspensão filogenética, a da região ITS foi superior às das regiões de cloroplasto analisadas individualmente ou em combinação, podendo ser utilizada como DNA *barcoding* para o gênero *Passiflora*. No entanto, a baixa disponibilidade de seqüências referências do banco de dados e as dificuldades técnicas na obtenção de seqüências de boa qualidade limitam sua utilidade para o gênero *Passiflora* atualmente. Correlacionando os dados obtidos de filogenia com as informações do programa de melhoramento de espécies de *Passiflora*, observou-se que a compatibilidade dos cruzamentos interespecíficos foi maior quando os genitores foram selecionados a partir do mesmo subgênero. Tais análises permitiram também a obtenção de importantes informações taxonômicas, evolutivas e filogenéticas para o gênero.

**Palavra chave:** Filogenia, maracujá, taxonomia, melhoramento genético

**PHYLOGENETIC ANALYSIS OF NUCLEAR RIBOSOMAL ITS AND FOUR CHLOROPLAST DNA LOCI AS A TOOL FOR THE CHARACTERIZATION AND ORGANIZATION OF A *PASSIFLORA* ACTIVE GERMPLASM BANK AND THE SELECTION OF SPECIES FOR INTERSPECIFIC CROSSES**

**ABSTRACT**

Phylogenetic analysis was used to verify the identity of 48 accessions from a *Passiflora* active germplasm bank, representing 43 different species of potential interest for the improvement of sour, sweet and ornamental passionfruit. The DNA loci used were nuclear ribosomal ITS and four chloroplast loci, matK, psbA-trnH intergenic spacer, rbcL and trnL-F. In terms of phylogenetic resolution, the ITS locus was superior to each chloroplast marker, individually and in combination in *Passiflora*, making it suitable as a DNA barcode in this genus. However, availability of data base reference sequences and technical difficulties in obtaining good quality data limit its usefulness in this genus currently. Correlating the obtained phylogenies with data from ongoing breeding programs, *Passiflora* species were much more likely to be compatible in interspecific crosses if the parents were selected from the same subgenus. These analyzes also allowed us to obtain important taxonomic, evolutionary and phylogenetic informations.

**Keywords:** Phylogeny, passionfruit, taxonomy, genetic improvement

## 1.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* é o mais importante da família *Passifloraceae*, com cerca de 400 espécies descritas, as quais ocorrem nos trópicos e regiões temperadas quentes (CERVI, 1997). O Brasil é um dos principais centros de distribuição geográfica do gênero *Passiflora*, onde ocorrem aproximadamente 130 espécies, das quais 88 são endêmicas, ou seja, encontradas somente no Brasil (BERNACCI et al., 2005; CERVI, 2010).

Muitas espécies do gênero *Passiflora* são cultivadas pelas propriedades alimentícias, ornamentais e medicinais, mas principalmente pela qualidade de seus frutos. Cerca de 70 espécies produzem frutos comestíveis (SOUZA e MELLETTI, 1997). O valor ornamental é conferido pelas belas flores, que exercem atração pelo seu tamanho, pela exuberância de suas cores e pela originalidade de suas formas (PEIXOTO, 2005). Várias espécies do gênero *Passiflora* 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, apresentando uma variedade enorme de fitoconstituintes com propriedades farmacológicas (COSTA e TUPINAMBÁ, 2005).

Outra utilização importante das espécies do gênero *Passiflora* é o fornecimento de genes potencialmente úteis e sua incorporação em espécies com características comerciais (FALEIRO e JUNQUEIRA, 2009). Genes relacionados à resistência a doenças, à autocompatibilidade, melhoria da qualidade física e química de frutos e insensibilidade ao fotoperíodo são alguns exemplos relatados por Faleiro et al. (2011). O Brasil é, atualmente, o maior produtor e o maior consumidor de maracujá do mundo e as ações de pesquisa e desenvolvimento foram muito importantes para este cenário atual (FALEIRO et al., 2008). Apesar de abrigar quase um terço das espécies atualmente conhecidas, apenas a espécie *P. edulis* Sims. (maracujá-azedo) apresentam cadeia produtiva desenvolvida no Brasil.

O conhecimento da classificação e identificação das espécies, da variabilidade genética intra e inter-específica e da relação entre as espécies cultivadas e seus parentes silvestres tem sido de considerável valor na conservação e utilização dos recursos genéticos. Além disso, o conhecimento da relação entre as espécies e sua evolução é fundamental para a sistemática que visa o estudo dos padrões evolucionários da

diversidade biológica. O gênero *Passiflora*, apesar de sua importância atual e potencial e de seu elevado número de espécies encontradas em vários tipos de vegetação no Brasil, ainda é pouco estudado e explorado comercialmente. A realização de estudos de caracterização de espécies de *Passiflora* é imprescindível para subsidiar o uso econômico dessas espécies, contribuindo para a sua conservação (FALEIRO et al., 2005). Atividades de caracterização e utilização prática das espécies silvestres de maracujá estão entre as principais demandas da pesquisa (FALEIRO et al., 2006).

Durante os últimos quinze anos, houve um aumento de publicações sobre filogenias moleculares construídas a partir de análises de sequências de DNA ribossômico e DNA de cloroplasto. A maioria dos estudos de filogenia molecular desenvolvidos para o gênero *Passiflora* busca elucidar questões taxonômicas (MUSCHNER et al., 2003; MUSCHNER, 2005; YOCKTENG e NADOT, 2004; PÁDUA, 2004; LORENZ-LEMKE et al., 2005; HANSEN et al., 2006; ZAMBERLAN, 2007). A taxonomia correta dos acessos, muitas vezes, não é um processo fácil, considerando a alta variabilidade intra-específica e o efeito ambiental sobre o fenótipo diferenciador entre espécies e variedades botânicas dentro da espécie (FALEIRO, 2007).

O Banco Ativo de Germoplasma de maracujazeiro da Embrapa Cerrados “Flor da Paixão” abriga uma das maiores coleções de espécies do gênero *Passiflora* do mundo. Algumas dúvidas quanto à correta classificação taxonômica de alguns acessos têm ocorrido, assim como questionamentos relacionados à variabilidade genética intra e interespecífica e relacionados à filogenia e evolução de espécies silvestres e comerciais de maracujazeiro.

No presente trabalho, objetivou-se obter e analisar seqüências da região ITS do DNA nuclear ribossomal e do DNA de cloroplasto das principais espécies do gênero *Passiflora* do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Cerrados 'Flor da Paixão' e compará-las com seqüências disponíveis nos bancos de dados, a fim de esclarecer questões taxonômicas e evolutivas desses acessos e colocá-los em seu contexto filogenético. Dessa forma, os dados obtidos podem, então, ser usados de base para melhorar o entendimento da compatibilidade genética interespecífica de espécies utilizadas em programas de melhoramento genético.

## 1.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.2.1 Seleção dos acessos

Para a análise filogenética, foram selecionados 48 acessos do gênero *Passiflora* mantidos no Banco Ativo de Germoplasma de *Passifloras* da Embrapa Cerrados (Tabela 1 e Figura 3A e 3B), representando espécies de interesse atual para o melhoramento genético do maracujazeiro azedo, doce e ornamental. Para complementar as análises, foram utilizadas seqüências de espécies de *Passiflora* disponíveis no GenBank.

**Tabela 1.** Acessos do gênero *Passiflora* mantidos no Banco de Germoplasma de *Passifloras* da Embrapa Cerrados, selecionados para as análises filogenéticas. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.

Nº	Espécies	Códigos
1	<i>P. sidifolia</i>	CPAC-MJ-16-01
2	<i>P. amethystina</i> “verdadeiro”	CPAC-MJ-13-00
3	<i>P. amethystina</i> “SP”	CPAC-MJ-13-01
4	<i>P. amethystina</i> “rui”	CPAC-MJ-13-00
5	<i>P. morifolia</i>	CPAC-MJ-48-01
6	<i>P. vitifolia</i>	CPAC-MJ-46-01
7	<i>P. mucronata</i>	CPAC-MJ-10-06
8	<i>P. cerradensis</i>	CPAC-MJ-45-01
9	<i>P. elegans</i>	CPAC-MJ-44-01
10	<i>P. caerulea</i>	CPAC-MJ-14-01
11	<i>P. coccinea</i>	CPAC-MJ-08-01
12	<i>P. actínia</i>	CPAC-MJ-04-01
13	<i>P. foetida</i>	CPAC-MJ-28-01
14	<i>P. cincinnata</i>	CPAC-MJ-26-01
15	<i>P. odontophylla</i>	CPAC-MJ-09-01
16	<i>P. gardineri</i>	CPAC-MJ-39-01
17	<i>P. bahenci</i>	CPAC-MJ-58-00
18	<i>P. speciosa</i>	CPAC-MJ-20-01
19	<i>P. micropetala</i>	CPAC-MJ-41-01
20	<i>P. malacophylla</i>	CPAC-MJ-43-01
21	<i>P. ambigua</i>	CPAC-MJ-49-01
22	<i>P. hatschbachii</i>	CPAC-MJ-50-01
23	<i>P. ferruginosa</i>	CPAC-MJ-59-00
24	<i>P. coreacea</i>	CPAC-MJ-60-00
25	<i>P. organensi</i>	CPAC-MJ-51-01
26	<i>P. citrina</i>	CPAC-MJ-61-00
27	<i>P. sanguinolenta</i>	CPAC-MJ-62-00
28	<i>P. pentagona</i>	CPAC-MJ-63-00
29	<i>P. tenuifila</i>	CPAC-MJ-30-01
30	<i>P. recurva</i>	CPAC-MJ-64-00
31	<i>P. serrato-digitata</i>	CPAC-MJ-16-02
32	<i>P. auriculata</i>	CPAC-MJ-65-00
33	<i>P. edimundae</i>	CPAC-MJ-66-00
34	<i>P. subrotunda</i>	CPAC-MJ-17-02
35	<i>P. phoenicia</i>	CPAC-MJ-53-01
36	<i>P. quadriglandulosa</i>	CPAC-MJ-67-00
37	<i>P. nitida</i> “MT”	CPAC-MJ-01-07
38	<i>P. nitida</i> “Cerrado”	CPAC-MJ-01-01
39	<i>P. suberosa</i>	CPAC-MJ-35-01
40	<i>P. maliformes</i>	CPAC-MJ-68-00
41	<i>P. ramiformes</i>	CPAC-MJ-69-00
42	<i>P. laurifolia</i>	CPAC-MJ-70-00
43	<i>P. setacea</i>	CPAC-MJ-12-01
44	<i>P. trintae</i>	CPAC-MJ-40-01
45	<i>P. hematoestigma</i>	CPAC-MJ-24-01
46	<i>P. edulis</i> “roxo”	CPAC-MJ-21-03
47	<i>P. edulis</i> Sims“ 4 estigmas”	CPAC-MJ-M-23
48	<i>P. edulis</i> Sims“amarelo - Matriz GA2”	CPAC-MJ-M-01

## 1.2.2 Técnicas moleculares

As regiões de DNA sequenciadas foram uma região nuclear repetitiva (espaços transcritos internos (ITS) 1 e 2 do DNA ribossomal com o gene 5.8S rRNA na posição central.(Baldwin et al.,1995), e quatro locos codificados do DNA de cloroplasto, incluindo o espaço intergênico *trnH-psbA* altamente variável (Shaw et al., 2005), o intron *trnL* (UAA) e o espaço intergênico entre o exon *trnL* ( UAA ) 3' e o *trnF* ( GAA ) ( Taberlet et al. , 1991), e partes dos genes *rbcL* e *matK* utilizados para DNA *barcoding* de plantas (CBOL Plant Working Group, 2009).

O DNA genômico foi purificado a partir de aproximadamente 100 mg de folhas jovens, utilizando o método de extração (CTAB), brometo de cetiltrimetilamônio (Doyle e Doyle, 1987). A sequência dos espaços transcritos interno (ITS), regiões ITS1 e ITS2, juntamente com o DNA 5.8S central do gene ribossomal nuclear foi amplificada por meio de reações de PCR contendo 2 ng de DNA genômico, tampão de PCR 1X (Phoneutrea), com MgCl<sub>2</sub> 3,0 mM , dNTP 0,2 mM , albumina de soro bovino (BSA) 0,1 mg ml<sup>-1</sup> , 1,5 U da enzima Taq polimerase (Phoneutrea) , betaina 1,3 M e 0,25 µM de cada iniciador ("ITS5p" e "ITS8p"; Moeller e Cronk, 1997). O ciclo da PCR consistiu de 2 min a 95 °C, em seguida 35 ciclos de 20 seg a 95 °C, 30 seg a 50 °C e 90 segundos a 72 °C, seguido por 7 min a 72 °C. Os iniciadores internos localizados na região conservada 5.8S rDNA, "ITS2" e "ITS3" (WHITE et al., 1990) foram utilizados juntamente com os iniciadores de amplificação para o sequenciamento. A região ITS de vários acessos de *Passiflora* foi inicialmente recalcitrante ao sequenciamento automático da terminação de cadeia, devido à presença de forte sequência de poli -G e poli -C relacionada à estrutura secundária em produtos de PCR. Finalmente, obtiveram-se sequências ITS de alta qualidade, substituindo-se no mix de dNTP para PCR o dGTP pelo seu análogo ,7- deaza dGTP (DIERICK et al., 1993).

O espaço intergênico *trnH - psbA* do DNA do cloroplasto foi amplificado utilizando os iniciadores, *psbA3'f* (SANG et al., 1997) e *trnHf* (TATE e SIMPSON, 2003), e uma mistura de reação contendo tampão de PCR 1X, 0,25 µM de cada iniciador, dNTP 0,2 mM , MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, BSA 0,2 mgmL<sup>-1</sup>, 1,5 U da enzima Taq polimerase e 2,0 ng de cada amostra de DNA. O ciclo da PCR foi 95 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 20 seg , 48 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e uma extensão final de 7 minutos a 72 °C.

O intron *trnL* (UAA) e o espaço intergênico entre o exon *trnL* (UAA) 3' e o gene *trnF* (GAA) do DNA do cloroplasto foram amplificados em reações separadas com os iniciadores C e D, E e F, respectivamente (TABERLET et al., 1991). As reações de PCR foram realizadas como relatado para a região *trnH-psbA*. O ciclo da PCR para ambos os pares de iniciadores foi de 95 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 20 s, 54 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, seguido de um final de 10 min a 72 °C. Parte do gene *rbcL* do DNA de cloroplasto foi amplificado usando o par de iniciadores *rbcLa\_f* e *rbcLa\_r* (KRESS e ERICKSON, 2007), utilizando o mesmo mix utilizado para a PCR da região *trnH-psbA* e o mesmo ciclo de amplificação da região *psbA-trnH*. Parte do gene *matK* foi amplificado utilizando a mistura da PCR para a região *trnH-psb*, modificada pela adição de 1 M de betaína. Os iniciadores utilizados foram 1R\_KIM e 3F\_KIM (Dados não publicados de Ki-Joong Kim, listados em: DUNNING e SAVOLAINEN, 2010), e o ciclo de PCR foi o mesmo utilizado para a região *rbcL*.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e purificado para sequenciamento usando ExoSAP (GE Biosciences). Ambas as fitas de DNA dos produtos de PCR foram sequenciadas utilizando o kit Big Dye v.3.1 (Applied Biosystems) e os respectivos iniciadores de amplificação. Os produtos da amplificação foram resolvidos utilizando o sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems). As sequências foram alinhadas usando o programa ChromasPro v1.5 (Technelysium Pty Ltd), editado no programa BioEdit v7.0.9 (HALL, 1999) e as sequências contigs foram alinhadas usando MAFFT v. 7 com a opção G-INS-i (KATO e STANDLEY, 2013). A matriz *trnL*-F alinhada mostrou-se rica em *indels* potencialmente informativos os quais foram codificados e acrescentados à matriz de dados como nucleotídeo C ou A, para presença ou ausência, respectivamente, usando o esquema de codificação de SIMMONS e OCHOTERENA (2000), como implementado no programa Fastgap 1.2 (Borchsenius, F. 2009. FastGap 1.2. Department of Biosciences, Aarhus University, Denmark. Publicado online em [http://www.aubot.dk/FastGap\\_home.htm](http://www.aubot.dk/FastGap_home.htm)). Os dados das matrizes das sequências de DNA de cloroplasto foram concatenados na SequenceMatrix 1.7.8 (VAIDYA et al., 2010).

### 1.2.3 Análises filogenéticas

Estatísticas de máxima parcimônia padrão foram geradas seguindo uma busca heurística de agrupamentos em árvores usando o programa PAUP\* (versão 4.0b10, Swofford, 2003). O alinhamento de gaps foram interpretados como dados perdidos e buscas heurísticas compostas por mil repetições de cinco ciclos de adição taxon aleatória, segurando uma árvore por ciclo, com a otimização de carácter estado ACCTRAN e troca de ramificação TBR. Reponderação carácter progressiva também foi aplicada (discutido por Carpenter, 1994), otimizando o ajuste máximo para o índice de consistência redimensionado (CI), a fim de compensar homoplasia nas matrizes de dados.

Uma hipótese filogenética baseada na região seqüenciada dos cinco loci da matriz concatenada de DNA de cloroplasto foi obtida usando o método Bayesian Markov Chain Monte Carlo como implementado no MrBayes 3.2.2 (RONQUIST et al., 2012 ). Na análise preliminar usando o procedimento jModelTestv.2 (DARRIBA et al., 2012; GUINDON e GASCUEL, 2003), o modelo de substituição de nucleotídeos General Time Reversible + invgamma (GTR+IG) foi o que ofereceu o melhor ajuste baseado nos Critérios de Informação Bayesiano (CIB), para a maioria das matrizes de alinhamento. Na análise MrBayes, porém, o procedimento reversível-jump MCMC (HUELSENBECK et al., 2004) foi usado na otimização do modelo dentro da família GTR (nst=mixed rates=invgamma), e previamente autorizado a variar de forma independente para cada uma das quatro partições dos dados de sequencias do DNA de cloroplasto. Em cada análise, uma cadeia fixa e três móveis MCMC foram executadas em paralelo para 10 milhões de gerações, amostrando cada 1000 gerações. Este tempo de execução foi suficiente para o diagnóstico de convergência e para o desvio padrão médio da frequência de quebra cair para menos de 0,01 em cada execução. Os primeiros agrupamentos em árvores (25%) foram descartados (*burn-in*) antes do cálculo da árvore consenso baseado na regra maioria (50%). Convergência e adequação do *burn-in* foi confirmada pela visualização das probabilidades dos agrupamentos no programa (Tracer v1.5, disponível em <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>, dados não apresentados), onde uma distribuição normal dos valores log de probabilidade foi obtida para todos MCMC executados.

## 1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1.3.1 Utilidade e qualidade das regiões sequenciadas

Dados de seqüência das regiões amplificadas completas dos cinco regiões do genoma foram gerados com sucesso para todos os 48 acessos de *Passiflora* selecionados no Banco de Ativo de Germoplasma da Embrapa Cerrados. Nas regiões ITS, *matK* e espaço intergênico *trnH-psbA*, muitas das seqüências geradas são novas para as espécies de *Passiflora*, o que contribuirá para o contínuo esforço no estudo DNA *barcoding* em plantas (HOLLINGSWORTH et al., 2011). As regiões *trnL-trnF* e *rbcL* foram, até no momento da análise dos dados, os mais representados para o gênero *Passiflora* no Genbank, permitindo muitas comparações diretas com as espécies da coleção da Embrapa e a inclusão de uma maior quantidade de seqüências de referência nas análises filogenéticas (Tabela 2).

Os resultados da análise de máxima parcimônia dos cinco marcadores sequenciados neste estudo e uma combinação de quatro marcadores de cloroplastos são apresentados na Tabela 2. Entre as regiões de cloroplastos, *matK* produziu agrupamentos com o maior CI não-ponderado, indicando baixa homoplasia de caracteres; e após a reponderação dos caracteres produziu agrupamentos consenso estrito com a maior CFI normalizada, indicando uma melhor resuspensão filogenética. Esse desempenho pode ser devido à amostragem, onde *matK* foi o locus com menor número de espécies de *Passiflora* representados no Genbank. Entretanto, este locus apresentou menor homoplasia em relação ao espaço intergênico *psbA-trnH*, o qual foi comparativamente representado em termos de acessos de referência incluídos nas análises .

Das regiões com maior representação das espécies de *Passiflora* no Genbank, *rbcL* e *trnL-F*, o primeiro teve o menor CI de todos os marcadores de DNA de cloroplasto assim como a menor resuspensão filogenética. Na árvore Bayesiana *rbcL*, muitas das espécies do Banco de Germoplasma da Embrapa ficaram agrupadas próximas das seqüências de referência das mesmas espécies. No entanto, muitos destes subgrupos incluíram grandes politomias, e após a análise de probabilidade, não foram significativos. A codificação *indel* da matriz *trnL-F* permitiu a adição de 80 caracteres na matriz de dados, aumentando significativamente as medições de CFI. No entanto, os caracteres adicionais não baixaram significativamente o CI, mesmo depois da reponderação dos caracteres.

**Tabela 2.** Estatísticas dos caracteres e da máxima parcimônia dos agrupamentos. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.

Locus/Regiões	Acessos incluídos	Total de caracteres alinhados	Caracteres parcimônia-informativos	Caracteres constantes	Caracteres ponderados	CFI / CFI normalizado	Comprimento da árvore	CI	RI	RC
ITS (uw)	95	828	387	324		57/0.620	2027	0.4435	0.7945	0.3524
ITS (w)					325	89/0.967	635.87	0.6316	0.8740	0.5521
<i>matK</i> (uw)	63	725	126	519		41/0.683	320	0.7906	0.9140	0.7226
<i>matK</i> (w)					45	45/0.750	231.23	0.9093	0.9634	0.8760
<i>psbA-trnH</i> (uw)	76	690	135	479		42/0.575	460	0.6348	0.8549	0.5427
<i>psbA-trnH</i> (w)					84	45/0.616	249.34	0.8133	0.7150	0.7538
<i>rbcL</i> (uw)	147	551	106	415		54/0.375	320	0.5313	0.8895	0.4726
<i>rbcL</i> (w)					64	69/0.479	145.11	0.7774	0.9521	0.7402
<i>trnLF</i> + indels (uw)	154	1362	271	795		89/0.589	1045	0.6450	0.8637	0.5571
<i>trnLF</i> + indels (w)					161	97/0.642	564.93	0.9074	0.9646	0.8753
<i>trnLF</i> (uw)	154	1179	191	790		77/0.510	682	0.7273	0.9086	0.6608
<i>trnLF</i> (w)					97	77/0.510	430.26	0.9141	0.9701	0.8868
Combined chloroplast (uw)	149	3094	540	2185		91/0.623	1829	0.6315	0.8590	0.5424
Combined chloroplast (w)					312	91/0.664	968.90	0.7503	0.9422	0.8075

Estatísticas foram geradas pela máxima parcimônia padrão seguindo uma busca heurística de agrupamentos em árvores usando o programa PAUP\* (versão 4.0b10, Swofford, 2003); (uw) = matriz não-ponderada; (w) = matriz progressivamente reponderada; CFI= Informação Componente ou Índice de agrupamentos consenso; CI = Índice de Consistência; RI = Índice de Retenção; RC = Índice de Consistência Redimensionado.

O agrupamento gerado pela análise da região ribossomal (ITS) (Figura 2) apresentou o menor índice de consistência de todas as regiões utilizadas, mas apresentou um dos maiores CFI normalizado não ponderado juntamente com o *matK* e o das regiões combinadas do cloroplasto. Após a reponderação progressiva dos caracteres, o ITS apresentou CFI maior que o das regiões individuais e combinadas do cloroplasto, mostrando maior número de agrupamentos consenso e resuspensão filogenética, entretanto em termos de consistência filogenética, manteve um baixo valor de CI. A dificuldade na obtenção de dados de seqüências de boa qualidade a partir das regiões amplificadas de ITS para muitos acessos é uma barreira para a utilização desse marcador como um DNA *barcoding* em *Passifloras*, e talvez seja por essa razão que este loco não tem sido amplamente seqüenciado e utilizado neste gênero. Supõe-se que este problema seja devido à forte estrutura secundária do DNA desta região, e nossa suspensão, de substituir o dGTP pelo seu análogo, 7- deaza dGTP, no mix de dNTP para PCR funcionou bem em nosso grupo de acessos, aumentando o sucesso e a acurácia na coleta de dados, embora não seja um procedimento padrão.

A combinação dos dados de seqüências dos diferentes locos de DNA de cloroplasto em uma única matriz concatenada melhorou o CFI normalizado em relação às seqüências únicas (exceto em relação ao *matK*), mas não aumentou a consistência dos agrupamentos (CI) em relação à maioria das regiões de DNA de cloroplasto individuais. A região individual *matK* apresentou os maiores valores de CFI e CI. Baixos valores de CFI e CI observados em alguns marcadores de DNA de cloroplasto individuais e combinados pode ser devido em grande parte à inevitável quantidade de dados perdidos incorporados à matriz por causa de diferenças na disponibilidade de seqüências de referência.

Para todas as regiões, as árvores consenso resultantes das análises filogenéticas bayesianas apresentaram, pelo menos, resuspensão adequada quando as matrizes foram progressivamente reponderadas, mantendo um bom comprimento da árvore com topologias semelhantes (dados não apresentados). As discussões das informações geradas pelas análises filogenéticas feitas a seguir serão, então, restritas aos agrupamentos bayesianos.

### 1.3.2 Análises filogenéticas aplicadas ao banco de germoplasma de *Passiflora*

As análises filogenéticas geradas com base nas seqüências ITS (Figura 1) e nas seqüências de DNA de cloroplasto combinado (*matK*, espaço intergênico *trnH-psbA*, intron *trnL* e espaço intergênico *trnL-trnF*) (Figura 2) permitiu o agrupamento dos acessos estudados em quatro grupos coincidentes com os subgêneros propostos para o gênero *Passiflora*. Subgêneros: *Passiflora* (L.), *Decaloba* (DC.) Rchb., *Astrophea* (DC.) Mast. e *Deidamioides* (Harms) Killip. Estes resultados concordam com os estudos realizados por Muschener et al. (2003) e Muschener (2005). O número de cromossomos é variável de acordo com o subgênero o qual a espécie pertence: Subgênero *Passiflora* n= 9,10 ou 11, Subgênero *Decaloba* n= 6, Subgênero *Deidamioides* n=12, Subgênero *Astrophea* n= 12 (JOHN M. MACDOUGAL e CHRISTIAN FEUILLET, 2004).

Outro resultado verificado nas análises foi a formação de dois grupos com base no tamanho das flores. Um grupo foi formado com as espécies que apresentam flores pequenas, representadas pelo subgênero *Astrophea* e *Decaloba* e o outro grupo formado com as espécies de flores grandes, representadas pelo subgênero *Passiflora* (Figura 1 e 2). Dentro do grupo dos acessos do subgênero *Passiflora*, ficaram agrupadas algumas espécies de flores pequenas (*Passiflora bahensi*, *P. malacophylla* e *P. laurifolia*), que não foram utilizadas nas análises de Muschener et al. (2003). O subgênero *Passiflora* é o que apresenta maior número de espécies e variabilidade interespecífica com relação à morfologia, tamanho e cores das flores (SOUZA e MELLETTI, 1997), sendo o que apresentou maior representatividade de espécies e subgrupos no presente trabalho.

No grupo com os acessos de *Passiflora* com flores grandes, as espécies *P. speciosa*, *P. coccinea*, *P. vitifolia*, *P. trintae*, *P. recurva*, *P. hathisbach* e *P. setacea* têm grande potencial ornamental devido às suas belas flores brancas e vermelhas. A proximidade filogenética dessas espécies evidenciada pelas seqüências de DNA de cloroplasto e ITS sugerem a possibilidade de compatibilidade genética interespecífica, possibilitando a obtenção de indivíduos com potencial ornamental devido à combinação das cores das flores, além do vigor híbrido e combinação de genes de interesse. O primeiro híbrido de maracujazeiro ornamental registrado no Brasil, BRS Estrela do Cerrado (Figura 3C), foi obtido a partir da seleção em uma população F<sub>1</sub> oriunda do cruzamento interespecífico envolvendo um acesso da espécie *P. setacea* e outro da espécie *P. coccinea* (Embrapa, 2007). Este híbrido é multiplicado por propagação vegetativa para garantir a manutenção das características das flores e a

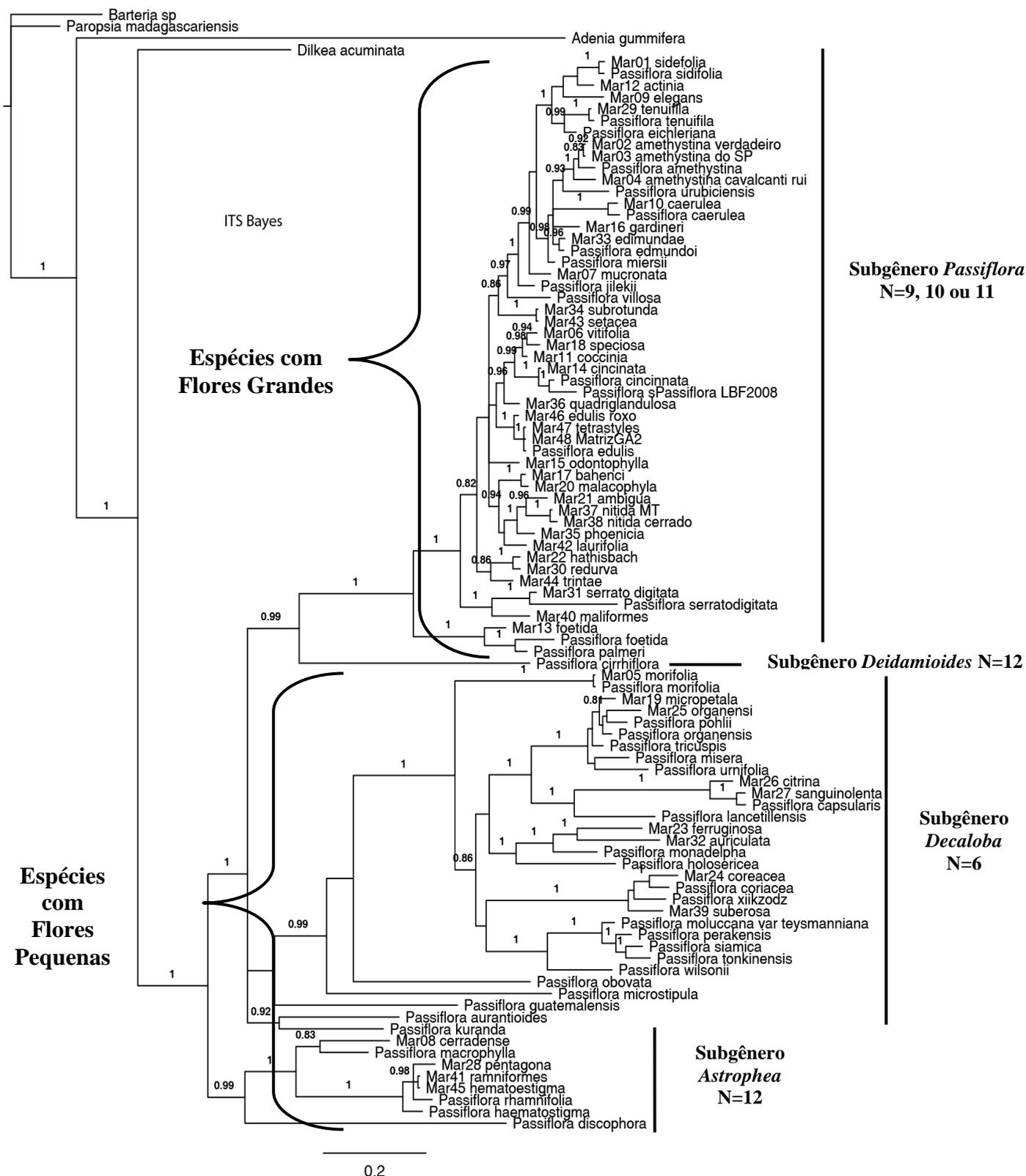
precocidade da produção, sendo recomendado para o paisagismo de grandes áreas como cercas, muros e pérgolas.

A taxonomia dos acessos das espécies de *Passiflora* muitas vezes é dificultada por causa da grande variabilidade genética interespecífica existente no Brasil, um dos centros de diversidade do gênero. Junqueira et al. (2008) estudaram a variabilidade de 17 acessos de *P. nitida* mantidos no Banco de Germoplasma da Embrapa Cerrados por meio de marcadores moleculares RAPD, verificando elevada variabilidade genética entre acessos, principalmente aqueles procedentes de diferentes Estados e fitofisionomias do Cerrado.

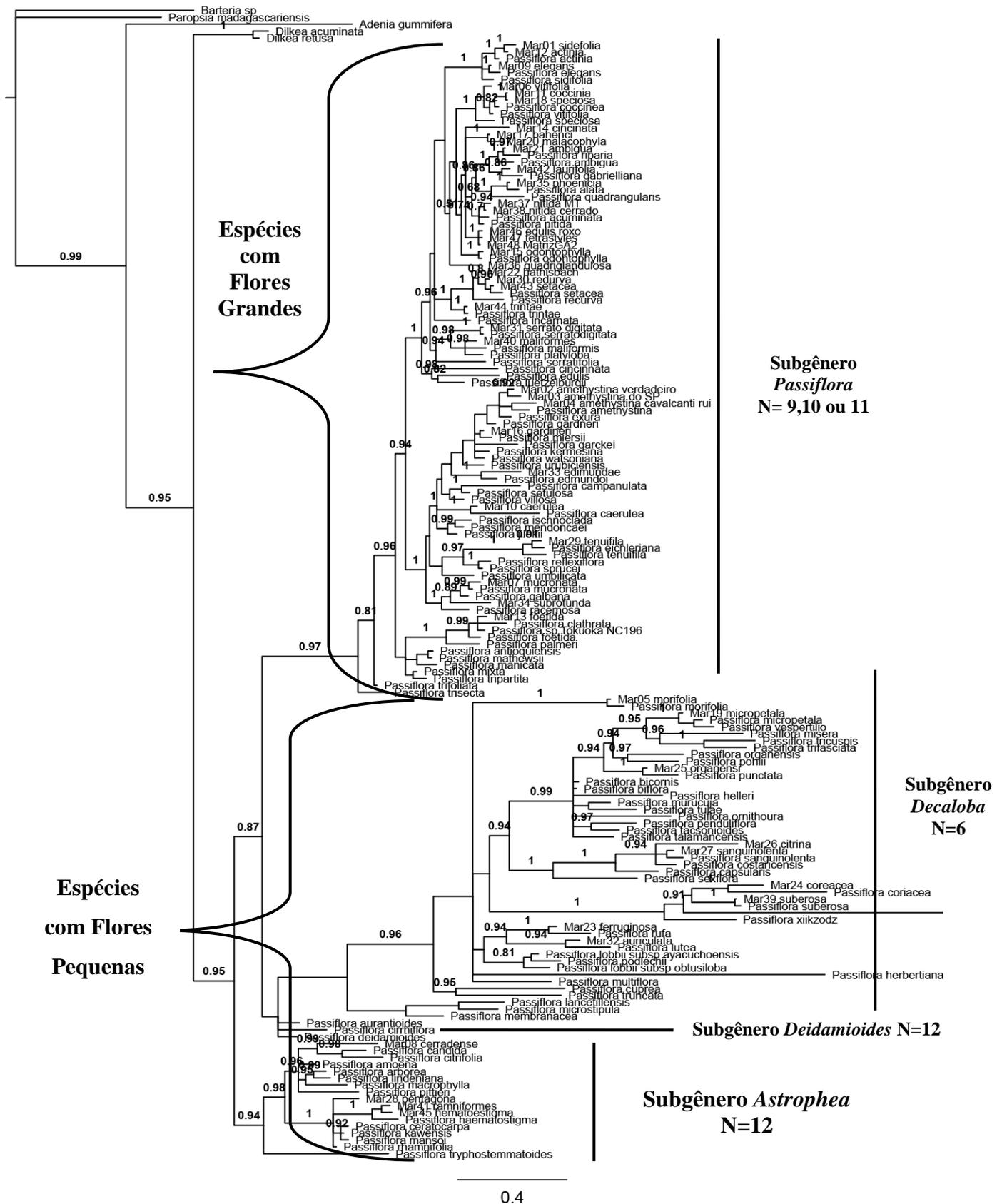
Dois acessos de *Passiflora nitida* (*P. nitida* “Cerrado” CPAC-MJ-01-07 e *P. nitida* “MT” CPAC-MJ-01-01) mantidos no Banco de Germoplasma Flor da Paixão na Embrapa Cerrados foram analisados, por suspeitas de não pertencerem à mesma espécie, baseadas nas suas características morfológicas. Entretanto, eles ficaram no mesmo agrupamento e foram claramente distinguidos de outras espécies proximamente relacionadas, como *P. ambigua*, em todos os marcadores, exceto no espaço intergênico *psbA* - *trnH*. Além disso, ambos os acessos compartilhavam a mesma sequência *rbcL* com um outro acesso de *P. nitida* incluído na análise filogenética molecular do gênero realizada por Muschner et al. (2005).

O acesso de *Passiflora phoenicia* (CPAC-MJ-53-01) (Figura 3D), utilizado nesse trabalho já foi objeto de controvérsias relacionadas à taxonomia. Inicialmente esse acesso era chamado de *Passiflora alata* “de brinco” devido à similaridade morfológica com os acessos da espécie *P. alata* (Figura 3E) e à presença de dois grandes nectários amarelos na base da folha. Estudos de variabilidade genética de acessos de *P. alata*, incluindo o acesso CPAC-MJ-53-01, realizado por Bellon et al. (2008), mostraram que esse acesso foi o mais divergente dos acessos de *Passiflora alata*. Baseado nesse resultado, o acesso CPAC-MJ-53-01 foi novamente avaliado taxonomicamente com base nas características morfológicas, sendo reclassificado como *P. phoenicia*.

No presente trabalho, o acesso CPAC-MJ-53-01, agrupou-se com *P. alata* usando os marcadores de DNA de cloroplasto (Figura 2). Existe uma hipótese que o *P. phoenicia* tenha se originado de um cruzamento natural entre *P. alata* e *P. quadrangularis* (Figura 3F). Esta hipótese pode ser testada pela inclusão de outros acessos de *P. alata* e *P. quadrangularis* e *P. phoenicia* em futuros estudos de sequências usando a região ITS de DNA nuclear ribossomal.



**Figura 1-** Árvore filogenética baseada nas sequências da região ITS, obtidas através da inferência bayesiana. Os números sobre os ramos indicam valores de boodstrap. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014



**Figura 2-** Árvore filogenética baseada nas seqüências concatenadas das regiões de cloroplasto, obtidas através da inferência bayesiana. Os números sobre os ramos indicam valores de boodstrap. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.

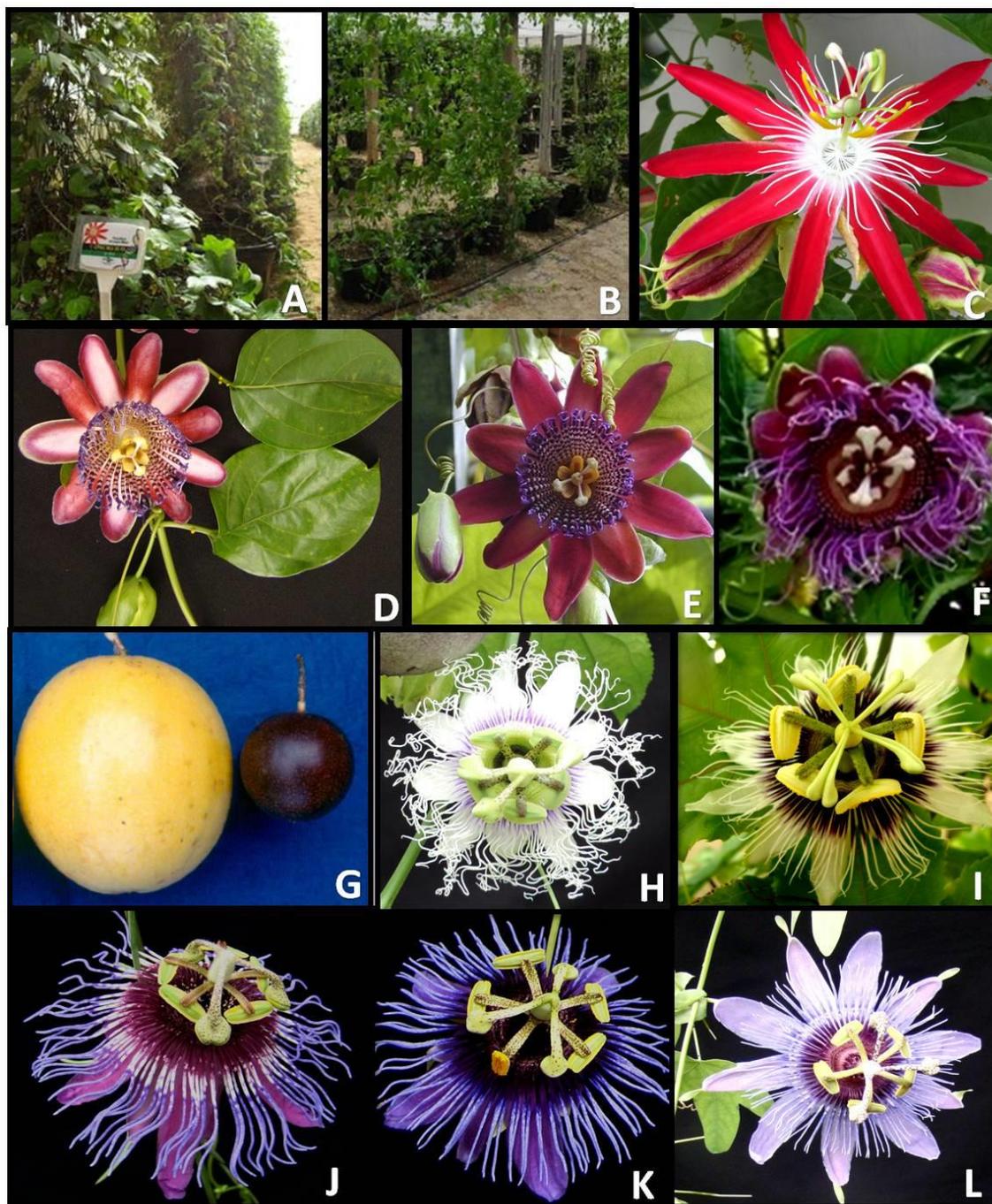
Neste contexto, outro resultado importante verificado no trabalho foi o agrupamento dessas três espécies de maracujás doce: *Passiflora alata*, *Passiflora quadrangularis* e *Passiflora phoenicia* (Figura 2) Esta proximidade filogenética das três espécies e a compatibilidade genética entre elas sugere a possibilidade de utilização de cruzamentos interespecíficos para ampliação da base genética do programa de melhoramento do maracujá-doce, levando a combinações gênicas de interesse visando o aumento da resistência a doenças, melhoria das características físicas e químicas de frutos e aumento da produtividade (FALEIRO et al., 2011).

Uma discussão antiga a respeito de acessos de maracujazeiro azedo (*P. edulis*) com relação a coloração de casca amarela e casca roxa (CPAC-MJ-M-01) e (CPAC-MJ-21-03) (Figura 3G), foram alvo de investigação nas análises utilizando as sequencias geradas pela região ITS e regiões de DNA de cloroplasto. Outra variação encontrada em acessos de *Passiflora edulis* é a presença de 4 estigmas, como o que ocorre no acesso CPAC-MJ-M-23 (Figura 3I).

Uma importante revisão sobre a taxonomia desses acessos foi realizada por Bernacci et al. (2008). Segundo esses autores, os acessos de maracujazeiro azedo devem ser citados como da espécie *Passiflora edulis* Sims, independente da cor da casca do fruto, incluindo as cultivares de maracujazeiro azedo registrados no RNC-MAPA (Registro Nacional de Cultivares do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). Na análise de agrupamento obtidas pela concatenação das sequencias de DNA de cloroplasto, verificou-se o agrupamento dos acessos *P. edulis* Sims "Amarelo" (CPAC-MJ-M-01) e *P. edulis* "roxo silvestre" (CPAC-MJ-21-03) e *P. edulis* Sims "4 estigmas"(CPAC-MJ-M-23) (Figura 2). Na análise das sequências geradas pela região ITS verificou-se diferença filogenética entre o acesso CPAC-MJ-21-03 (*P. edulis* "roxo silvestre") (Figura 3G e 3H) em relação aos outros acessos de *P. edulis*. Isso sugere futuras investigações com a inclusão de uma amostra maior de acessos de *P. edulis*, incluindo acessos de *P. edulis* forma *flavicarpa* e acessos silvestres de *P. edulis* Sims.

Grandes variações morfológicas têm sido observada em acessos classificados como *P. amethystina* (tamanho de flor, horário da abertura da flor, ovário pubescente, coloração dos filamentos, tamanho do fruto, comprimento das fimbrias, formato do estigma, presença de mucron), *P. amethystina* "SP"(Figura 3J), (*P. amethystina* "verdadeiro"(Figura 3K), e *P. amethystina* "rui"),(Figura 3L). As análises filogenéticas desses acessos com base nas sequências ITS e de DNA de cloroplasto (Figuras 2 e 3) demonstraram que *P. amethystina* "verdadeiro" e *P. amethystina* "SP" estão proximamente relacionados, enquanto *P. amethystina* "rui" apresentou certa diferença. Neste contexto, uma nova análise da taxonomia

do acesso *P. amethystina* “rui”, é requerida, considerando suas diferenças morfológicas em relação aos demais acessos da espécie.



**Figura 3.** Banco de Germoplasma de Passifloras da Embrapa Cerrados (A e B), Híbrido ornamental BRS Estrela do Cerrado (C), *P. phoenicia*, acesso CPAC-MJ-53-01 (D), *P. alata* (E), *P. quadrangulares* (F), Fruto de *P. edulis* Sims (Amarelo) acesso CPAC-MJ-M-01 e Fruto de *P. edulis* “roxo” acesso CPAC-MJ-M-23(G), Flor do acesso *P. edulis* “roxo” acesso CPAC-MJ-M-23(H), *P. edulis* Sims”4 estigmas” acesso CPAC-MJ-21-03), *P. amethystina* “SP” acesso CPAC-MJ-13-01 (J), *P. amethystina* “verdadeiro” acesso CPAC-MJ-13-00 (K), *P. amethystina* “Rui” CPAC-MJ-13-00 (L). Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014 Fotos :Nilton Tadeu Vilela Junqueira

Uma utilidade das análises filogenéticas baseadas em seqüências do DNA é facilitar a correta taxonomia dos acessos mantidos nos Bancos de germoplasma. Neste trabalho, as seqüências de 22 acessos de *Passiflora* mantidos no Banco de Germoplasma 'Flor da Paixão' na Embrapa Cerrados foram comparadas com seqüências de acessos das mesmas espécies disponíveis no Genbank. Foi verificado que 78,6% dos acessos tiveram sua taxonomia confirmada com base nas seqüências ITS e 50 % dos acessos tiveram sua taxonomia confirmada com base nas seqüências de DNA de cloroplasto. A superioridade observada da região ITS para fins de identificação está provavelmente relacionada com a maior resuspensão filogenética do marcador ao nível de espécie, como indicado pelo alto valor CFI normalizado (Tabela 2) e também pelo suporte geralmente maior da ramificação em muitos dos agrupamentos terminais, em comparação com os da árvore estabelecida com os marcadores de DNA de cloroplasto combinado. A questão do marcador ITS ter herança materna e paterna também pode ser uma explicação dessa superioridade em relação as sequencias geradas pelo DNA de cloroplasto cuja herança é apenas materna. Em um grupo restrito, apenas os acessos de *P. ambigua*, *P. coccinea* e *P. vitifolia* não tiveram sua taxonomia confirmada. Dados de seqüência de acessos dessas espécies da nossa coleção, assim como uma verificação de morfologia dos acessos seqüenciados originalmente seriam necessários para esclarecer essa diferença.

Outra ferramenta auxiliar das análises de similaridade de seqüências ITS e do DNA de cloroplasto é permitir inferências sobre a possibilidade de uso da compatibilidade interespecífica para ampliação da base genética dos programas de melhoramento do maracujazeiro azedo, doce, silvestre e ornamental (FALEIRO et al., 2011). Entre as várias espécies de passifloras, algumas apresentam características interessantes que podem ser introduzidas no maracujazeiro azedo comercial. Além da resistência a doenças e a algumas pragas, há espécies autocompatíveis.

Há espécies 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 em regiões de maior latitude no Brasil. Essa característica, se incorporada ao maracujazeiro comercial, poderá eliminar os problemas referentes à sua sazonalidade, permitindo a produção de frutos durante o ano todo na região Centro-Sul do Brasil. Outra característica importante observada em algumas espécies silvestres é a presença de androginóforo mais curto que reduz a altura dos estigmas em relação à corona, facilitando a polinização por insetos menores (FALEIRO et al., 2011).

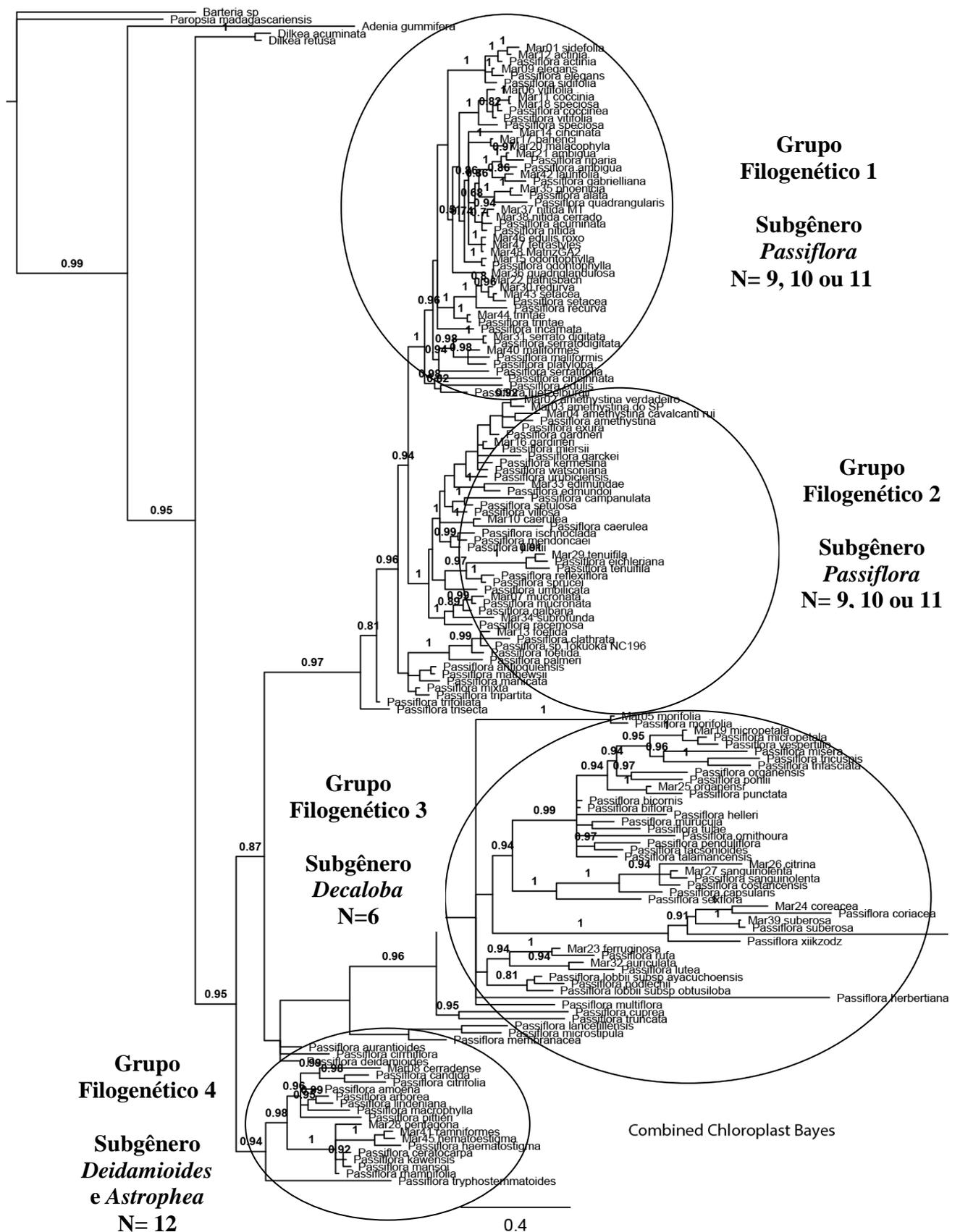
Estudos sobre a compatibilidade genética entre espécies do gênero *Passiflora*, por meio de cruzamentos artificiais, têm sido realizados na Embrapa Cerrados (SOUZA, et al., 2008, JUNQUEIRA, et al., 2005). A Tabela 3 mostra alguns dos cruzamentos interespecíficos já avaliados no programa de melhoramento do maracujazeiro na Embrapa, evidenciando aqueles onde houve compatibilidade genética e aqueles onde não foi obtido sucesso na hibridação. Analisando as espécies utilizadas nos 24 cruzamentos interespecíficos com compatibilidade genética, observa-se que as espécies utilizadas em cada cruzamento apresentaram alta similaridade genética com base nas seqüências de DNA de cloroplasto, ficando no mesmo grupo filogenético (54,2%) ou em grupos próximos (45,8%) (Tabela 3, Figura 4).

Entre os 11 cruzamentos analisados sem compatibilidade, observou-se que a maior parte das espécies utilizadas em cada cruzamento está localizada em diferentes grupos filogenéticos estabelecidos com base na análise das seqüências da região do DNA de cloroplasto (Tabela 3, Figura 4). As espécies localizadas em grupos diferentes representaram 63,6% dos cruzamentos incompatíveis, sendo que 36,4% dos cruzamentos incompatíveis incluíram espécies de braços distantes (Tabela 3). Em quatro cruzamentos envolvendo espécies localizadas no mesmo grupo filogenético (grupo1), não houve sucesso na hibridação. Fatores como a maturação do pólen, receptividade do estigma, tamanhos diferentes dos grãos de pólen, tubo polínico e ovário podem ter comprometido o sucesso das hibridações. No caso da incompatibilidade entre espécies de diferentes grupos e subgêneros, a falta de compatibilidade pode ser facilmente explicada pelas diferenças no número cromossomos destas diferentes espécies (HANSEN et al., 2006).

**Tabela 3.** Cruzamentos interespecíficos, compatibilidade genética e localização das espécies utilizadas em cada cruzamento nos grupos filogenéticos estabelecidos com base em análises de sequências combinadas de DNA de cloroplasto. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.

Cruzamento interespecífico	Compatibilidade genética	Grupo filogenético de localização da respectiva espécie	Subgêneros
<i>P. edulis</i> x <i>P. setacea</i>	Sim	1 x 1	Pass x Pass*
<i>P. galbana</i> x <i>P. alata</i>	Sim	2 x 1	Pass x Pass*
<i>P. mucronata</i> x <i>P. alata</i>	Sim	2 x 1	Pass x Pass*
<i>P. quadrangulares</i> x <i>P. alata</i>	Sim	1 x 1	Pass x Pass*
<i>P. coccinea</i> x <i>P. setacea</i>	Sim	1 x 1	Pass x Pass*
<i>P. galbana</i> x <i>P. alata</i>	Sim	2 x 1	Pass x Pass*
<i>P. galbana</i> x <i>P. actinia</i>	Sim	2 x 1	Pass x Pass*
<i>P. sanguinolenta</i> x <i>P. citrina</i>	Sim	3 x 3	Deca x Deca*
<i>P. sanguinolenta</i> x <i>P. capsulares</i>	Sim	3 x 3	Deca x Deca*
<i>P. alata</i> x <i>P. galbana</i>	Sim	1 x 2	Pass x Pass*
<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i>	Sim	1 x 1	Pass x Pass*
<i>P. edulis</i> x <i>P. caerulea</i>	Sim	1 x 2	Pass x Pass*
<i>P. setacea</i> x <i>P. alata</i>	Sim	1 x 1	Pass x Pass*
<i>P. setacea</i> x <i>P. amethystina</i>	Sim	1 x 2	Pass x Pass*
<i>P. laurifolia</i> x <i>P. nitida</i> ;	Sim	1 x 1	Pass x Pass*
<i>P. caerulea</i> x <i>P. amethystina</i> ;	Sim	2 x 2	Pass x Pass*
<i>P. coccinea</i> x <i>P. actinia</i>	Sim	1 x 1	Pass x Pass*
<i>P. sidifolia</i> x <i>P. actinia</i>	Sim	1 x 1	Pass x Pass*
<i>P. galbanax P. actinea</i>	Sim	2 x 1	Pass x Pass*
F1( <i>P. coccinea</i> x <i>P. setacea</i> )x <i>P. coccinea</i>	Sim	1 x 1	Pass x Pass*
F1 ( <i>P. coccinea</i> x <i>P. setacea</i> ) x <i>P. mucronata</i>	Sim	1 x 2	Pass x Pass*
<i>P. galbana</i> x <i>P. edulis</i>	Sim	2 x 1	Pass x Pass*
<i>P. setacea</i> x <i>P. coccinea</i>	Sim	1 x 1	Pass x Pass*
<i>P. mucronata</i> x <i>P. coccinea</i>	Sim	2 x 1	Pass x Pass*
<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i>	Não	2 x 1	Pass x Pass*
<i>P. edulis</i> x <i>P. tenuifila</i>	Não	1 x 2	Pass x Pass*
<i>P. hematoestigma</i> x <i>P. edulis</i>	Não	4 x 1	Astro x Pass*
<i>P. hematoestigma</i> x <i>P. coccinia</i>	Não	4 x 1	Astro x Pass*
<i>P. edulis</i> x <i>P. actinia</i>	Não	1 x 1	Pass x Pass*
<i>P. amethystina</i> x <i>P. edulis</i>	Não	2 x 1	Pass x Pass*
<i>P. serratodigitata</i> x <i>P. alata</i>	Não	1 x 1	Pass x Pass*
<i>P. mansoi</i> x <i>P. caerulea</i>	Não	4 x 2	Astro x Pass*
<i>P. serratodigitata</i> x <i>P. edulis</i>	Não	1 x 1	Pass x Pass*
<i>P. serratodigitata</i> x <i>P. coccinea</i>	Não	1 x 1	Pass x Pass*
<i>P. mansoi</i> x <i>P. edulis</i>	Não	4 x 1	Astro x Pass*

\*Pass(Subgênero Passiflora), \*Deca(Subgênero Decaloba), \*Astro (Subgênero Astrophea)



**Figura 4-** Arvore filogenética baseada nas sequências concatenadas das regiões de cloroplasto dividida em quatro grupos filogenéticos, utilizada no estudo da compatibilidade genética das espécies envolvidas nos cruzamentos interespecíficos Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.

## 1.4 CONCLUSÕES

A análise filogenética das sequências ITS do DNA nuclear ribossomal e das sequências de DNA de cloroplasto das principais espécies representativas do banco de germoplasma 'Flor da Paixão' da Embrapa Cerrados, com a inclusão de sequências pré-existentes disponíveis na base de dados de nucleotídeos do Genbank, forneceu informações importantes para a curadoria da coleção. As sequências geradas neste estudo, em particular, as mais informativas, mas atualmente pouco representadas neste gênero, a região ITS, irá contribuir para futuros trabalhos filogenéticos, evolutivos e taxonômicos em *Passiflora*. Além disso, espera-se que os dados obtidos irão suportar e facilitar futuras ações dos programas de melhoramento do maracujá.

## 1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDWIN, B. G., M.J. SANDERSON, J.M. PORTER, M.F. WOJCIECHOWSKI, C.S. CAMPBELL, E M.J. DONOGHUE. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 82, p. 247-277, 1995.

BELLON, G;FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA,N.T.V; LIMA,C.A;ALMEIDA, B.C.,VILLELA, J.G.A. ; FUHRMANN, E. ; SANTOS, J. B . Uso de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar na taxonomia de acessos do gênero Passiflora.. In: XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2010, Natal, RN. **XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura, Frutas: saúde, inovação e sustentabilidade**, 2010.

BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; PASSOS, I. R. S. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 559-586.

BERNACCI, L.C ., SOARES-SCOTT, M. D, JUNQUEIRA, N.T. V.,PASSOS, I.R.da S., MELETTI, L.M .M. Passiflora edulis Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal**, v.30, n. 2, June 2008 , P. 566-576.

CARPENTER, J.M., 1994.Successive weighting, reliability and evidence. **Cladistics** 10, 215-220.

CBOL Plant **Working Group** (2009) A DNA barcode for land plants. *PNAS* 106: 12794-12797

CERVI A.C (1997) PASSIFLORACEAE DO BRASIL. ESTUDO DO GÊNERO PASSIFLORA L., SUBGÊNERO Passiflora. **Fontqueria** 45: 1-92.

CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; BERNACCI, L.C. Passifloraceae. In Forzza, R.F. et al. (eds.) **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. v. 2, p.1432-1436, 2010.

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

DARRIBA D, TABOADA GL, DOALLO R, POSADA D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods** 9: 772.

DIERICK H, STUL M, De Kever W, MARYNEN P, CASSIMAN JJ. (1993) Incorporation of dITP or 7-deaza dGTP during PCR improves sequencing of the product. **Nucleic Acids Res.** 21: 4427-4428.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**. v. 19, p. 11-15, 1987.

- DUNNING, L.T. and SAVOLAINEN, V. (2010) Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding plants, a technical note. **Bot. J. Lin. Soc.** 164: 1-9.
- EMBRAPA CERRADOS (2007) Memória do Lançamento dos Híbridos de Maracujazeiro Ornamental Disponível em <http://www.cpac.embrapa.br/lancamentoorneamental/> Acesso em: 25 maio 2013.
- FALEIRO, F. G. . Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. In: Fábio Gelape Faleiro; Solange Rocha Monteiro de Andrade; Fábio Bueno Reis Júnior. (Org.). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011, v., p. 55-118.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J.R. Caracterização de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares: resultados de pesquisa 2005-2008. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. 59 p. (**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, No 207).
- FALEIRO, F.; **Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos** . Planaltina –DF, Embrapa Cerrados , 102 p, 2007.
- FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. Passion fruit (*Passiflora* spp.) improvement using wild species. In: MARIANTE, A.S.; SAMPAIO, M.J.A.; INGLIS, M.C.V. The state of Brazil's plant genetic resources. Second National Report. **Conservation and Sustainable Utilization for food and agriculture**. Embrapa Technological Information: Brasília, DF. 2009. pág 101-106.
- FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – desafios da pesquisa In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 187-210.
- GUINDON, S and GASCUEL, O (2003) A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". **Systematic Biology** 52: 696-704.
- HALL, T.A. (1999) Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. **Nucleic Acids Symposium Series** 41: 95-98.
- HANSEN , A.K., ESCOBAR , L.K., GILBERT , L.E. e JANSEN , R.K. 2006. Paternal, maternal, and biparental inheritance of the chloroplast genome in *Passiflora* (Passifloraceae): implications for phylogenetic studies. **American Journal of Botany**, 94: 42-46.
- HOLLINGSWORTH PM, GRAHAM SW, LITTLE DP (2011) **Choosing and Using a Plant DNA Barcode**. PLoS ONE 6: e19254
- HUELSENBECK, J. P. MrBayes: **A program for the Bayesian inference of phylogeny**. Department of Biology, University of Rochester, Nova York, 2004.
- JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BELLON, G.; RAMOS, J. D.; BRAGA, M. F.; SOUZA, L. S. Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *passiflora* por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2008. vol.30, n.1, Jaboticabal- SP.

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.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81-106.

KATO K, STANDLEY D.M., 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Mol. Biol. Evol.** 30, 772-780.

KRESS, W.J, ERICKSON, D.L (2007) A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. **PLoS ONE** 2: e508.

LORENZ -LEMKE , A.P.; MUSCHNER , V.C.; BONATTO , S.L.; CERVI, A.C.; Salzano , F.M. e Freitas , L.B. 2005. Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nr DNA) variation. **Annals of Botany**, 95: 799–806.

MACDOUGAL, J.M. AND C. FEUILLET. 2004. 2. Systematics. In: T. Ulmer and J.M. MacDougal, eds. *Passiflora, Passionflowers of the world*. Timber Press, Portland. Pp. 27–31.

MÖLLER, M. and CRONK, Q.C.B. (1997). Origin and relationships of *Saintpaulia* (Gesneriaceae) based on ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences. **American Journal of Botany** 84: 956-965.

MUSCHNER , V.C.(2005). Filogenia molecular, taxas evolutivas, tempo de divergência e herança organelar em *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Tese de Doutorado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 162 p.

PÁDUA, J.G. Análises genéticas de espécies do gênero *Passiflora* L. com base em abordagens filogenéticas, morfométricas e em marcadores microssatélites. ESALQ/USP, Piracicaba 112p. 2004. (Tese de Doutorado).

PEIXOTO, M., Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 457-463.

RONQUIST, F. e HUELSENBECK, J. P. *MrBayes*: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754-755, 2003.

SANG, T.; CRAWFORD, D. J.; STUESSY, T. F. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). **American Journal of Botany**, v. 84, p. 1120–1136, 1997.

SIMMONS, M.P., OCHOTERENA, H., 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. **Syst. Biol.** 49,369-381.

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

SOUZA, L S ; JUNQUEIRA, Nilton Tadeu Vilela ; LIMA, Adelise de Almeida ; LIMA, C A ; SILVA, D G P ; FALEIRO, F. G. ; CAMPOS NETO, F.C. ; BERNACCI, Luis Carlos .  
Determinação da compatibilidade genética entre espécies de passifloras visando a obtenção de híbridos resistentes a doenças. In: IX Simpósio Nacional sobre o Cerrado e II Simpósio Internacional sobre Savanas Tropicais, 2008, Brasília.

SHAW, J.; LICKY E. B.; BECK J. T.; FARMER, S. B.; LIU, W.; MILLER, J.; SIRIPUN, K. C. The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast dna 85 sequences for phylogenetic analysis. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 1, p. 142– 166, 2005.

SWOFFORD, D.L., 2003. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

TABERLET, P., GIELLY, L., PAUTOU, G., AND BOUVET, J. (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant. Mol. Biol.** 17: 1105-1109.

TATE, J.A.; SIMPSON, B. B.; Paraphyly of Tarasa (Malvaceae) and diverse origins of the polyploidy species. **Systematic Botany**, v. 28, p. 723–737, 2003.

VAIDYA, G., LOHMAN, D. J. AND MEIER, R. (2011), SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. **Cladistics**, 27: 171–180.

WHITE, T. J., T. BURNS, S. Lee, and J. TAYLOR. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky e T. White (eds.) **PCR protocols: a guide to methods and applications** pp. 315-322. San Diego, California: Academic Press.

ZAMBERLAN , P.M. 2007. Filogenia de Passiflora L. (Passifloraceae): questões infra-subgenéricas. **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 105 p.

## **CAPÍTULO 2**

### **VARIABILIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS ELITE DE MARACUZEIRO OBTIDOS EM PROGRAMAS DE RETROCRUZAMENTO ENVOLVENDO ESPÉCIES SILVESTRES E COMERCIAIS DE MARACUZEIRO COM BASE EM MARCADORES RAPD**

### **GENETIC VARIABILITY OF ELITE PASSIONFRUIT GENOTYPES FROM BACKCROSS BREEDING PROGRAM INVOLVING WILD AND COMMERCIAL SPECIES BASED ON RAPD MARKERS**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS ELITE DE MARACUJAZEIRO  
OBTIDOS EM PROGRAMAS DE RETROCRUZAMENTO ENVOLVENDO  
ESPÉCIES SILVESTRES E COMERCIAIS DE MARACUJAZEIRO COM BASE EM  
MARCADORES RAPD**

**RESUMO**

O maracujazeiro azedo, *Passiflora edulis*, possui baixa variabilidade genética para resistência a doenças, uma alternativa para aumentar a variabilidade é a utilização de espécies silvestres na base de cruzamentos do melhoramento genético de *passifloras*. Neste trabalho objetivou-se analisar a variabilidade genética de genótipos elite de maracujazeiro obtidos em programas de retrocruzamento envolvendo espécies silvestres e comerciais com base em marcadores moleculares RAPD. Foram analisados 32 genótipos de *Passiflora*. O DNA genômico de cada material foi extraído e nove iniciadores decâmeros foram utilizados para a obtenção dos marcadores moleculares via Reação em Cadeia da Polimerase. Foram realizadas análises de agrupamento via dendrograma e gráfico de dispersão. Foram obtidos 177 marcadores, dos quais 95% foram polimórficos. As distâncias genéticas entre os 32 genótipos variaram entre 0,035 e 0,562. Análises de agrupamento mostraram que os genótipos elite se agruparam com a espécie comercial utilizada como genitor recorrente. Os marcadores evidenciaram variabilidade genética entre os genótipos estudados e confirmaram a eficiência da recuperação do genoma recorrente dentro do programa de retrocruzamentos.

**Palavras chave:** *Passiflora*, Melhoramento Genético, Marcadores moleculares

# GENETIC VARIABILITY OF ELITE PASSIONFRUIT GENOTYPES FROM BACKCROSS BREEDING PROGRAM INVOLVING WILD AND COMMERCIAL SPECIES BASED ON RAPD MARKERS

## ABSTRACT

The passion fruit, *Passiflora edulis*, has low genetic variability for disease resistance. An alternative for increase the variability have been the use of wild species in crosses with elite cultivars in genetic breeding programs. The objective of this work was to analyze the genetic variability of elite genotypes of passion fruit obtained in backcross programs involving wild and commercial species based on RAPD markers. We analyzed 32 genotypes of *Passiflora*. Genomic DNA was extracted from each material and nine decamer primers were used to obtain the molecular markers via the Polymerase Chain Reaction. Analyses of clustering dendrogram and scatter plot were performed. We obtained 177 markers, of which 95% were polymorphic. The genetic distances between the 32 genotypes ranged between 0.035 and 0.562. Cluster analysis showed that the elite genotypes were grouped with the commercial cultivars used as recurrent parent. The markers showed genetic variability among genotypes and confirmed the efficiency of recurrent genome recovery within the backcrossing program.

**Keywords:** *Passiflora*, genetic improvement, molecular markers

## 2.1 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 130 espécies de *Passiflora* sejam nativas do Brasil, apresentando ampla variabilidade genética, que é o ponto de partida para qualquer programa de melhoramento genético de uma espécie. A base genética do maracujazeiro-azedo comercial para resistência a doenças é relativamente estreita, sendo uma alternativa a utilização de espécies silvestres para aumentar o grau de resistência das cultivares comerciais a doenças.

Estudos preliminares têm mostrado que existe pouca variabilidade genética entre as cultivares comerciais para a resistência a doenças (JUNQUEIRA et al., 2003). Para ampliar essa base genética, espécies silvestres de maracujá têm sido utilizadas com sucesso em programas de melhoramento genético, principalmente utilizando o método dos retrocruzamentos auxiliado por marcadores moleculares (FALEIRO et al., 2008; FALEIRO e JUNQUEIRA, 2009).

Marcadores moleculares do DNA têm sido utilizados como uma ferramenta auxiliar nas diferentes etapas do melhoramento genético, desde a caracterização do germoplasma até as etapas finais de seleção de plantas melhoradas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; FALEIRO, 2007). Por se tratar de uma espécie semiperene, o estudo de diversidade genética e confirmação de hibridações interespecíficas com base em características morfo-agronômicas em *Passiflora* demanda tempo. Nesse caso, o uso de marcadores moleculares é altamente viável, por permitir um rápido estudo da variabilidade presente (PEREIRA et al., 2005; VIEIRA et al., 2005) e segura detecção de hibridações interespecíficas (FALEIRO et al., 2003).

Neste trabalho, objetivou-se analisar e quantificar a variabilidade genética de genótipos elite de maracujazeiro obtidos em programas de retrocruzamento envolvendo espécies silvestres e comerciais de maracujazeiro com base em marcadores RAPD para acompanhamento da recuperação do genoma recorrente e quantificação da redução da variabilidade genética devido aos retrocruzamentos.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados, Planaltina- DF. Os genótipos utilizados neste trabalho foram obtidos a partir do programa de melhoramento genético do maracujazeiro realizado pela Embrapa Cerrados visando obter variedades de maracujazeiro mais produtivas, com maior resistência a doenças e melhor qualidade físico-química dos frutos. Para o estudo da variabilidade genética, foram analisados 32 genótipos (matrizes) selecionados, sendo 25 de cruzamentos inter-específicos e 4 de cruzamentos intra-específicos e 3 espécies silvestres (*Passiflora edulis* Sims (acesso silvestre roxo), *Passiflora setacea* e *Passiflora caerulea*), utilizadas como progenitores na base dos cruzamentos (Tabela 1).

A partir de seis progênies obtidas de diferentes gerações de retrocruzamentos entre o maracujazeiro comercial (*P. edulis*) com espécies silvestres *P. caerulea*, *P. edulis* “roxo silvestre” e *P. setacea* foram obtidas 315 plantas resultantes do processo de retrocruzamento. Destas, 29 plantas (genótipos) foram selecionadas de acordo com o desempenho agrônomico e avaliações realizadas por FUHRMANN (2011). Essa seleção foi baseada na resistência à bacteriose, produtividade, maior tamanho de frutos, coloração de polpa mais intensa (avermelhada) e maior teor de sólidos solúveis.

**Tabela 1-** Genótipos de maracujazeiros resultantes do processo de retrocruzamento e espécies silvestres utilizadas no estudo de variabilidade genética e suas respectivas origens. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.

Ordem PCR	Genótipos (Matrizes)	Origem dos genótipos (Matrizes)
1	<i>P. edulis</i> silvestre roxo	-
2	<i>P. setacea</i>	-
3	<i>P. caerulea</i>	-
4	EC4 - 121	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
5	EC4 - 124	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
6	EC4 - 128	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
7	ES4 - 138	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
8	EC5 - 153	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)
9	ERE - 171	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "roxo" silvestre
10	BRS Gigante Amarelo - 211	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "flavicarpa"
11	EC4 - 223	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
12	ES4 - 238	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
13	ES4 - 239	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
14	EC5 - 255	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)
15	EC5 - 257	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)
16	ES6 - 265	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "flavicarpa"
17	ERE - 272	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "roxo" silvestre
18	BRS Gigante Amarelo - 315	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "flavicarpa"
19	EC4 - 325	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
20	ES4 - 331	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
21	EC5 - 356	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)
22	ERE - 371	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "roxo" silvestre
23	ERE - 378	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "roxo" silvestre
24	ES4 - 433	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
25	EC5 - 455	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)
26	EC5 - 456	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)
27	EC5 - 458	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)
28	ES6 - 468	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC6)
29	ERE - 476	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "roxo" silvestre
30	BRS Gigante Amarelo - 512	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "flavicarpa"
31	BRS Gigante Amarelo - 519	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "flavicarpa"
32	ES5 - 546	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)

### 2.2.1 Extração de DNA e amplificação via PCR

Folhas em estágio intermediário de maturação foram coletadas e o DNA genômico de cada genótipo foi extraído utilizando o método do CTAB, com modificações (FALEIRO et al., 2003). Amostras de DNA de cada acesso foram amplificadas para a obtenção de marcadores RAPD. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 µL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 100 µM de cada um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM de um "primer" (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Para obtenção dos marcadores RAPD foram utilizados 09 primers decâmeros: OPD (07, 10 e 16), OPF (01, 14), OPG (01 e 08), OPH (12 e 16). 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, foram adicionados, a cada amostra, 3 µl 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 foram estimadas as distâncias genéticas entre os diferentes acessos, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, utilizando-se o Programa Genes (CRUZ, 2004). A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar a análise de agrupamento, por meio de dendrograma com o auxílio do Programa Statistica (Statsoft Inc., 1999), utilizando o método do UPGMA 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 (Stat Soft Inc,1999).

### **2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os nove *primers* decâmeros geraram um total de 177 marcadores RAPD, perfazendo uma média de 19,6 marcadores por *primer*. Do total de marcadores, 95% foram polimórficos, (Tabela 2). A alta porcentagem de marcadores polimórficos evidenciam alta variabilidade genética interespecífica. Faleiro et al. (2004) , Pio Viana et al. (2003), Junqueira et al. (2006), Bellon et al. (2007) entre outros, já haviam relatado a alta variabilidade genética interespecífica no gênero *Passiflora* com base em marcadores RAPD.

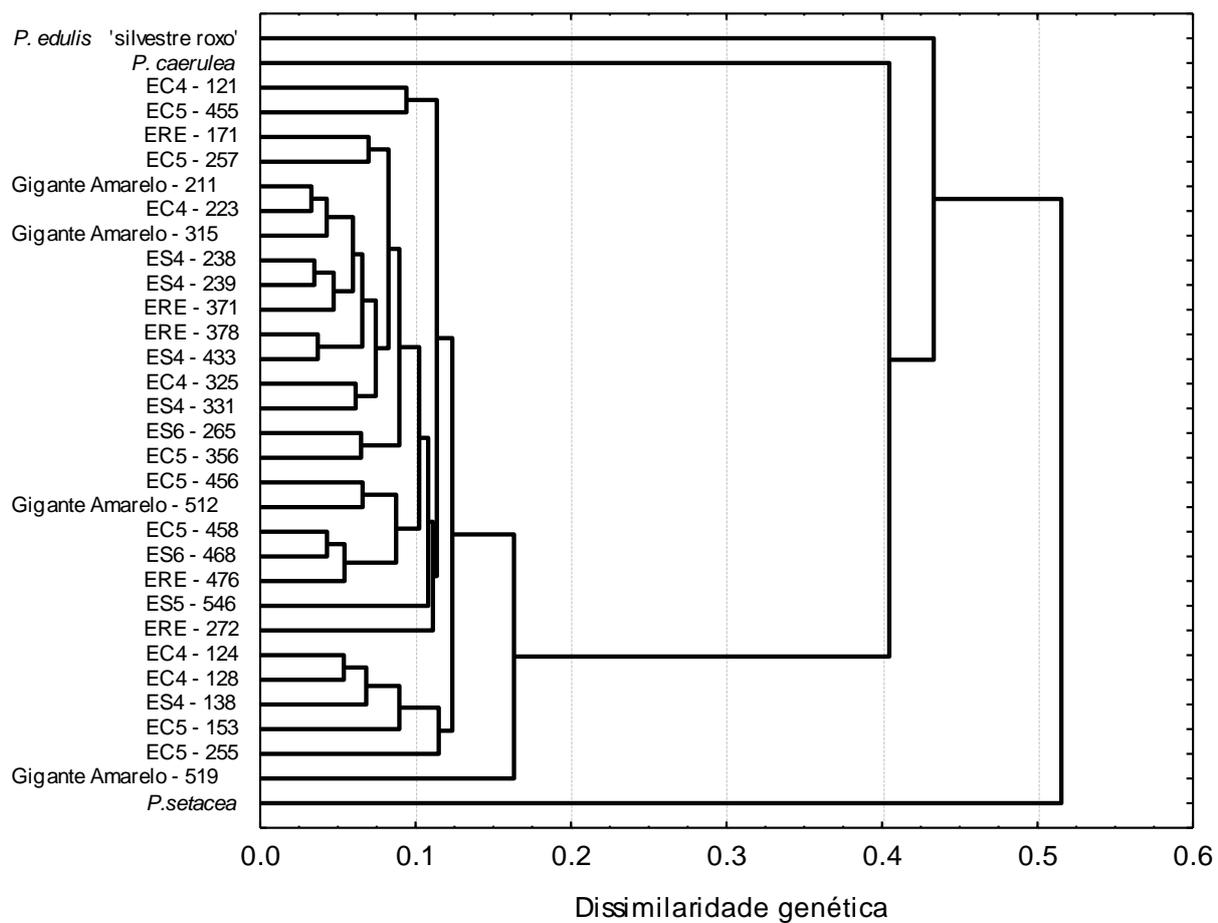
As distâncias genéticas entre os 32 genótipos de *Passiflora* variaram entre 0,035 e 0,562 (Tabela 3). A menor distância, de 0,035, foi observada entre os genótipos 238 (*P. caerulea* x *P. edulis*- RC4) e 239 (*P.caerulea* x *P. edulis*- RC4) e a maior distância, de 0,562, observada entre os genótipos *P.edulis* “silvestre roxo” e *P.setacea* (0,562). A proximidade genética entre os genótipos 238 e 239 já era esperada, considerando que se tratam de genótipos obtidos a partir do mesmo cruzamento base, estando na mesma geração de retrocruzamento. A maior distância obtida entre *P. edulis* “silvestre roxo” e *P. setacea* também é compreensível, por se tratarem de espécies diferentes.

**Tabela 2-** *Primers* utilizados para obtenção dos marcadores RAPD para acessos de *Passiflora alata* e respectivos número de bandas polimórficas e monomórficas. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.

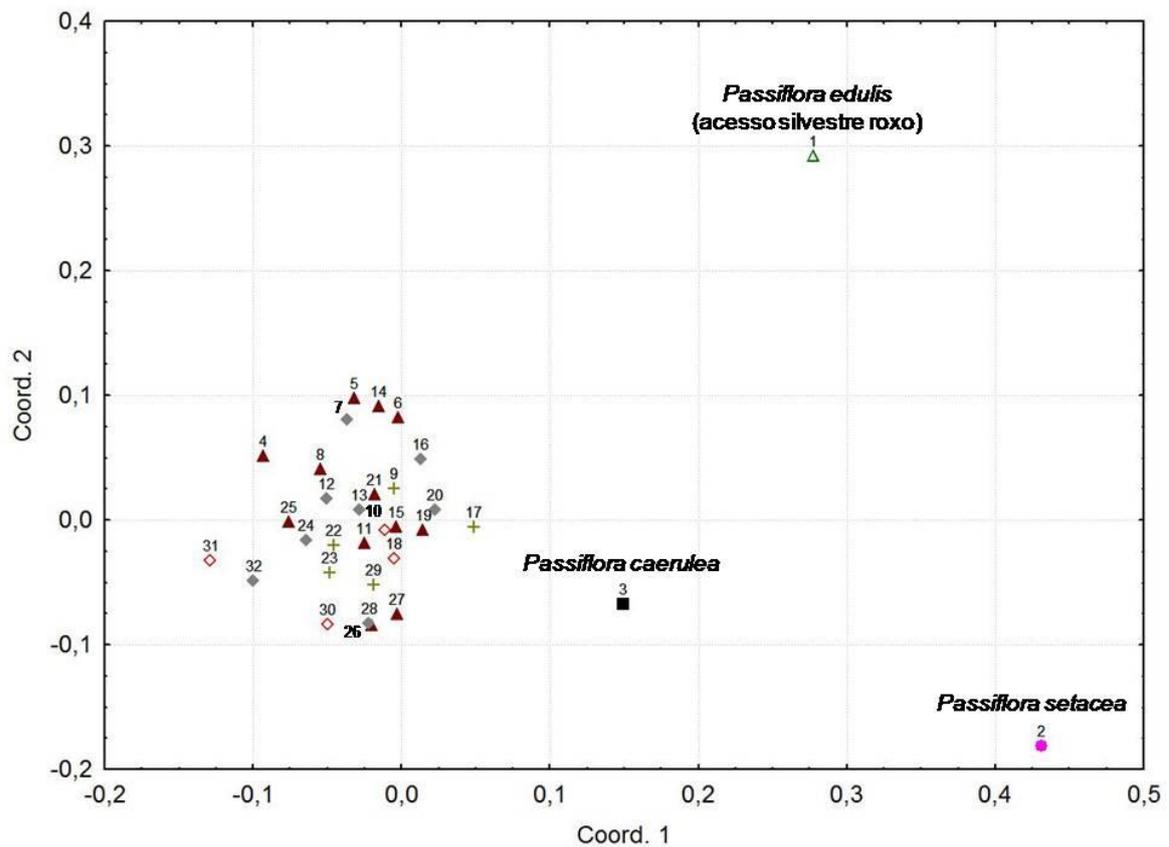
<b>Primer</b>	<b>Seqüência 5'→3'</b>	<b>Nº de bandas polimórficas</b>	<b>Nº de bandas monomórficas</b>
OPD-07	TTGGCACGGG	13	0
OPD-10	GGTCTACACC	32	0
OPD-16	AGGGCGTAAG	21	1
OPF-01	ACGGATCCTG	17	4
OPF-14	TGCTGCAGGT	14	0
OPG-01	CTACGGAGGA	12	1
OPG-08	TCACGTCCAC	21	2
OPH-12	ACGCGCATGT	13	1
OPH-16	TCTCAGCTGG	25	0
<b>TOTAL</b>		<b>168</b>	<b>09</b>

A análise de agrupamento e a dispersão gráfica (Figuras 1 e 2) realizadas com base na matriz de distâncias genéticas demonstra a separação das espécies silvestres (*P.edulis* “silvestre roxo”, *P.setacea* e *P. caerulea*), que se localizam em pontos extremos do gráfico. Verifica-se a formação de um grande grupo contendo os híbridos inter-específicos, juntamente com os híbridos intra-específicos envolvendo a espécie comercial *Passiflora edulis* “flavicarpa” utilizada como genitor recorrente. Este agrupamento demonstra o êxito no processo de recuperação do genoma recorrente pelo programa de retrocruzamentos (Figura 1 e 2). FONSECA et al. (2009) também verificaram a eficiência de marcadores moleculares RAPD para analisar e quantificar a recuperação do genoma recorrente em programa de retrocruzamentos visando ao melhoramento genético do maracujazeiro.





**Figura 1.** Análise de agrupamento de 32 genótipos de maracujazeiro com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 177 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.



**Figura 2-** Dispersão gráfica de 32 genótipos de maracujazeiro com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 177 marcadores RAPD. Os números correspondem aos acessos da Tabela 1. Números representados pelas formas:  $\diamond$  (Genótipos de *Passiflora edulis* Sims cultivar 'BRS Gigante Amarelo' utilizado como genitor recorrente)  $\blacktriangle$  (Genótipos de retrocruzamentos originados de *Passiflora edulis* x *Passiflora setacea*),  $\blacklozenge$  (Genótipos de retrocruzamentos originados de *Passiflora edulis* x *Passiflora caerulea*),  $+$  (Genótipos de retrocruzamentos originados *Passiflora edulis* flavicarpa x *Passiflora edulis* "roxo silvestre). Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.

## 2.4 CONCLUSÕES

Existe variabilidade genética entre os genótipos obtidos por cruzamentos interespecíficos, sendo que tais genótipos foram agrupados juntamente com genótipos da espécie comercial *Passiflora edulis*.

Foi confirmada a eficiência da recuperação do genoma recorrente (*P. edulis*), dentro do programa de retrocruzamentos com base em marcadores RAPD.

## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELLON, G.; FALEIRO, FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUIRA, N. T. V.; SANTOS, E. C.dos.; BRAGA, M. F.; GUIMARÃES, C. T. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *passiflora edulis* Sims., com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2007, vol.29, n. 1, ISSN 0100-2945.

BRUCKNER, C.H. **Perspectivas do melhoramento genético do maracujazeiro**. Maracujá: temas selecionados. Porto Alegre: Cinco Continentes Editora, 1997. pp. 25-46.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2004. 480p

FALEIRO, F.; Marcadores **moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina –DF, Embrapa Cerrados, 102 p, 2007.

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 N°92**) 6p.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BELLON, G.; BORGES, T.A.; ANJOS, J.R.N.; PEIXOTO, J.R.; BRAGA, M.F.; SANTOS, D.G. Diversidade genética de espécies silvestres de maracujazeiro com resistência a múltiplas doenças com base em marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, (Supl), p. S325, 2004.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J.R. Caracterização de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares: resultados de pesquisa 2005-2008. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. 59 p. (**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, N° 207).

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. Passion fruit (*Passiflora* spp.) improvement using wild species. In: MARIANTE, A.S.; SAMPAIO, M.J.A.; INGLIS, M.C.V. The state of Brazil's plant genetic resources. Second National Report. Conservation and Sustainable Utilization for food and agriculture. Embrapa **Technological Information**: Brasília, DF. 2009. pág 101-106.

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

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

FURMANN, E. Reação de híbridos interespecíficos de maracujazeiro à bacteriose e características físico-químicas de frutos. Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2011; 95 p. (**Dissertação de Mestrado em Agronomia**).

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

JUNQUEIRA, K. P.; Faleiro, F. G.; RAMOS, J. D.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Confirmação de hibridações interespecíficas no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. In: **XIX Congresso Brasileiro de Fruticultura**, 2006, Cabo Frio, RJ. p.384.

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**, Brasília, v.38, n.8, p. 1005-1010, 2003.

PEREIRA, M.G.; PEREIRA, T.N.S.; PIO VIANA, A. Marcadores moleculares aplicados ao melhoramento do maracujazeiro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds). **Maracujá- germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina Distrito Federal: Embrapa Cerrados, 2005. p.277-292

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.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user`s guide**. Version 6, 4<sup>th</sup>. Ed. Cary, North Caroline, 1989. 846 p.

STATSOFT INC. **Statistica for Windows** [Computer program manual] Tulsa, OK. StatSoft Inc. 2300 Ecast 14<sup>th</sup> Street, Tulsa. 1999.

VIEIRA, M.L.C.; OLIVEIRA, E.J.; MATTA, F.P.; PÁDUA, J.G.; MONTEIRO, M. Métodos biotecnológicos aplicados ao melhoramento genético do maracujá. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 411-453.

## **CAPÍTULO 3**

**AVALIAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA E DE  
METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO ARTIFICIAL DE *Colletotrichum*  
*gloeosporioides* EM MARACUJAZEIRO AZEDO**

**EVALUATION AND OPTIMIZATION OF CULTURE MEDIA AND  
METHODS OF ARTIFICIAL INOCULATION OF *Colletotrichum*  
*Gloeosporioides*. IN PASSIONFRUIT**

**AVALIAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA E DE  
METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO ARTIFICIAL DE *COLLETOTRICHUM*  
*GLOESPORIOIDES* EM MARACUJAZEIRO AZEDO**

**RESUMO**

O trabalho teve como objetivo avaliar meios de cultura e métodos de inoculação de *C. gloesporioides* em maracujazeiro azedo. Foram avaliados quatro meios de cultura. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 4 repetições sendo cada repetição constituída pela média de 3 placas. Foram avaliados, o diâmetro médio de cada colônia e quantidade de conídios produzidos por placa. Foram avaliadas três metodologias de inoculação baseadas em ferimentos com furador de couro adaptado e agulhas e em atomização de suspensão de conídios. Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados com quatro repetições e 6 plantas por parcela. Foram realizadas avaliações das áreas lesionadas das plantas em cada metodologia de inoculação. Análises descritivas foram realizadas, determinando-se, o valor médio, máximo e mínimo, coeficiente de variação, variância e desvio padrão. Para ambos os experimentos utilizou-se o isolado CEN-419 de *Colletotrichum gloesporioides*. O meio de aveia (farinha de aveia Quaker© 6% + ágar 1,2% em água) apresentou a melhor condição para a produção de conídios de *C. gloesporioides* e o método de inoculação que proporcionou maior desenvolvimento de sintomas e maior precisão na avaliação da antracnose em mudas de maracujazeiro foi o ferimento por agulhas no caule.

**Palavra chave:** Antracnose, *Passiflora*, taxa de esporulação, inoculação artificial, meios de cultura

**EVALUATION AND OPTIMIZATION OF CULTURE MEDIA AND METHODS OF  
ARTIFICIAL INOCULATION OF *Colletotrichum Gloeosporioides*. IN  
PASSIONFRUIT**

**ABSTRACT**

The objective of this work was to evaluate culture media and inoculations methods of *C. gloeosporioides* in passionfruit plants. Four culture media were evaluated. A completely randomized design with 4 treatments and 4 replications of 3 plates were performed. The colony diameter and conidia yield per plate were evaluated. Three inoculation methodologies based on injuries by adapted leather puncher and needles and leaves atomization with conidia suspension were evaluated. A randomized block design with 4 repetitions of 6 plants were performed. For each treatment, the necrotic area in the plants were evaluated. Descriptive analyzes about average, maximum and minimum value, coefficient of variation, variance and standard deviation were calculated. In both experiments, the *C. gloeosporioides* isolate CEN-419 was used. The culture media Quaker© oatmeal 6 % + Agar 1.2% in water showed the best condition for the *C. gloeosporioides* conidia production. The inoculation method based on injuries in the stem by needles provided the highest symptoms development and greater precision analysis.

**Keywords:** Anthracnose, *Passiflora*, sporulation rate, artificial inoculation, culture medium

### 3.1 INTRODUÇÃO

Fungos do gênero *Colletotrichum* são importantes agentes fitopatogênicos que causam antracnose em diversas culturas, sendo que *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz e Sacc. é o agente causador da antracnose do maracujazeiro, uma das mais importantes doenças desta cultura no Brasil. A antracnose, é considerada a doença mais freqüente que incide na parte aérea da planta do maracujazeiro (YAMASHIRO, 1987), afetando todos os órgãos da planta, tais como folhas, ramos, inflorescências e frutos em qualquer estágio de desenvolvimento (ALMEIDA, 2005).

Trabalhos têm sido realizados visando o desenvolvimento de alternativas de controle da antracnose baseados na resistência genética. A dificuldade em conseguir isolados esporulantes e em padronizar condições ideais para a esporulação de fungos fitopatogênicos é um dos principais problemas enfrentados por grupos de pesquisa que visam à identificação de fontes de resistência mediante a inoculação artificial do fitopatógeno (CRUZ et al., 2009). O cultivo *in vitro* destes fungos é de grande importância para a utilização em trabalhos que exijam inóculo puro e em quantidade pré-determinada. Estudos de variabilidade patogênica e de identificação de fontes de resistência genética ao patógeno requerem metodologias eficientes de produção de esporos em culturas puras e metodologia acuradas, precisas e reprodutíveis de inoculação artificial (LARANJEIRA, 2005).

Há pouca informação relacionada à influência dos meios de cultura na produção de esporos de *C. gloeosporioides* (AGOSTINE et al., 1992; ASSIS et al., 2001; FREEMAN et al., 1998; FURTADO et al., 1999). Os meios de cultura adequados permitem o bom desenvolvimento do microorganismo com alta esporulação, para produção de fonte de inóculo puro e uniforme que permitam a reprodução de sintomas característicos da doença, como, por exemplo, em testes de patogenicidade e de variabilidade de diferentes isolados (SMITH, 1986; SMITH e BLACK, 1990), avaliação de eficácia de métodos de controle (SMITH, 1987), caracterização de recursos genéticos visando à identificação de fontes de resistência (FALEIRO et al., 2001) e na caracterização de populações segregantes visando a estudos de herança da resistência (FALEIRO et al., 2003) e ao desenvolvimento de cultivares resistentes (FALEIRO et al., 2004).

Diferentes metodologias de inoculação de *C. gloeosporioides* em frutos e plantas de maracujá são relatadas na literatura (FISCHER et al. 2009, MARTINS et al., 2008, ROCHA et al. 1998). São verificadas variações na concentração de inóculo, idade da planta, uso ou não de fermentos, condições ambientais pré e pós-inoculação, entre outras. A falta de

padronização da metodologia pode levar a obtenção de diferentes resultados utilizando-se os mesmos materiais. Para que sejam minimizados os erros, o método de inoculação e o processo de análise utilizado na quantificação de doenças deve ser capaz de fornecer resultados acurados, precisos e reprodutíveis (SPOSITO et al., 2004, LARANJEIRA, 2005).

Neste sentido, objetivou-se neste trabalho, avaliar meios de cultura e métodos de inoculação de *C. gloesporioides* em maracujazeiro azedo, visando a verificar a sua eficiência na obtenção de fonte de inóculo, na reprodução de sintomas e viabilidade prática para utilização em trabalhos de pesquisa, principalmente visando a identificação de fontes de resistência e avaliação de populações segregantes. .

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Avaliação de meios de cultura**

A avaliação dos diferentes meios de cultura foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Cerrados. Foram avaliados 4 meios de cultura :Aveia (farinha de aveia Quaquer© 6% +ágar 1,2% em água ), BDA (BDA pronto Himedia© 3,9% em água), V8 ( 40 ml de V8 pronto, Campbell©, 600 mg de CaCO<sub>3</sub> e 3,5 gramas de ágar) Ágar (Agar 1,6% em água). Os meios de cultura foram esterilizados a 120 °C por 20 minutos e em seguida foram vertidos em placas de Petri .Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 4 repetições sendo que cada repetição foi constituída pela média de 3 placas. Utilizou-se o isolado CEN419 de *C. gloesporioides*, procedente do Distrito Federal, pertencente à coleção de fungos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Este isolado vem sendo bastante utilizado por apresentar grande produção de conídios e alta agressividade (MARTINS, et al 2008).

Discos de cinco milímetros de diâmetro foram retirados das bordas da colônia do isolado CEN 419 mantido em meio de aveia e transferidos para o centro das placas de petri com os meios de cultura utilizados. Para o desenvolvimento do fungo, as placas foram mantidas sob um regime de luz continua e temperatura de 29±1 °C. Após 7 dias, procedeu-se a medição do diâmetro médio das colônias em dois sentidos diametralmente opostos com o auxilio de um paquímetro digital. Para a extração dos conídios, foi adicionado 5 ml de água destilada em cada placa, efetuou-se a raspagem da colônia com o auxilio de uma alça para a liberação dos conídios dos acérvulos. A suspensão extraída das placas foi filtrada utilizando-se uma gaze e os conídios foram quantificados em um hemacitômetro (câmara de Neubauer).

Para cada placa foram feitas duas leituras com base no número de conídios em cinco quadrantes da câmara de Neubauer. Os dados do diâmetro médio da colônia e da quantidade de conídios produzidos por placa foram submetidos a análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas entre si pelo teste de Tukey em nível de 1% de significância, com o auxílio do programa estatístico Genes (CRUZ, 2004).

### **3.2.2 Avaliação dos métodos de inoculação**

A avaliação de metodologias de inoculação foi realizada em casa de vegetação (20-30 °C e UR 70-90%) da Embrapa Cerrados, localizada em Planaltina, DF, 15°39'84'' de latitude S e 47°44'41'' de longitude W, altitude de 1.000 m, entre os meses de abril e maio. As mudas utilizadas para testar as diferentes metodologias, foram provenientes de sementes do híbrido BRS Gigante Amarelo. Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados, constituído por 4 blocos e 6 plantas por parcela. Para inoculação, utilizou-se o isolado CEN 419 de *C. gloesporioides*.

O inóculo foi preparado a partir de culturas puras cultivadas em meio de aveia. Discos de micélio de cinco milímetros de diâmetro foram transferidos das bordas da cultura do isolado para novas placas contendo o mesmo meio de cultura. Para o desenvolvimento do fungo e produção dos conídios, as placas foram mantidas em sob um regime de luz contínua à temperatura de  $29 \pm 1$  °C.

Após 7 dias, procedeu-se a extração dos conídios, adicionado-se 5 ml de água destilada em cada placa e realizando-se a raspagem do micélio com o auxílio de uma alça. A suspensão extraída das placas foi filtrada utilizando-se uma gaze. A contagem dos conídios foi feita em hemocítômetro (câmara de Neubauer) para o cálculo da concentração dos conídios. As inoculações foram realizadas quando as plantas se encontravam com 80 dias (7 a 9 folhas), utilizando-se uma suspensão de conídios numa concentração aproximada de  $5 \times 10^6$  conídios/ml.

Foram testados os seguintes métodos de inoculação: 1) Furador circular para cintos adaptado de 4 mm de diâmetro (JUNQUEIRA, 2010), previamente imerso na suspensão de conídios. Os orifícios foram feitos na segunda, terceira e quarta folha, a partir do ápice, sendo dois furos por folha, totalizando seis furos por planta; 2) Perfuração do caule utilizando-se 15 agulhas de costura finas, fixadas em Durepox<sup>®</sup> em formato retangular, previamente imersas em suspensão de conídios. Os ferimentos no caule, foram efetuados no primeiro e segundo entre-nó de cada planta, totalizando dois ferimentos por planta; 3)

pulverização das folhas com suspensão de conídios. A Figura 1 ilustra a metodologia de inoculação artificial.



**Figura 1:** Metodologia de Inoculação artificial Furador circular para cintos adaptado(A), Perfurador com 15 agulhas de costura finas, fixadas em Durepox<sup>®</sup> (B), Pulverizador com suspensão de conídios(C). Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.

As plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida (UR > 90%) até o final do experimento. A umidade na câmara foi mantida por meio de nebulizações programadas durante 6 minutos, 4 vezes ao dia.

As avaliações foram realizadas aos 7, 14, 21, 28 dias após a inoculação. Para a avaliação do método 1, mediu-se o diâmetro transversal e longitudinal das necroses formadas em torno do orifício circular, com o auxílio de um paquímetro digital, conforme metodologia proposta por JUNQUEIRA (2010) para avaliação da severidade de bacteriose no maracujazeiro. As áreas necrosadas foram calculadas por meio da fórmula  $A = \pi R^2$ . Para o método 2, utilizou-se paquímetro digital, medindo-se, em milímetros, o comprimento da área lesada. Para o método 3, a avaliação foi baseada em análise visual da porcentagem da área necrosada nas folhas.

Para a comparação dos métodos de inoculação, transformou-se o valor máximo dentro de cada unidade em 100%, e, proporcionalmente, os demais valores também foram convertidos. Foram feitas análises estatísticas descritivas, determinando-se, para cada tratamento, o valor médio, máximo e mínimo, o coeficiente de variação, variância e desvio padrão.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação aos meios de cultura, observamos diferenças altamente significativas pelo teste F (probabilidade < 0,01) dos efeitos dos meios de culturas sobre as características diâmetro médio da colônia em cm e número médio de conídios extraídos por placa (Tabela 1).

**Tabela 1-** Significância (Probabilidade em % pelo Teste F) de quatro meios de cultura quanto ao diâmetro médio da colônia (cm) e o número médio de conídios/ml (milhões). UnB/Embrapa Cerrados, Brasília, DF, 2014.

Meios de cultura	Diâmetro médio da colônia(cm)	Número médio de conídios/ml (milhões)
Meio Aveia	6,04 a	7,338 a
Meio BDA	3,90 b	1,308 b
Meio V8	2,33 c	0,796 b
Meio Agar	0,74 d	0,103 b
Probalilidade F	0**	0**
CV (%)	4,7	32,53
Coefficiente de determinação (%)	99,88	98,64

Em cada placa de Petri foram obtidos 5 ml de suspensão de conídios

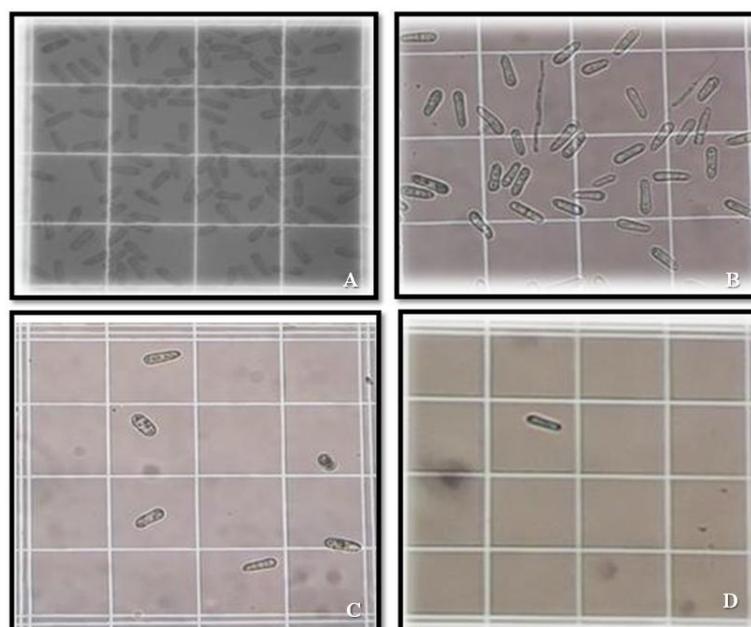
O coeficiente de variação obtido para o diâmetro médio da colônia foi de 4,7 %, valor considerado baixo. Já o coeficiente de variação para o número médio de conídios por placa foi de 32,5 %, considerado alto. Observou-se altos valores do coeficiente de determinação, para as duas características avaliadas, o que mostra a acurácia e confiabilidade dos dados experimentais (CRUZ et al., 2004), de modo que as características avaliadas foram bons indicadores para a seleção do melhor meio de cultura para o *C. gloesporioides* visando à produção de conídios

A comparação entre as médias (Tabela 2) mostra que o maior diâmetro médio da colônia foi verificado no meio de cultura de aveia (6,04 cm) e o menor diâmetro médio foi verificado no meio Agar (0,74 cm). Sussel (2005), trabalhando com diferentes meios de cultura e diferentes isolados de *Colletotrichum lagenarium*, verificou que o meio de Aveia apresentou os melhores resultados para crescimento micelial para a maioria dos isolados estudados. Mello et al.,(2004), trabalharam com *colletotrichum gloesporioides* em pimentão e verificaram que o em meio de aveia na temperatura de 25°C, sob luz contínua, por 12 dias, proporcionou o melhor resultado no crescimento da colônia e esporulação do fungo. Segundo Tandon e Chandra (1962), um bom crescimento micelial está associado a uma boa

esporulação. COUTO e MENEZES (2004) trabalharam com *Colletotrichum musae* e encontraram tanto isolados que apresentavam bom crescimento micelial e esporulação, quanto isolados que apresentavam alta esporulação e baixo crescimento micelial. Cochrane (1958) relatou que nem sempre há relação direta entre crescimento e esporulação, e vice versa. Nem sempre um substrato ótimo para o crescimento micelial exerce o mesmo efeito sobre a esporulação (GRIFFIN, 1994). Dependendo do meio de cultura e do isolado utilizado, o crescimento micelial reduzido pode estimular a esporulação (COUTO E MENEZES, 2004). No presente trabalho, o meio que promoveu maior esporulação do fungo, também propiciou o seu maior crescimento micelial.

Quanto ao número médio de conídios por ml (esporulação) (Figura 2), verificou-se que o meio de aveia apresentou as melhores condições de esporulação (7,338 milhões) conídios por ml, diferindo estatisticamente dos outros meios avaliados (BDA, V8 e Agar). Assis et al. (2001) observaram que a esporulação de *C. gloeosporioides* é favorecida por substratos que contêm amido, enquanto que substratos que contêm glicose ou maltose como fonte de carbono não foram favoráveis à esporulação.

Neste trabalho utilizou-se um regime de luz contínuo, fato que também pode ter contribuído para o meio de aveia apresentar as melhores condições de produção de conídios, uma vez que o uso de luz contínua pode causar um estresse devido à intensa luminosidade. Nesta condição, pode haver um maior ressecamento do meio de cultivo, induzindo o fungo a gerar um número maior de descendentes. Além disso, pode haver uma provável influência da luz na síntese de compostos essenciais à esporulação, ausentes no meio de cultura (CRUZ et al., 2009). O meio de cultura Agar, foi o que apresentou as piores condições de esporulação neste trabalho (0,103 milhões de conídios /ml).



**Figura 2-** Contagem de conídios de *Colletotrichum gloesporioides*, na câmara de Neubauer. conídios produzidos em meio de cultura de Aveia(A), conídios produzidos em meio de cultura BDA(B), conídios produzidos no meio de cultura V8 (C) e conídios produzidos no meio de cultura Ágar água (D). Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.

Neto et al., (2010) trabalharam com a influência dos meios de cultura na esporulação do fungo *Magnaporthe grisea*, causador da brusone no arroz, e verificaram que o meio de cultura a base de aveia foi o que apresentou melhor eficiência na produção de conídios enquanto o meio de cultura a base de BDA comercial não induziu a esporulação. Martins et al.,(2008), avaliaram a esporulação do mesmo isolado (CEN 419), em diferentes meios de cultura líquido e verificaram que o meio BD (Batata dextrose), proporcionou maior esporulação, para este isolado em meio líquido. O meio de aveia além de apresentar as melhores condições de esporulação, também é considerado um meio de cultura de baixo custo, além disso, o uso do meio sólido neste trabalho foi muito eficiente uma vez que não foi necessário a utilização de um agitador, com controle de luz e temperatura, ligado por um período de 7 dias, é utilizado para crescimento de fungos em meio líquido.

Na avaliação das metodologias de inoculação, observou-se diferenças na dispersão e precisão dos dados relativos à resistência das plantas da cultivar BRS Gigante Amarelo submetidas aos diferentes métodos de inoculação (Tabela 2). Com base nas informações é possível analisar os métodos de inoculação que proporcionou maior desenvolvimento das lesões e que proporcionou maior precisão das informações, ou seja, menores valores absolutos

das medidas de dispersão (amplitude, coeficiente de variação, variância e desvio padrão da média).

**Tabela 2.** Médias, valores mínimos e máximos, coeficientes de variação (CV), variância e desvio padrão (DP) para os diferentes métodos de inoculação de *Colletotrichum gloesporioides* em mudas de maracujazeiro-azedo. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.

Método de inoculação	Média (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)	(CV)	Variância (%)	Desvio Padrão (DP)
-Ferimento por agulhas no caule	79,9575	61,11	100,00	24,7 %	392,13	19,80
-Orifício circular no limbo foliar	60,8825	35,06	100,00	45,4 %	764,68	27,65
-Pulverização foliar	66,2525	10,43	100,00	58,5 %	1501,13	38,74

A maior porcentagem média de doença (79,96%) e o maior valor mínimo de doença observado (61,11%) foram proporcionados pelo método de inoculação em que se realizou ferimento no caule da planta com a utilização de agulhas. O menor valor mínimo de doença ocorreu quando se pulverizou os esporos na planta, sem ferimento. Possivelmente tal fato tenha ocorrido porque métodos baseados em ferimentos não permitem que a planta apresente resistência física à penetração do patógeno, facilitando a colonização dos tecidos. Os fatores estruturais das plantas atuam como barreiras físicas, que evitam ou restringem a infecção da doença. Estas estruturas podem estar presentes nas plantas ou serem produzidas em resposta à infecção. A cutícula, estômatos, tricomas e paredes celulares espessas, dentre outros, são exemplos de estruturas de defesa das plantas (PASCHOLATI e LEITE, 1995).

O menor coeficiente de variação (CV) ocorreu no tratamento em que se utilizou ferimento por agulhas no caule (24,77%). A precisão de um experimento é avaliada pela magnitude do erro experimental, definido por STEEL E TORRIE (1980) como a variação devida ao efeito dos fatores não controlados ou que ocorrem ao acaso, de forma aleatória. O coeficiente de variação é definido como a estimativa do erro experimental em porcentagem da estimativa da média, é uma das medidas estatísticas mais utilizadas pelos pesquisadores na avaliação da precisão dos experimentos (STEEL E TORRE, 1980).

Segundo PIMENTEL GOMES (2000), em experimentos de campo, se o coeficiente de variação for inferior a 10% considera-se o mesmo como baixo, ou seja, o experimento tem alta precisão, de 10% a 20% os CVs são considerados médios, implicando em boa precisão,

de 20% a 30% são julgados altos, significando baixa precisão e acima de 30% são tidos como muito altos, indicando baixíssima precisão. Adotando-se este critério, a inoculação por meio de orifício circular no limbo foliar e pulverização foliar proporcionaram baixíssima precisão, com CVs de 45, 4 e 58,5%, respectivamente. É importante ressaltar, no entanto, que tal classificação não considera a cultura, variáveis analisadas, número de parcelas, dentre outros. Em trabalhos nos quais procuraram avaliar o uso do CV em várias culturas, ESTEFANELET al. (1987) observaram que culturas anuais naturalmente tendem a apresentá-lo em menores valores, ao contrário de plantas frutíferas, que, por suas limitações quanto ao dimensionamento das parcelas e número de repetições, possuem geralmente valores maiores de CV.

O método baseado em ferimento por agulhas no caule é um método simples, fácil de avaliar e necessita de pouca suspensão do inóculo, fator importante a ser considerado, uma vez que em trabalhos que visam selecionar genótipos resistentes a antracnose demandam grandes quantidades de inóculo. Quanto à metodologia utilizada baseando-se na inoculação nos dois primeiros entre-nós, observou-se que o ferimento no primeiro entre-nó proporcionou melhor desenvolvimento da doença, que chegou a atingir o ponteiro, causando a seca do mesmo em algumas plantas.

Os menores valores de variância e desvio padrão também foram observados para o método com ferimento por agulhas no caule (392,1 e 19,8, respectivamente), seguido pelo método baseado em orifício circular no limbo foliar (764,7 e 27,6, respectivamente).

O método baseado em pulverização foliar, além de ter proporcionado altos valores de variância e desvio padrão, possui alguns inconvenientes. Os sintomas observados foram em baixa magnitude e apenas nas folhas jovens e nos folíolos. Além disso, este tipo de metodologia apresenta limitações por ser mais subjetiva e por não permitir um ajuste da acuidade visual na avaliação dos níveis de severidade. Apesar dessas limitações, ajustes desse método de inoculação podem ser interessantes, considerando que não se realiza ferimentos e permite rápida inoculação de grande quantidade de plantas, principalmente quando se utiliza plantas em estágios iniciais de desenvolvimento.

### 3.4 CONCLUSÕES

O meio de aveia (farinha de aveia Quaquer© 6% +ágar 1,2% em água) proporcionou a melhor condição para a produção de conídios de *C. gloesporioides*.

O método de inoculação que gerou maior desenvolvimento de sintomas e maior precisão na avaliação da antracnose em mudas de maracujazeiro foi o ferimento por agulhas no caule.

### 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W.; MITCHELL, D.J. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, Saint Paul, v.82, n.11, 1377- 1382, 1992.

ALMEIDA, L. C. C. Identificação específica de *Colletotrichum* caracterização da agressividade e efeito indutores químicos no controle da antracnose em maracujá amarelo. 2005. 79 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - **Universidades Federal Rural de Pernambuco**, Recife.

ASSIS, T.C.; MENEZES, M.; ANDRADE, D.E.G.T.; COELHO, R.S.B.; OLIVEIRA, S.M.A. Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* quanto ao efeito da nutrição de carboidratos no crescimento, esporulação e patogenicidade em frutos de três variedades de manga. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal v.27, n.2, p.208-212, 2001.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. New York. John Wiley e Sons. 1990.

COCHRANE, V.W. *Physiology of fungi*. New York: John Wiley, 1958. 524p.

COUTO, E.F. e MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**, n. 29, pág. 406-412. 2004.

COUTO, E.F.; MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia brasileira**. v. 29, n. 4, p. 406-412, 2004.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2004. 480p

CRUZ, M. F. A.; PRESTES, A. M.; MACIEL, J. L. N. Esporulação de *Pyricularia grisea* em diferentes meios de cultura e regime de luz. **Ciência Rural**, v.39, p.1562-1564, 2009.

ESTEFANEL, V.; PIGNATARO, I.A.B.; STORCK, L. Avaliação do coeficiente de variação de experimentos com algumas culturas agrícolas. In: SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADA À EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA, 2., 1987, Londrina. **Anais...** Londrina: Univ. Estadual de Londrina / Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 1987. p.115-131.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; MOREIRA, M.A. e 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.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; SHUSTER, I.; CORRÊA, R.X.; GOOD-GOD, P.I.; BROMMONSHENKEL, S. H.; MOREIRA, M.A. e BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro-comum à ferrugem, antracnose e mancha-angular com o auxílio de marcadores RAPD. **Fitopatologia brasileira**, 28 (1): 59-66. 2003.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A; VINHADELLI, W.S.; MOREIRA, M.A.; STAVELY, J.R. e BARROS, E.G. Resistência de linhagens de feijoeiro a quatro raças de *Uromyces appendiculatus* isoladas em Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 26:77-80. 2001.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease, Saint Paul**, v.82, n.2, p.596-604, 1998.

FURTADO, E.L.; BACH, E.E.; KIMATI, H.; MENTEN, J.O.M.; SILVEIRA, A.P. Caracterização morfológica, patogênica e isoenzimática de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de seringueira. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.25, n.3, p.221-228, 1999.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. New York: Wiley-Liss, 1994. 458p.

JUNQUEIRA, K. P. Resistência genética e induzida de maracujazeiro à bacteriose. 2010. 143 p. **Tese** (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

LARANJEIRA, F.F. Problemas e perspectivas da avaliação de doenças como suporte ao melhoramento do maracujazeiro. In: In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 161-184.

MARTINS, I; PEIXOTO, J. R; JUNQUEIRA, N.V. T; MELLO, S. C.M de. Reação de genótipos de maracujazeiro-amarelo ao *Colletotrichum gloeosporioides*. **Rev. Bras. Frutic.** [online]. 2008, vol.30, n.3, pp. 639-643. ISSN 0100-2945. doi: 10.1590/S0100-29452008000300013.

MELLO, A. F. S; MACHADO, A.C.Z e BEDENDO, I.P. Development of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from green pepper in different culture media, temperatures, and light regimes. **Sci. agric.** (Piracicaba, Braz.) [online]. 2004, vol.61, n.5, pp. 542-544. ISSN 0103-9016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162004000500013>.

NETO,J.J D; SANTOS G.R. dos; NETO,M. D de C; ANJOS, L.M. dos; CUNHA, A.C.F ; IGNÁCIO,M.Influência do meio de cultura na esporulação de magnaporthe grisea e da concentração de conídios na severidade da brusone do arroz **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 173-179, Mar./Apr. 2010

PASCHOLATI, S.F. e LEITE, B. Hospedeiros: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. e AMORIM, L. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. 3.ed. São Paulo: **Ceres**, 1995, 1, pp.417-453.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: Nobel, 2000. 477 p.

ROCHA, J.de R. de S. Controle biológico de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da antracnose do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), com espécies de *Trichoderma*. 1998. 147 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SMITH, B.J. Pathogenic variation among *Colletotrichumfragariae* isolates. **Phytopathology**, v.76, 1986.p.1134-1135.

SMITH, B.J.; BLACK, L.L. Resistance of strawberry plants to *Colletotrichumfragaria* affected by environmental conditions. **Plant Disease**, v.71, 1987.p.834-837.

SMITH, B.J; BLACK, L.L. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. **Plant Disease**, v.74, 1990.p.69-76.

SPOSITO, M.B.; AMORIM, L.; BELASQUE JUNIOR, J. BASSANEZI, R.B.; AQUINO, R. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da mancha preta em frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.1, p.81-85, 2004.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. New York: McGraw-Hill **Book Company**, 1980. 633 p.

SUSSEL, A. A. B . Caracterização de isolados de *Colletotrichum lagenarium*, agente causal da antracnose das cucurbitáceas / Angelo Aparecido Barbosa Sussel. – **Dissertação** de mestrado. Piracicaba, 2005. 68 p. : il.

YAMASHIRO, T. Principais doenças do maracujazeiro amarelo no Brasil. In: Ruggiero, C. Maracujá. Ribeirão Preto, **Legis Summa**, 1987. p.146-59.

## **CAPÍTULO 4**

### **CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE MARACUJAZEIRO AZEDO QUANTO À RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM CONDIÇÕES DE CASA-DE-VEGETAÇÃO**

### **CHARACTERIZATION OF CULTIVARS OF PASSIONFRUIT FOR RESISTANCE TO ANTHRACNOSE IN GREENHOUSE CONDITIONS**

## CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE MARACUJAZEIRO AZEDO QUANTO À RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM CONDIÇÕES DE CASA-DE-VEGETAÇÃO

### RESUMO

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* é o agente causador da antracnose, uma das principais doenças do maracujazeiro. Materiais genéticos comerciais de maracujazeiro azedo apresentam reduzida variabilidade genética para resistência a doenças, incluindo a antracnose. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a resistência de cultivares comerciais de maracujazeiro azedo à antracnose em condições controladas. Foram caracterizadas as cultivares BRS Gigante Amarelo, BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro Vermelho, Sol Amarelo Azedo Graúdo Brilhante (Feltrin) e BRS Rubi do Cerrado. Utilizou-se o isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* (CEN419), na concentração de  $5 \times 10^6$  conídios/ml de suspensão, o qual foi aplicada em ferimentos realizados no primeiro e no segundo entrenó em mudas de 80 dias de idade. Após 7, 14, 21 e 28 dias da inoculação, foi quantificado o comprimento da lesão. Foi também calculada a área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL). Foram utilizado um esquema fatorial  $5 \times 2$  (5 genótipos e 2 locais dos ferimentos) com 3 repetições, cada repetição representada pela média de 6 plantas. Foram realizadas análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de significância. Foram verificadas diferenças significativas entre as cultivares de maracujazeiro e a localização dos ferimentos da inoculação para o comprimento da lesão avaliado aos 14, 21 e 28 dias após a inoculação, bem como para a variável AACPL. Não houve efeito significativo da interação entre cultivares e a localização dos ferimentos. As cultivares que apresentaram maior resistência a antracnose foram o BRS Rubi do Cerrado seguido das cultivares BRS Sol do Cerrado e BRS Ouro Vermelho. A cultivar com maior susceptibilidade a antracnose foi o BRS Gigante Amarelo seguido da cultivar Sol Amarelo Azedo Graúdo Brilhante (Feltrin).

**Palavras chave:** *Passiflora edulis*, antracnose, resistência genética, sementes comerciais.

## CHARACTERIZATION OF CULTIVARS OF PASSIONFRUIT FOR RESISTANCE TO ANTHRACNOSE IN GREENHOUSE CONDITIONS

### ABSTRACT

The *Colletotrichum gloeosporioides* is the causal agent of anthracnose, which is an important disease of passion fruit. Genetic materials of commercial sour passion fruit have reduced genetic variability for resistance to diseases, including anthracnose. The objective of this work was to evaluate the resistance of passion fruit commercial cultivars to anthracnose in controlled conditions. It was characterized BRS Gigante Amarelo, BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro Vermelho, Sol Amarelo Azedo Graúdo Brilhante (Feltrin) and BRS Rubi do Cerrado. It was used the *Colletotrichum gloeosporioides* (CEN419) isolate at a concentration of  $5 \times 10^6$  conidia / ml of solution, which was applied on injuries realized in the first and second internodes of 80 days old seedlings. After 7, 14, 21 and 28 days after inoculation, it was quantified the lesion length. The Area Under the Curve of Lesion Progress (AUCLP) was also calculated. We used a 5 x 2 factorial design (5 genotypes and 2 injuries local) with 3 repetitions, each repetition represented by the mean of 6 plants. Analyses of variance were performed and the treatments means were compared by Duncan test at the 5% significance level. It was found significant differences among the passion fruit cultivars and injuries local to the AUCLP and lesion length evaluated at 14, 21 and 28 days after inoculation. There was no significant interaction between cultivars and injuries local. The cultivars with the highest anthracnose resistance were BRS Rubi do Cerrado followed by BRS Sol do Cerrado and BRS Ouro Vermelho. The cultivar with more anthracnose susceptibility was the BRS Gigante Amarelo followed by Sol Amarelo Azedo Graúdo Brilhante (Feltrin) cultivar.

**Keywords:** *Colletotrichum gloeosporioides*, *Passiflora edulis*, anthracnose, genetic resistance, commercial seed.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A produção de maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) no Brasil vem ganhando impulso, nos últimos anos, em função de preços atraentes principalmente no mercado de frutas frescas. Com o aumento da área cultivada, e a inclusão de novas regiões no cenário produtivo brasileiro, aumentam também os problemas fitossanitários que atingem essa cultura.

A antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, é uma das doenças em pós-colheita mais importantes do maracujazeiro amarelo. A antracnose ataca todos os órgãos da parte aérea da planta e constitui ainda um dos mais sérios problemas na pós-colheita do maracujá, podendo penetrar até mesmo pela superfície intacta dos frutos. As lesões são deprimidas, de coloração escura com podridão seca, causando um enrugamento precoce da área afetada depreciando o fruto para a comercialização e consumo humano.

Apesar das práticas de manejo integrado para a pré-colheita (JUNQUEIRA, 2002) e pós-colheita (SILVA e DURIGAN 2000), o controle não tem sido satisfatório. Fundamentados na baixa resistência observada em seus estudos, WULFF et al. (1994) sugerem investigar cultivares que expressem menor severidade da doença.

JUNQUEIRA et al. (2003) observaram que materiais genéticos comerciais de maracujazeiro azedo apresentam reduzida variabilidade genética para resistência a doenças, incluindo a antracnose. Híbridos de maracujazeiro azedo, (BRS Gigante Amarelo, BRS Ouro Vermelho e BRS Sol do Cerrado) foram lançados (JUNQUEIRA et al 2009) e 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 (JUNQUEIRA et al., 2005; FALEIRO et al., 2005; JUNQUEIRA, 2010). Neste trabalho, objetivou-se avaliar a resistência de cultivares comerciais de maracujazeiro azedo recentemente lançados quanto à resistência à antracnose em condições controladas de casa de vegetação.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação (20-30°C e UR 70-90%) da Embrapa Cerrados, localizada em Planaltina, DF, 15°39'84'' de latitude S e 47°44'41'' de longitude W, altitude de 1.000 m, entre os meses julho e agosto de 2011. Foram caracterizadas as cultivares BRS Gigante Amarelo, BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro Vermelho, BRS Rubi do Cerrado e Cultivar Sol -Feltrin©. As plantas foram obtidas por meio de sementes. As sementes foram germinadas em bandejas de poliestireno de 72 células (120 ml/célula), com substrato Plantmax®, em ambiente sob nebulização. Após 30 dias da germinação, as mudas foram transferidas para saquinhos com capacidade de 1 litro, constituídos de uma mistura de terra, areia, esterco de gado, super triplo, KCL, FTE BR12 e Filler.

Foi utilizado o isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* (CEN419) da coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, o qual foi multiplicado no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Cerrados. Este isolado vêm sendo bastante utilizado por apresentar grande produção de conídios e alta agressividade (MARTINS, 2008).

O inóculo foi preparado a partir de culturas puras cultivadas em meio BDA (batata Dextrose Agar). Discos de micélio de cinco milímetros de diâmetro foram transferidos das bordas da cultura do isolado para 40 novas placas contendo o mesmo meio de cultura. As placas foram mantidas em câmara de crescimento sob fotoperíodo alternado de 12 horas, à temperatura de 28 + 1 °C, para o desenvolvimento do fungo.

Após 7 dias, procedeu-se a extração dos conídios. Para tanto, foram adicionados 5 ml de água destilada em cada placa e efetuou-se a raspagem do micélio com o auxílio de uma alça. A suspensão extraída das placas foi filtrada utilizando-se uma gaze. A contagem dos conídios foi feita em câmara de Neubauer e posteriormente foi realizado o cálculo da concentração dos conídios. Utilizou-se 200 ml da suspensão ajustada para concentração de  $5 \times 10^6$  de conídios/ml. As inoculações foram realizadas quando as plantas se encontravam-se com 80 dias (7 a 9 folhas).

A inoculação foi realizada através da perfuração do primeiro e segundo entre-nós (ferimento 1 e 2 respectivamente), utilizando-se 15 agulhas de costura finas, fixadas em Durepox® em formato retangular, previamente imersas em suspensão de conídios numa concentração de  $5 \times 10^6$  conídios/ml. As plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida até o final do experimento. O experimento foi montado utilizando um esquema fatorial 5 x 2

(5 genótipos e 2 locais dos ferimentos) com 3 repetições, sendo cada repetição representada pela média de 6 plantas.

A avaliação da severidade da antracnose foi realizada com auxílio de um paquímetro digital, medindo-se o comprimento da lesão. Foram realizadas quatro avaliações, sendo a primeira feita aos sete dias após a inoculação, e as demais em intervalos de sete dias. A partir dos dados das avaliações foi calculada a área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL), conforme modelo matemático proposto por CAMPBELL E MADDEN (1990):

$$AACPL = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} x (T_{i+1} - T_i)$$

Em que:

AACPL= área abaixo da curva de progresso da lesão;

Y<sub>i</sub> = proporção da doença na i-ésima observação;

T<sub>i</sub> = tempo em dias na i-ésima observação;

n = número total de observações;

Foram realizadas análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de significância.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observam-se diferenças significativas entre as cultivares de maracujazeiro e a localização dos ferimentos da inoculação para o comprimento da lesão aos 14, 21 e 28 dias, bem como para a variável AACPL. Para o comprimento da lesão aos 7 dias, não houve diferenças significativas entre as cultivares e local do ferimento para a inoculação, possivelmente devido ao curto período para o desenvolvimento da lesão. Não houve interação entre cultivares e localização dos ferimentos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Significância (Probabilidade em % pelo Teste F) do efeito de genótipo (G) e do local do ferimento (F) no comprimento da lesão (CL) aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação e área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL) observados em 5 cultivares de maracujazeiro azedo inoculados com o isolado CEN-419 de *Colletotrichum gloeosporioides*. UnB/Embrapa Cerrados, Brasília, DF, 2014.

Fonte de variação	GL	CL 7 dias	CL 14 dias	CL 21 dias	CL 28 dias	AAPCL
Variedades comerciais (G)	4	16,10	0,58**	0,92**	3,24*	0,25**
Local do ferimento (F)	1	14,01	0,92**	0,17**	0,60**	0,84**
G x F	4	100,0	27,89	8,3	11,41	13,97
Média		8,89	12,83	16,52	17,98	330,71
Coefficiente de variação (%)		19,99	33,91	36,25	33,85	24,98
Coefficiente de determinação (%)		45,59	80,04	77,83	69,39	83,16

\*\*,\* significativo pelo teste F à probabilidade <1 e <5%, respectivamente

Até os 7 dias de avaliação, os genótipos não diferiram estatisticamente quanto ao comprimento da lesão incitada pela doença. Sendo assim, infere-se que, para seleção de genótipos de maracujazeiro azedo em casa de vegetação visando à resistência a antracnose, as avaliações podem ser iniciadas aos 14 dias. Aos 14 dias, a menor lesão de antracnose no primeiro entre-nó foi observada pela cultivar BRS Rubi do Cerrado (9,45 mm) e Cultivar Sol-Feltrin© (10,41 mm), que não diferiram estatisticamente da cultivar BRS Sol do Cerrado e BRS Ouro Vermelho, mas foram inferiores àquela constatada na cultivar BRS Gigante Amarelo (24,10 mm) (Tabela 2). Aos 21 dias após a inoculação, as menores médias de comprimento de lesão foram verificadas nas cultivares BRS Rubi do Cerrado e BRS Ouro vermelho diferindo também da cultivar mais suscetível, BRS Gigante Amarelo (Tabela 2). Aos 28 dias, a cultivar BRS Rubi do Cerrado continuou se destacando como a mais resistente, diferindo-se da cultivar BRS Gigante Amarelo e Cultivar Sol -Feltrin© (Tabela 2).

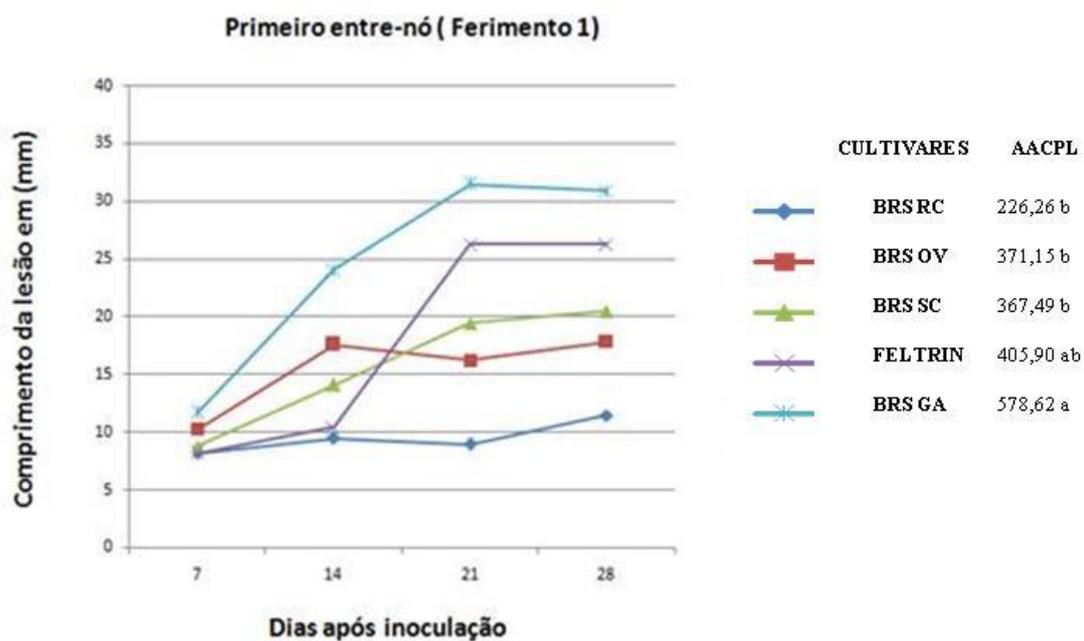
O desenvolvimento da doença no segundo entre-nó (Ferimento 2) foi menor que no primeiro entre-nó em todas as épocas da avaliação, com exceção verificada aos 7 dias após a inoculação em que não houve diferença significativa. Devido ao menor desenvolvimento da lesão no ferimento 2, não foram verificadas diferenças significativas entre os genótipos (Tabela 2). Nesse sentido, para melhor discriminação entre os genótipos, deve-se realizar a inoculação apenas no primeiro entre-nó (ferimento 1).

**Tabela 2.** Comprimento da lesão (mm) aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação e área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL) observados em 5 genótipos de maracujazeiro azedo inoculados com o isolado CEN-419 de *Colletotrichum gloeosporioides* no primeiro e segundo entre-nó (FER 1 e FER 2, respectivamente). UnB/Embrapa Cerrados, Brasília, DF, 2014.

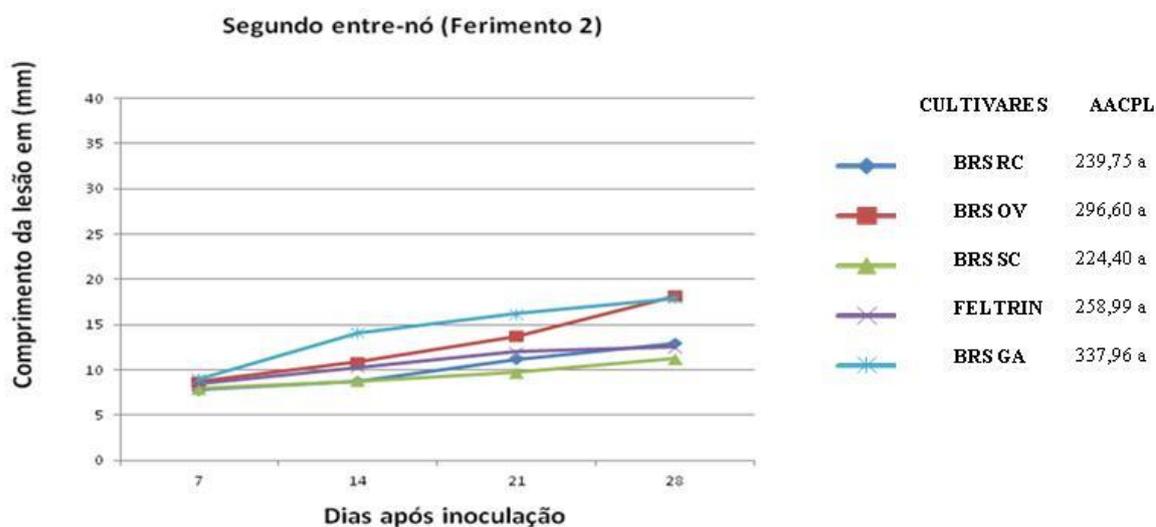
Cultivar	CL - 7 Dias		CL - 14 Dias		CL - 21 Dias		CL - 28 Dias		CL - AACPL	
	FER 1	FER 2	FER 1	FER 2	FER 1	FER 2	FER 1	FER 2	FER 1	FER 2
<b>BRS RC*</b>	8,16 a	7,83 a	9,45 b	8,74 a	8,95 c	11,18 a	11,50 b	12,98 a	226,26 b	239,75 a
<b>BRS OV*</b>	10,26 a	8,69 a	17,56 ab	10,85 a	16,25 bc	13,74 a	17,86 ab	18,15 a	371,15 b	296,60 a
<b>BRS SC*</b>	8,75 a	7,96 a	14,08 ab	8,74 a	19,43 abc	9,72 a	20,46 ab	11,24 a	367,49 b	224,40 a
<b>FELTRIN*</b>	8,16 a	8,46 a	10,41 b	10,27 a	26,27 ab	11,99 a	28,63 a	12,52 a	405,90 ab	258,99 a
<b>BRS GA*</b>	11,64 a	9,04 a	24,10 a	14,09 a	31,47 a	16,18 a	30,88 a	17,92 a	578,62 a	337,96 a
<b>Média</b>	9,39 A	8,39 A	15,12 A	10,53 B	20,47 A	12,56 B	21,39 A	14,56 B	389,88 A	271,54 B

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade \* (BRS RC- BRS Rubi do Cerrado, BRS OV- BRS Ouro Vermelho, BRS SC- BRS Sol do Cerrado, Feltrin- Cultivar Sol amarelo azedo graúdo brilhante-Feltrin©, BRS GA- BRS Gigante Amarelo).

Baseando-se em avaliação no primeiro entre-nó, os menores valores de área abaixo da curva de progresso da lesão foram constatados nas cultivares BRS Rubi do Cerrado (226,26), BRS Sol do Cerrado (367,49) e BRS Ouro Vermelho (371,15), inferiores aqueles observados na cultivar BRS Gigante Amarelo (578,62) (Figura 1). Considerando a avaliação no segundo entre-nó, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os genótipos quanto à AACPL (Figura 2). A análise da AACPL, considerando os ferimentos 1 e 2, evidencia o maior desenvolvimento da lesão no ferimento 1 (primeiro entre-nó) (Figura 3).

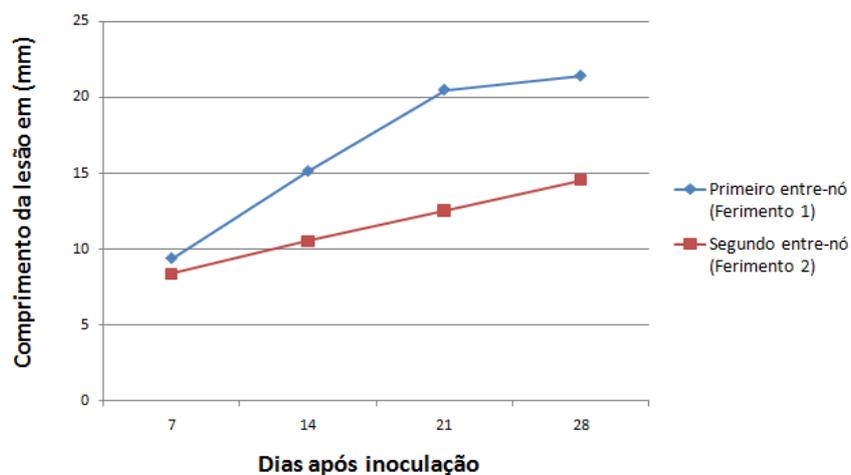


**Figura 1.** Comprimento da lesão aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação com isolado CEN-419 de *Colletotrichum gloeosporioides* no primeiro entre-nó (Ferimento 1) em mudas de maracujazeiro azedo. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.



**Figura 2.** Comprimento da lesão aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação com isolado CEN-419 de *Colletotrichum gloeosporioides* no segundo entre-nó (Ferimento 2) em mudas de maracujazeiro azedo. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014

No geral, a inoculação no primeiro entre-nó proporcionou maior comprimento de lesão em todas as avaliações a partir dos 14 dias, conforme figura 1, tabela 2.



**Figura 3.** Comprimento médio da lesão aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação com isolado CEN-419 de *Colletotrichum gloeosporioides* no primeiro e segundo entre-nós (Ferimento 1 e Ferimento 2, respectivamente) em mudas de maracujazeiro azedo. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014

#### 4.4 CONCLUSÕES

Em programas de seleção para resistência a antracnose baseados em experimentos em casa de vegetação utilizando-se a metodologia proposta neste capítulo, as avaliações podem ser iniciadas a partir de 14 dias após inoculação;

A inoculação por meio de ferimentos com agulhas no primeiro entre-nó da planta proporcionam maior quantidade de doença do que aquela realizada no segundo entre-nó;

Baseando-se na AACPL, os genótipos com menor severidade a antracnose foram BRS Rubi do Cerrado, BRS Sol do Cerrado e BRS Ouro Vermelho e o mais suscetível foi o BRS Gigante Amarelo, sendo que a Cultivar Sol-Feltrin©.

#### 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley, 1990. 532 p.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – desafios da pesquisa In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 187-210.

JUNQUEIRA, N.T.V.; FALEIRO, F.G.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R.; BORGES, R.S.; ARAÚJO, S.B.; ANJOS, J.R.N.; ANDRADE, S.R.M.; COSTA, A.M.; LIMA, A.A.; LARANJEIRA, F.F.; POLTRONIERE, S.L.; VASCONCELLOS, M.A.S.; SCARANARI, C.; MALDONADO, J.F.M. BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro Vermelho e BRS Gigante Amarelo: híbridos de maracujazeiro azedo para sistemas de produção no Cerrado. Livros e cultivares apresentados no II **Encontro da Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas – Regional DF**. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2009. p. 46-47.)

JUNQUEIRA, K. P. Resistência genética e induzida de maracujazeiro à bacteriose. 2010. 143 p. **Tese** (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

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.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81-106.

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**, Brasília, v.38, n.8, p. 1005-1010, 2003.

JUNQUEIRA, N.T.V. Manejo integrado de doenças do maracujazeiro, da mangueira, da goiabeira e das anonáceas. In: Zambolim, L. (Ed.). **Manejo integrado: fruteiras tropicais–doenças e pragas**. Viçosa, MG. 2002. pp. 239-277.

MARTINS, I; PEIXOTO, J. R; JUNQUEIRA, N. V.T.; MELLO, S. C. M. de. Reação de genótipos de maracujazeiro-amarelo ao *Colletotrichum gloeosporioides*. **Rev. Bras. Frutic.** [online]. 2008, vol.30, n.3, pp. 639-643. ISSN 0100-2945. doi: 10.1590/S0100-29452008000300013.

SILVA, A.P. da e DURIGAN, J.F. Colheita e conservação pós-colheita do maracujá. **Informe Agropecuário** 21:67-71. 2000.

WULFF, N.A., ALQUINI, Y. e LEITE, B. Observações histopatológicas, espectrofotométricas e atividade de peroxidase em plantas de maracujá inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides* (patógeno) e *Colletotrichum graminicola* (não patógeno). **Fitopatologia Brasileira** 19:287-288. 1994.

## **CAPÍTULO 5**

### **RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS OBTIDOS POR RETROCRUZAMENTO E DE CULTIVARES DE MARACUJAZEIRO À ANTRACNOSE EM CASA DE VEGETAÇÃO**

### **RESISTANCE OF PASSIONFRUIT GENOTYPES OBTAINED BY BACKCROSSING AND PASSIONFRUIT CULTIVARS TO ANTHRACNOSE IN GREENHOUSE CONDITIONS**

# RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS OBTIDOS POR RETROCRUZAMENTO E DE CULTIVARES DE MARACUJAZEIRO AZEDO À ANTRACNOSE EM CASA DE VEGETAÇÃO

## RESUMO

Objetivou-se, neste trabalho, caracterizar a resistência de genótipos obtidos por retrocruzamento e de cultivares de maracujazeiro azedo à antracnose em condições de casa de vegetação. Foram avaliadas progenies de nove genótipos obtidos por retrocruzamento e as cultivares BRS Gigante Amarelo e BRS Rubi do Cerrado, além de um acesso da espécie silvestre *P. maliformes*. Utilizou-se o isolado de *Colletotrichum gloesporioides* CEN-419, na concentração de  $5 \times 10^6$  conídios/ml e a metodologia de perfuração com agulhas no primeiro entre-nó. Utilizou-se o delineamento em blocos inteiramente casualizados com 12 tratamentos e 3 repetições, sendo cada repetição representada pela média de 3 plantas. A avaliação da severidade foi realizada medindo-se o comprimento da lesão aos 7 dias e 14 dias após inoculação. Foram realizadas análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de significância. Observou-se diferentes níveis de resistência à antracnose entre as espécies, cultivares e progênies de genótipos obtidos por retrocruzamento. O acesso da espécie silvestre *Passiflora maliformes* foi o que apresentou menores médias de comprimento de lesão aos 7 e 14 dias após a inoculação. Entre os genótipos obtidos por retrocruzamentos, CPAC-EC4-121 e CPAC-EC4-128 apresentaram resistência à antracnose com médias de comprimento de lesão estatisticamente iguais às obtidas pelo *P. maliformes*. A cultivar BRS Rubi do Cerrado também apresentou certa resistência à antracnose com médias de comprimento de lesão estatisticamente iguais às obtidas pelo *P. maliformes*.

**Palavra chave:** *Colletotrichum gloesporioides*, *Passiflora*, Resistência genética,

# RESISTANCE OF PASSIONFRUIT GENOTYPES OBTAINED BY BACKCROSSING AND PASSIONFRUIT CULTIVARS TO ANTHRACNOSE IN GREENHOUSE CONDITIONS

## ABSTRACT

The objective of this work was to characterize the resistance of genotypes obtained by backcrossing and passionfruit cultivars in controlled greenhouse conditions. Nine genotypes progenies obtained by backcrossing, the BRS Gigante Amarelo and BRS Rubi do Cerrado cultivars, accession of *P. maliformes* were evaluated. It was used the *Colletotrichum gloeosporioides* (CEN419) isolate at a concentration of  $5 \times 10^6$  conidia / ml of solution, which was applied on stem injuries realized by needles in the first internode. After 7, 14, 21 and 28 days after inoculation, it was quantified the lesion length. The Area Under the Curve of Lesion Progress (AUCLP) was also calculated. It was used a randomized blocks design with 12 treatments and 3 replications, each replicate represented by the mean of 3 plants . The disease evaluation was performed by measuring the length of the lesion at 7 days and 14 days after inoculation. Variance analyses were performed and the means were compared by Tukey test at the 1% significance level . It was observed different levels of anthracnose resistance among species, cultivars and genotypes obtained by backcrossing. The access of *P. maliformes* showed the lowest mean of lesion length at 7 and 14 days after inoculation .Among the genotypes obtained by backcrossing CPAC-EC4-121 and CPAC-EC4-128 showed the same level of anthracnose resistance to that obtained by *P. maliformes* accession. The BRS Rubi do Cerrado Cerrado also showed the same anthracnose resistance to *P. maliformes* accession.

**Keywords:** *Colletotrichum gloeosporioides*, *Passiflora*, genetic resistance

## 5.1 INTRODUÇÃO

O uso de espécies silvestres do gênero *Passiflora* tem mostrado grande potencial para o melhoramento genético do maracujazeiro, principalmente como fontes de resistência a doenças ( JUNQUEIRA et.al 2005; JUNQUEIRA,et al., 2003;SANTOS FILHO e SANTOS, 2003). Nos últimos anos, têm-se observado problemas sérios com várias doenças na cultura do maracujazeiro, as quais depreciam a qualidade e reduzem o valor comercial do fruto, além de reduzir a produtividade e a longevidade da cultura.

A antracnose do maracujazeiro é considerada uma das doenças de maior expressão econômica, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, que é cosmopolita, atacando uma extensa gama de plantas hospedeiras, causando lesões necróticas ou manchas em folhas, ramos, pecíolos, flores e frutos. Os prejuízos causados pela doença são variáveis, dependendo das condições ambientais favoráveis, do grau de suscetibilidade da planta e da quantidade de inóculo presente. A antracnose do maracujazeiro é também importante na pós-colheita, provocando lesões ou manchas escuras na casca dos frutos, o que prejudica a sua aparência e conseqüentemente a sua comercialização (ROCHA et al., 1998; SANTOS FILHO e SANTOS, 2003; JUNQUEIRA et al., 2005).

Alguns autores (JUNQUEIRA et al., 2003; NASCIMENTO, 2003; SOUSA, 2005,BOUZA, 2009; COLLATO, 2010; SOUSA, 2009), trabalhando com diferentes genótipos e cultivares comerciais de maracujá-azedo, não constataram graus de resistência genética que pudessem oferecer resultados satisfatórios no controle antracnose. Esses autores verificaram que a variabilidade para resistência à antracnose das variedades comerciais estudadas é muito baixa.

Espécies silvestres de maracujá tem sido utilizadas com sucesso como fontes de resistência à doenças (JUNQUEIRA et al., 2005; FALEIRO e JUNQUEIRA, 2009). O método de retrocruzamento tem sido utilizado no programa de melhoramento genético do maracujazeiro visando a incorporação de genes de resistência de espécies silvestres em variedades com características comerciais (FALEIRO et al., 2007; FONSECA et al., 2009).

Neste trabalho, objetivou-se avaliar a resistência de genótipos obtidos por retrocruzamento e de cultivares comerciais à antracnose em condições de casa de vegetação.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação (20-30°C e UR 70-90%) da Embrapa Cerrados, localizada em Planaltina, DF, 15°39'84'' de latitude S e 47°44'41'' de longitude W e altitude de 1.000 m. Foram avaliados nove genótipos (matrizes) obtidos por retrocruzamento de maracujá, duas cultivares BRS Gigante Amarelo e BRS Rubi do Cerrado e um acesso da espécie silvestre *P. maliformes* (Tabela 1). Cada genótipo foi avaliado a partir de sua progênie (famílias de meio-irmãos) e as mudas das cultivares e da espécie silvestre foram obtidas de sementes comerciais, plantadas em bandejas de poliestireno estendido de 72 células, preenchidas com substrato (120 ml/célula) a base de vermiculita e casca de *Pinus* sp. (Plantmax®).

**Tabela 1**-Genótipos de maracujazeiros resultantes do processo de retrocruzamento e cultivares utilizadas no estudo e suas respectivas origens. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.

Genótipos	Origem dos híbridos
CPAC-ERE-476	<i>P. edulis</i> “flavicarpa” x <i>P. edulis</i> “roxo” silvestre
CPAC-EC4-121	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
CPAC-EC4-124	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
CPAC-EC4-223	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
CPAC-EC4-325	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
CPAC-ES4-239	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
CPAC-EC4-128	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
CPAC-EC5-356	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)
CPAC-ES4-138	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
BRS Gigante Amarelo	<i>Passiflora edulis</i> Sims
BRS Rubi do Cerrado	<i>Passiflora edulis</i> Sims
CPAC- <i>P.maliformes</i>	<i>Passiflora maliformes</i>

Para a obtenção da fonte de inóculo, foi utilizado o isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* CEN 419 da coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, o qual foi multiplicado no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Cerrados. Este isolado vêm sendo utilizado por apresentar grande produção de conídios e alta agressividade (MARTINS et al., 2008).

O inóculo foi preparado a partir de culturas puras cultivadas em meio de aveia (Farinha de aveia Quaquer© 6% + ágar 1,2% em água) . Discos de micélio de cinco milímetros de diâmetro foram transferidos das bordas da cultura do isolado para 10 novas placas contendo o mesmo meio de cultura. Para o desenvolvimento do fungo, as placas foram mantidas sob um regime de luz contínua e temperatura de 28±1 °C. Após 5 dias, procedeu-se a extração dos conídios, adicionado-se 5 ml de água destilada em cada placa e raspando-se o micélio com o auxílio de

uma alça. A suspensão extraída das placas foi filtrada utilizando-se uma gaze. A contagem dos conídios foi feita em câmara de Neubauer e posteriormente foi realizado o cálculo da concentração dos conídios, ajustando-se a concentração da suspensão para  $5 \times 10^6$  de conídios/ml, a qual foi utilizada nas inoculações

A inoculação foi realizada em plantas com 80 dias (7 a 9 folhas) através da perfuração do primeiro entre-nó utilizando-se 15 agulhas de costura finas, fixadas em Durepox<sup>®</sup> em formato retangular, previamente imersas na suspensão de conídios. As plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida (> 90% de UR) até o final do experimento.

Utilizou-se um delineamento em blocos inteiramente casualizados com 12 tratamentos (genótipos) e 3 repetições, sendo cada repetição representada pela média de 3 plantas. A avaliação da severidade da antracnose foi realizada medindo-se o comprimento da lesão com o auxílio de um paquímetro digital. Foram realizadas duas avaliações, a primeira aos 7 dias e a segunda aos 14 dias após inoculação.

Foram realizadas análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de significância.

### **5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Observou-se diferenças significativas entre os genótipos e cultivares de maracujazeiro para o comprimento da lesão aos 7 e aos 14 dias de avaliação (Tabela 2). O coeficiente de variação foi de 21,13 e 15,03% aos 7 e aos 14 dias após a inoculação, respectivamente indicando uma maior homogeneidade dos dados obtidos 14 dias após a inoculação. Observou-se altos valores de coeficiente de determinação (87,85 e 94,35%) para as duas características avaliadas o que mostra a acurácia e confiabilidade dos dados experimentais (CRUZ et al., 2004).

**Tabela 2-** Significância (Probabilidade em % pelo Teste F) do efeito de genótipo (G) no comprimento da lesão aos 7 e 14 dias após a inoculação observados em 9 genótipos de maracujazeiro azedo obtidos por retrocruzamento, 2 cultivares e 1 espécie silvestre (*P. maliformes*) inoculados com o isolado CEN-419 de *Colletotrichum gloeosporioides*. UnB/Embrapa Cerrados, Brasília, DF, 2014.

Fonte de variação	GL	Comprimento da lesão(mm <sup>2</sup> )7 dias	Comprimento da lesão(mm <sup>2</sup> )14dias
Genótipos (G)	11	0**	0**
Média		28,67	38,91
CV (%)		21,13	15,03
Coefficiente de determinação(%)		87,85	94,35

A comparação entre as médias (Tabela 3), mostrou que *Passiflora maliformes* apresentou o menor comprimento de lesão de 7,55 e 9,36 mm aos 7 e aos 14 dias após a inoculação, respectivamente, apresentando-se como a mais resistente entre os materiais genéticos avaliados. Após a inoculação de *C. gloeosporioides* em *P. maliformes*, observou-se uma lignificação, cicatrização rápida do ferimento realizado. Essa lignificação pode estar correlacionada com as respostas de defesa da planta contra o patógeno (VANICE, et al., 1980, PASCHOLATI e LEITE,1994).

**Tabela 3-** Médias do comprimento da lesão avaliadas aos 7 e aos 14 dias após inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*, em 9 genótipos obtidos por retrocruzamento, 2 cultivares de maracujazeiro azedo e 1 espécie silvestre *P. maliformes*. UnB/Embrapa Cerrados, Brasília, DF, 2014

Genótipos (matrizes)	Comprimento da lesão (mm) 7 dias	Comprimento da lesão (mm) 14 dias
CPAC- maliformes	7,55c	9,36e
CPAC-EC4-121	15,37bc	21,55de
BRS Rubi do Cerrado	19,62abc	27,23cde
CPAC-EC4-128	26,63abc	29,99bcde
CPAC-EC4-223	33,1 ab	37,37abcd
CPAC-ES4-239	29,7ab	40,68abcd
CPAC-ERE-476	29,74ab	43,46abc
CPAC-EC4-325	40,12a	48,75 ab
BRS Gigante Amarelo	34,33ab	49,6ab
CPAC-EC4-124	30,05ab	52,25a
CPAC-EC5-356	37,8a	53,21a
CPAC-ES4-138	40,1a	53,52a

As medias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Os genótipos CPAC-EC4-121, BRS Rubi do Cerrado e CPAC-EC4-128, apresentaram menor suscetibilidade à antracnose com médias de comprimento de lesão estatisticamente iguais às obtidas pelo *P. maliformes* aos 7 e 14 dias após a inoculação. Os genótipos CPAC –

EC4-121 e CPAC-EC4-128 foram originados da hibridação interespecífica entre *P. caerulea* x *P. edulis*, estando na geração 4 de retrocruzamentos. Estas matrizes foram selecionados e estão sendo utilizadas na obtenção de híbridos no programa de melhoramento genético do maracujazeiro da Embrapa Cerrados. Estas matrizes têm apresentado resistência a doenças e coloração de polpa mais forte (FUHRMANN, 2011). Faleiro et al. (2007) relatam o sucesso do programa de retrocruzamentos com a melhoria no nível de resistência, sem queda expressiva da produtividade de plantas retrocruzadas, advindas do cruzamento interespecífico entre *P. edulis* e *P. caerulea*.

Entre as cultivares comerciais analisadas, a cultivar BRS Rubi do Cerrado, apresentou-se mais resistente, com menor comprimento de lesão em relação a cultivar BRS Gigante Amarelo aos 7 e aos 14 dias de avaliação. Esse mesmo resultado foi verificado em capítulo anterior, onde cultivares de maracujazeiro azedo foram avaliados quanto à resistência à antracnose. FUHRMANN (2011) avaliou frutos de progênies de híbridos intra e interespecíficos de maracujazeiro à antracnose em condições de campo e não encontrou diferenças significativas entre as progênies avaliadas, entretanto verificou que a cultivar BRS Gigante Amarelo apresentou-se como uma das mais suscetíveis à antracnose. BOUZA (2009), trabalhando com 24 progênies de maracujazeiro azedo, em condições de casa de vegetação, verificou que a cultivar BRS Gigante Amarelo apresentou-se como moderadamente resistente e as demais progênies como altamente suscetíveis. A cultivar BRS Rubi do Cerrado apresenta acessos silvestres de maracujá em sua base de cruzamento, sendo que a resistência a doenças foliares e a alta produtividade foram as características mais importantes que subsidiaram seu lançamento (Embrapa, 2013).

O maior comprimento de lesão foi verificado nas plantas das matrizes CPAC-ES4-138, CPAC-EC5-356 e CPAC-EC4-124 (53,52; 53,21 e 52,25 respectivamente), sendo considerados as mais suscetíveis. COLATTO (2010), trabalhando com 12 progênies de maracujazeiro azedo, em condições de casa de vegetação, verificou que as progênies foram altamente suscetíveis ao *C. gloesporioides*.

SOUSA (2009) trabalhou com progênies de maracujazeiro azedo em condições de casa de vegetação e verificou a alta suscetibilidade das progênies ao *C. gloesporioides*. MARTINS (2005) avaliou 72 progênies de maracujazeiro em condições de casa de vegetação, com o mesmo isolado de *Colletotrichum gloesporioides* utilizado neste trabalho e observou que 62 progênies foram classificadas como altamente suscetíveis, oito progênies como suscetíveis entre elas, Gigante amarelo e Rubi Gigante e duas progênies como moderadamente resistentes. MIRANDA (2004) avaliou a incidência e severidade de

antracnose em 15 progênies de maracujazeiro em condições de campo e classificou 14 progênies como moderadamente resistentes e uma como resistente. VILELLA (2013) avaliou 32 progênies de maracujazeiro amarelo a antracnose em condições de campo, verificou que apenas duas progênies apresentaram resistência a antracnose (EC-RAM e MAR 20#10). JUNQUEIRA *et al.* (2003) em trabalho realizado com 11 progênies de maracujazeiro, em condições de campo, não observaram resistência entre as progênies. Estes trabalhos evidenciam uma baixa variabilidade genética para resistência à antracnose dentro da espécie comercial *P. edulis*.

Os resultados desse trabalho evidenciam a melhoria do nível de resistência a doenças das plantas retrocruzadas em relação ao genitor recorrente, mostrando o potencial das espécies silvestres como fontes de resistência a doenças e para a ampliação da base genética do programa de melhoramento do maracujazeiro.

## 5.4 CONCLUSÕES

Diferentes níveis de resistência à antracnose foram observados entre as espécies, cultivares e matrizes obtidas por retrocruzamento.

O acesso da espécie silvestre *Passiflora maliformes* foi o que apresentou menores médias de comprimento de lesão aos 7 e 14 dias após a inoculação.

Os genótipos (matrizes) obtidos por retrocruzamentos CPAC-EC4-121 e CPAC-EC4-128 apresentaram resistência à antracnose com médias de comprimento de lesão estatisticamente iguais às obtidas pelo *P. maliformes* aos 7 e 14 dias após a inoculação, sendo materiais interessantes para o programa de melhoramento genético.

A cultivar BRS Rubi do Cerrado também apresentou resistência à antracnose com médias de comprimento de lesão estatisticamente iguais às obtidas pelo *P. maliformes* aos 7 e 14 dias após a inoculação, demonstrando que o lançamento de cultivares oriunda de cruzamento interespecífico tem aumentado a base genética para resistência a antracnose.

## 5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOUZA, R.B. Reação em progênies de maracujá-azedo à antracnose, septoriose, cladosporiose e bacteriose em condições de campo e casa de vegetação. 2009. 160p. **Dissertação** (Mestrado em Fitopatologia). Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

COLATTO, U.L.D. Reação de progênies de maracujazeiro azedo à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), à verrugose (*Cladosporium herbarum*) e à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*). 97p. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia). Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2004. 480p.

EMBRAPA. **Lançamento do híbrido de maracujazeiro azedo - BRS Rubi do Cerrado**, 2013. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/lancamentobrsrubidocerrado/>. Acesso em 12 de dezembro de 2013.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; JUNQUEIRA, K. P.; BELLON, G.; FONSECA, G. da; PEIXOTO, J. R. Cruzamentos inter-específicos e retrocruzamentos visando à resistência do maracujazeiro a doenças. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 4., 2007, São Lourenço. Anais. São Lourenço: **Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas**, 2007. 1 CD-ROM.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. Passion fruit (*Passiflora* spp.) improvement using wild species. In: MARIANTE, A.S.; SAMPAIO, M.J.A.; INGLIS, M.C.V. The state of Brazil's plant genetic resources. Second National Report. Conservation and Sustainable Utilization for food and agriculture. **Embrapa Technological Information**: Brasília, DF. 2009. pág 101-106.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; JUNQUEIRA, K.P.; BELLON, G.; FONSECA, K.G.; PEIXOTO, J.R. Cruzamentos inter-específicos e retrocruzamentos visando à resistência do maracujazeiro a doenças. In: **Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**, 4, 2007, São Lourenço. São Lourenço: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2007. CD-ROM. 4p.

FONSECA, K.G.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; PEIXOTO, J.R.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, E.C. Análise da recuperação do genoma recorrente em maracujazeiro-azedo com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 145-153. 2009.

FUHRMANN, E. Reação de híbridos interespecíficos de maracujazeiro à bacteriose e características físico-químicas de frutos. 2011. 95p. **Dissertação** (Mestrado Agronomia) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

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 maracujáazedo cultivadas sem agrotóxicos. **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. 2005. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças.

In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados. p. 81-108.

MARTINS, I. Reação de progênies de maracujazeiro-amarelo ao *Colletotrichum gloeosporioides* e biocontrole da antracnose com *Trichoderma* spp. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de Brasília. 2005, 137p.

MARTINS, I; PEIXOTO, J.R; JUNQUEIRA, N.T.V e MELLO, S. C. M. de. Reação de genótipos de maracujazeiro-amarelo ao *Colletotrichum gloeosporioides*. **Rev. Bras. Frutic.** [online]. 2008, vol.30, n.3, pp. 639-643. ISSN 0100-2945. doi: 10.1590/S0100-29452008000300013.

MIRANDA, H.A. Incidência e severidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Septoria passiflorae*, *Cladosporium herbarum* e *Passion Woodiness fruit virus* em genótipos de maracujazeiro azedo cultivados no Distrito Federal. Brasília, 2004. 87f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2004.

NASCIMENTO, W. O; TOMÉ, A T.; OLIVEIRA, M. S. P.; MÜLLER, C. H.; CARVALHO, J.E.U. Seleção de progênies de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) quanto à qualidade de frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 186-188, 2003.

PASCHOLATI, S.F. e LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência a doenças. In LUZ, W.C. da. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo, 1994. v2, p.1-52.

ROCHA, J.R.S.; OLIVEIRA, N.T. Controle biológico de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da antracnose do maracujazeiro (*P. edulis*) com *Trichoderma koningii*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal. v. 24, n. 3/4. p. 272-275, 1998.

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

SANTOS FILHO, H.P.; LARANJEIRA, F.F.; SANTOS, C.C.F.; BARBOSA, C.J. Doenças do maracujazeiro. In: LIMA, A.A.; CUNHA, M.A.P. (Ed.) **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004, p. 262-266.

SANTOS FILHO, H.P.; SANTOS C.C.F. Doenças causadas por fungos. In: SANTOS FILHO, H.P.; JUNQUEIRA, N.T.V. **Maracujá: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.12-21. (**Embrapa Informação Tecnológica. Série Frutas do Brasil, 32**).

SOUSA, M.A.F. Avaliação da produtividade, incidência, e severidade de doenças em frutos de 17 genótipos de maracujazeiro-amarelo, cultivados no Distrito Federal. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 120p, 2005.

SOUSA, M.A.F. Produtividade e reação de progênies de maracujazeiro azedo a doenças em campo e casa de vegetação. 248p. **Tese** (Doutorado em Fitopatologia). Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

VANCE,C.P.;KIRK,T.K.;SHERWOOD,R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review phytopathology**, Palo Alto, v.18, p.259-288,1980.

VILELA, M.S. Diversidade genética, produtividade e reação de progênies de maracujazeiro à doenças sob condições de campo Brasília,183 p. **Tese de Doutorado** (Dr) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

## **CAPÍTULO 6**

### **RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS OBTIDOS POR RETROCRUZAMENTOS E DE CULTIVARES DE MARACUJAZEIRO AZEDO À BACTERIOSE EM CASA DE VEGETAÇÃO**

### **RESISTANCE OF PASSIONFRUIT GENOTYPES OBTAINED BY BACKCROSSING AND PASSIONFRUIT CULTIVARS TO BACTERIAL DISEASE OF SOUR PASSION FRUIT IN GREENHOUSE CONDITIONS**

# RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS OBTIDOS POR RETROCRUZAMENTOS E DE CULTIVARES DE MARACUJAZEIRO AZEDO À BACTERIOSE EM CASA DE VEGETAÇÃO

## RESUMO

O controle eficiente da bacteriose do maracujazeiro envolve métodos integrados com ênfase na resistência genética. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a resistência de genótipos obtidos por retrocruzamento e cultivares de maracujazeiro azedo à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*) em condições de casa de vegetação. Foram avaliadas progênies de dez genótipos obtidos por retrocruzamento e as cultivares BRS Gigante Amarelo e BRS Rubi do Cerrado. Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados com 6 repetições, sendo cada repetição representada pela média de 12 lesões avaliadas em 3 plantas. A inoculação foi realizada em plantas com 60 dias após o plantio, com suspensão do isolado na concentração de  $10^8$  UFC/ml. A área lesionada média, a área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL) e a porcentagem de folhas caídas foram avaliadas aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação. Foram realizadas análises de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. A cultivar BRS Rubi do Cerrado foi a mais resistente a bacteriose, e a cultivar BRS Gigante Amarelo foi a mais suscetível. Entre os genótipos obtidos por retrocruzamentos, merecem destaque o CPAC-EC4-223, CPAC-ES4-239, CPAC-EC4-325, CPAC-EC4-124 e CPAC-ERE-476 que apresentaram níveis de resistência iguais à cultivar BRS Rubi do Cerrado em pelo menos uma das características avaliadas.

**Palavras chaves:** *Xanthomonas axonopodis*, *Passiflora edulis*, melhoramento genético.

# RESISTANCE OF PASSIONFRUIT GENOTYPES OBTAINED BY BACKCROSSING AND PASSIONFRUIT CULTIVARS TO BACTERIAL DISEASE OF SOUR PASSION FRUIT IN GREENHOUSE CONDITIONS

## ABSTRACT

Efficient control of bacterial disease in passionfruit involves integrated methods with emphasis on genetic resistance . The study aims to evaluate the bacterial disease resistance of genotypes obtained from backcrossing breeding program and passionfruit cultivars under controlled greenhouse conditions. Ten genotypes progenies obtained by backcrossing and two cultivars (BRS Gigante Amarelo e BRS Rubi do Cerrado were evaluated). It was used a randomized block design with 6 replications. Each replication was represented by 12 lesions assessed in 3 plants. The inoculation was done in hurted plant leaves of 60 days old using a concentration of  $10^8$  CFU / ml. The lesioned area , area under the progress curve of the lesion (AUPCL) and percentage of fallen leaves were evaluated 7, 14 and 21 days after the inoculation. Variance analysis were performed and the means were compared by Tukey test at 5% significance level. BRS Rubi do Cerrado Cerrado cultivar was the most resistant to bacterial disease and BRS Gigante Amarelo was the most susceptible. Among the genotypes obtained by backcrossing, CPAC-EC4-223, CPAC-ES4-239, CPAC-EC4-325, CPAC-EC4-124 e CPAC-ERE-476 showed the same resistance level of the BRS Rubi do Cerrado Cerrado in at least one of the characteristic analyzed.

**Keywords:** *Xanthomonas axonopodis*, *Passiflora edulis*, genetic resistance.

## 6.1 INTRODUÇÃO

O Brasil abriga o centro de diversidade genética do gênero *Passiflora*. O País destaca-se como o maior produtor mundial de maracujá devido às excelentes condições edafoclimáticas para o seu cultivo e à crescente evolução da área de plantio. Com a expansão da cultura, muitas doenças apareceram e se tornaram limitantes ao seu cultivo. Dentre essas doenças, a bacteriose do maracujazeiro, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* é uma das principais doenças dessa cultura (SANTOS FILHO et al., 2004; KIMATI et al., 2005)

A doença afeta a parte aérea da planta e se torna mais grave quando as plantas são expostas a altas temperaturas e umidade elevada. Os sintomas foliares iniciam-se nas bordas do limbo e a infecção pode avançar através das nervuras, evoluindo para o pecíolo, até atingir os vasos dos caules mais finos, o que provoca caneluras longitudinais e a seca dos órgãos. Conseqüentemente, ocorre intensa desfolha e a morte prematura da planta. A bacteriose do maracujazeiro é muito severa, dada a dificuldade de controle e a falta de opções de produtos químicos curativos registrados com viabilidade econômica e ambientalmente (TORRES e PONTES, 1994; VIANA et al., 2003).

A recomendação para controle da bacteriose do maracujazeiro envolve um manejo integrado de métodos culturais para redução da fonte de inóculo e melhoria nutricional da planta, produtos químicos preventivos em áreas com histórico da doença, indutores de resistência e uso de cultivares com maiores níveis de resistência genética (JUNQUEIRA et al., 2011). A resistência genética é o método mais eficiente, econômico e ecologicamente correto para o controle desta doença, e a identificação de fontes de resistência é uma importante demanda para as pesquisas (FALEIRO et al., 2006) e a primeira etapa quando se pensa na obtenção da resistência genética via programas de melhoramento genético (FALEIRO et al., 2005). A utilização de cultivares resistentes é uma alternativa simples e efetiva no controle de doenças. Recentemente, vários trabalhos com melhoramento de plantas de maracujazeiro visando à resistência à bacteriose têm sido realizados por diferentes grupos de pesquisa. No entanto, ainda não existe cultivar imune à doença (VIANA, 2007, HALFELD-VIEIRA, 2009, BOUZA, 2009, FUHRMANN 2011, VILLELA, 2012).

O desenvolvimento de cultivares com maior nível de resistência é bastante desafiador e o uso de espécies silvestres do gênero *Passiflora* têm sido utilizado com sucesso no desenvolvimento de híbridos interespecíficos com a espécie comercial *P. edulis* visando a incorporação de genes de resistência a doenças e outras características de interesse (JUNQUEIRA et al., 2008, JUNQUEIRA et al., 2005, JUNQUEIRA et al., 2006). O método

dos retrocruzamentos tem sido utilizado com sucesso para transferir genes de resistência a doenças de espécies silvestres para espécies comerciais de maracujá (FALEIRO et al., 2006, FONSECA et al., 2009, FUHRMANN, 2011).

Neste trabalho, objetivou-se avaliar genótipos obtidos por retrocruzamento e cultivares de maracujazeiro azedo à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*) em condições de casa de vegetação.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação (20-30 °C e UR 70-90%) da Embrapa Cerrados, localizada em Planaltina, DF, 15°39'84'' de latitude S e 47°44'41'' de longitude W, altitude de 1.000 m. Foram avaliados dez genótipos (matrizes) obtidos por retrocruzamento de maracujá e duas cultivares BRS Gigante Amarelo e BRS Rubi do Cerrado (Tabela 1) à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis*). As mudas de genótipo (matriz) foram produzidas a partir de sementes (famílias de meio-irmãos) e as mudas das cultivares obtidas de sementes comerciais. Semeadas em bandejas de poliestireno estendido de 72 células, preenchidas com substrato (120 ml/célula) a base de vermiculita e casca de *Pinus* sp. (Plantmax<sup>®</sup>). Cada genótipo foi avaliado a partir de sua progênie (Família de meio-irmão).

Para a obtenção da fonte de inóculo, colônias puras do isolado CPAC-Planaltina obtido por Junqueira (2010) foram transferidas para tubos de plástico com fundo cônico contendo 15 ml de meio nutritivo e crescidas por 16 horas a 28 °C sob agitação de 300 rpm. A suspensão foi centrifugada por 20 minutos e o sedimentado resultante foi ressuspendido em água destilada e teve sua concentração ajustada em espectrofotômetro a uma densidade óptica de 0,323 A<sub>550</sub> (10<sup>8</sup> ufc/ml), pré-determinada por meio de curva de calibração.

**Tabela 1-** Genótipos (matrizes) de maracujazeiros resultantes do processo de retrocruzamento e cultivares utilizadas no estudo e suas respectivas origens. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.

Genótipos (matrizes)	Origem dos genótipos(matrizes)
CPAC-ERE-476	<i>P. edulis</i> “flavicarpa” x <i>P. edulis</i> “roxo” silvestre
CPAC-EC4-121	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
CPAC-EC4-124	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
CPAC-EC4-223	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
CPAC-EC4-325	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
CPAC-ERE-575	<i>P. edulis</i> “flavicarpa” x <i>P. edulis</i> “roxo” silvestre
CPAC-ES4-239	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
CPAC-EC4-128	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
CPAC-EC5-356	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)
CPAC-ES4-138	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
BRS Gigante Amarelo	<i>Passiflora edulis</i> Sims
BRS Rubi do Cerrado	<i>Passiflora edulis</i> Sims

Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com 6 repetições, onde cada repetição foi representada pela média de 12 lesões avaliadas em 3 plantas. As plantas foram inoculadas 60 dias após a germinação. Foram inoculadas duas folhas, completamente desenvolvidas, de cada planta. Na parte mediana da folha, lateralmente à nervura central, foram feitos dois orifícios de 3 mm de diâmetro com o auxílio de um furador de couro adaptado (JUNQUEIRA, 2010) o qual foi previamente imerso na suspensão bacteriana. Os orifícios foram feitos na segunda e terceira folhas, a partir do ápice, sendo um furo em cada parte do limbo foliar, totalizando quatro furos por planta. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas. Em seguida, as plantas permaneceram em casa de vegetação ( $18 \pm 3$  °C à noite,  $25 \pm 3$  °C durante o dia e 90%-95% UR).

Os sintomas foram avaliados aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação, medindo-se o diâmetro transversal e longitudinal das lesões formadas em torno do orifício circular com o auxílio de um paquímetro digital e calculando-se a área média lesionada (AML) e área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL). A AML foi calculada pela fórmula  $AML = \pi r^2$  (sendo o raio calculado pela metade da média dos diâmetros transversal e longitudinal das lesões) e a área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL) foi obtida conforme modelo matemático proposto por Campbell e Madden (1990):

$$AACPL = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} x (T_{i-1} - T_i)$$

Em que:

AACPL: área abaixo da curva de progresso da lesão;

$Y_i$  = proporção da doença na  $i$ -ésima observação;

$T_i$  = tempo em dias na  $i$ -ésima observação;

$n$  = número total de observações;

Aos 21 dias após a inoculação, foi realizada a contagem total de folhas em cada plantas e o número de folhas caídas, calculando-se a porcentagem de folhas que caíram de cada tratamento.

Foram realizadas análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2004).

### 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas diferenças significativas pelo teste F, a 1% de probabilidade para quatro das cinco características avaliadas (área lesionada média aos 14 dias, área lesionada média aos 21 dias e área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL) e % de folhas caídas) (Tabela 2). Os coeficientes de variação para as características avaliadas variaram de 21,44% a 44,29%. As características ALM aos 21 dias e a AACPL tiveram as estimativas de coeficiente de determinação superiores a 80%. A menor estimativa do coeficiente de determinação de 22,82% foi obtida para a característica ALM aos 7 dias de avaliação. Estimativas altas de coeficiente de determinação evidenciam a acurácia da avaliação, de modo que a característica ALM aos 7 dias, não foi adequada para a avaliação do nível de resistência dos materiais quanto à resistência à bacteriose. Aos 7 dias após a inoculação, o desenvolvimento da lesão foi insuficiente para a diferenciação dos materiais.

**Tabela 2-** Resumo da análise de variância e valores de probabilidade relativos aos efeitos de genótipos na área lesionada média (ALM) avaliada aos 7, 14 e 21 dias, área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL), e porcentagem de folhas caídas. UnB/Embrapa Cerrados, Brasília, DF, 2014.

Fonte de variação	Caracteres avaliados				
	ALM(mm <sup>2</sup> ) 7 dias	ALM(mm <sup>2</sup> ) 14 dias	ALM(mm <sup>2</sup> ) 21 dias	AACPL	% Folhas caídas
Genótipos (G)	25,16ns	0,27**	0**	0**	0,61**
Média	25,37	543,63	870,67	7030,39	67,84
CV (%)	38,71	42,06	44,29	35,39	21,44
Mínimo	5,15	7,55	73,49	361,7	34,5
Máxima	60,1	1170,8	2289,87	16274,56	100
Coeficiente de Determinação (%)	22,82	67,54	83,69	81,57	63,96

A análise da ALM aos 14 dias, mostra que a cultivar BRS Rubi do Cerrado, apresentou a menor área lesionada média (143,73mm<sup>2</sup>) e a matriz CPAC-EC4-121 apresentou a maior ALM (703,51 mm<sup>2</sup>). As AML aos 14 dias das matrizes CPAC-EC4-124, CPAC-EC4-223, CPAC-ES4-239 e CPAC-ERE-476 não diferiram do padrão de resistência (cultivar BRS Rubi do Cerrado). Aos 21 dias a cultivar BRS Rubi do Cerrado também apresentou a menor média de ALM (168,23 mm<sup>2</sup>) e a cultivar BRS Gigante Amarelo a maior de 1577 mm<sup>2</sup>. Entre as matrizes avaliadas destaque para a CPAC-EC4-223, CPAC-EC4-325, CPAC-ES4-239, CPAC-ERE- 476, CPAC-EC4-121, CPAC-EC4-124, CPAC-EC4-128 que apresentaram médias de lesão estatisticamente iguais ao BRS Rubi do Cerrado.

**Tabela 3-** Médias da área lesionada média (ALM) avaliadas aos 14 e 21 dias após inoculação de *X. axonopodis* , área abaixo da curva de progresso da lesão (AACPL) e porcentagem de folhas caídas de 10 matrizes e 2 cultivares de maracujazeiro azedo. UnB/Embrapa Cerrados, Brasília, DF, 2014.

Genótipos	Características Avaliadas			
	ALM(mm <sup>2</sup> )	ALM(mm <sup>2</sup> )	AACPL	% de Folhas caídas
	14 dias	21 dias		
BRS Rubi do Cerrado	143,7b	168,2d	1709,3c	87,4a
CPAC-ERE-476	529,8ab	754,5bcd	6541,3a	61,5ab
CPAC-EC4-121	703,5a	818,5bcd	8007,2a	58b
CPAC-EC4-124	327,7ab	753,4bcd	5088,8	73,3ab
CPAC-EC4-223	480,5ab	607,5cd	5653,1	61,6ab
CPAC-EC4-325	599,8a	693,0cd	6778,8a	72,0ab
CPAC-ERE-575	657,6a	1454,6ab	9895,5a	50,7b
CPAC-ES4-239	518,1ab	623,4cd	5956,5a	71,8ab
CPAC-EC4-128	615,1a	751,9bcd	7102,7a	72,2ab
CPAC-EC5-356	652,8a	1069,0abc	8515,6a	71,4ab
BRS Gigante Amarelo	690,5a	1577,5a	10569,	72,6ab
CPAC-ES4-138	603,9a	1176,0abc	8545,8a	59ab

As medias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Considerando a AACPL, a cultivar BRS Rubi do Cerrado também apresentou-se mais resistente entre os materiais genéticos estudados com valor de 1709,38. Este maior nível de resistência desta cultivar à bacteriose também foi observado por VILLELA (2012), que testou cinco cultivares de maracujazeiro azedo a três isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae* e verificou que a cultivar BRS Rubi do Cerrado apresentou os menores valores de AACPL para todos os isolados testados.

Dentre as matrizes obtidas por retrocruzamento, merecem destaque a CPAC-EC4-124, CPAC-EC4-223, CPAC-ES4-239 e CPAC-ERE-476, que não diferiram estatisticamente do BRS Rubi do Cerrado e apresentaram médias de AACPL de 5088,85, 5653,17 , 5956,53,

6541,3) respectivamente. FUHRMANN (2011) também verificou valores de AACPL intermediário em progênies de retrocruzamentos. A progênie CPAC-ERE (*P. edulis* "flavicarpa" x *P. edulis* 'roxo silvestre'), apresentou menor incidência de bacteriose. No desenvolvimento da cultivar BRS Rubi do Cerrado, acessos de *P. edulis* roxo silvestre foram utilizados na base dos cruzamentos (Embrapa Cerrados, 2012). Verifica-se a importância desses acessos e espécies silvestres na base de cruzamentos como fontes de resistência à bacteriose para os programas de melhoramento genético do maracujazeiro azedo.

Ainda com relação à AACPL, verifica-se que a cultivar BRS Gigante Amarelo apresentou maior média dentre os materiais genéticos estudados, com valor de 10569,92. Esse alto valor de AACPL para a cultivar BRS Gigante Amarelo também foi verificado por Junqueira (2010), Fuhrmann (2011) e Villela (2012), que trabalharam com o mesmo isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e a mesma metodologia de inoculação usada neste trabalho. Nos trabalhos de JUNQUEIRA (2010) e FUHRMANN (2011), a cultivar BRS Gigante Amarelo foi comparada com outras espécies do gênero *Passiflora* e híbridos interespecíficos. Em análises envolvendo apenas cultivares de maracujazeiro azedo, JUNQUEIRA et al. (2003), NASCIMENTO (2003) e SOUZA (2005), não constataram graus de resistência que pudessem oferecer resultados satisfatórios no controle da doença.

Em contraponto, alguns autores têm verificado variabilidade genética para resistência à bacteriose dentro da espécie *P. edulis*. MIRANDA (2004) comparou a resistência à bacteriose em nove seleções comerciais de maracujazeiro azedo e verificou diferenças significativas entre elas, a partir da inoculação foliar do patógeno. SUASSUNA (2004) testou 33 materiais de maracujá azedo em inoculação artificial foliar por ferimento e observou alta variabilidade entre acessos quanto à resistência a bacteriose. KOSOSKI et al. (2008), BOUSA (2009) e SOUSA (2009) também verificaram diferenças de suscetibilidade entre genótipos e seleções de maracujazeiro azedo. WENDLAND et al. (1998) trabalharam com diferentes genótipos de maracujazeiro azedo e com base em escala de notas de severidade, verificaram uma grande variabilidade entre os materiais avaliados, indicando a possibilidade de obtenção de genótipos comerciais de maracujazeiro com desejados níveis de resistência a bacteriose. BERIAM et al. (2000) avaliaram três híbridos comerciais de maracujazeiro-azedo desenvolvidos pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), denominados IAC-273, IAC-275 e IAC-277. Os autores encontraram diferenças significativas na resistência dos híbridos.

Em relação à porcentagem de folhas caídas, verificamos que BRS Rubi do Cerrado, apresentou a maior porcentagem de 87,46%. Esse caráter avaliado pode estar relacionado a reação de hipersensibilidade. De acordo com Medeiros et al. (2003), a reação de hipersensibilidade é um tipo de defesa bioquímica induzida como resposta ao ataque do

patógeno à planta, e consiste em morte rápida de células do hospedeiro adjacentes ao local da penetração, privando o patógeno de nutrientes e impedindo sua propagação. Algumas respostas bioquímicas de reação de hipersensibilidade se mostram semelhantes àquelas que ocorrem após injúria mecânica, senescência ou estresse. Como as mudas utilizadas para inoculação apresentavam um estágio jovem (60 dias), foi descartada a hipótese de que tenha ocorrido senescência, bem como não foi verificado estresse. Em relação a metodologia de inoculação utilizada, poderia ser considerado um fator de injúria mecânica, porém todas as plantas receberam a mesma metodologia de inoculação, e verificaram-se diferenças entre os materiais estudados. Assim podemos dizer que a cultivar BRS Rubi do Cerrado, possivelmente apresentou uma resposta de defesa ao patógeno diferenciada. Os mecanismos de defesa de uma planta podem ser estruturais e bioquímicos, ambos pré e/ou pós-formados em relação à tentativa de penetração do patógeno no hospedeiro. Os mecanismos estruturais constituem-se em barreiras físicas à penetração e/ou colonização do patógeno, enquanto que os mecanismos bioquímicos englobam substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sobrevivência nos tecidos do hospedeiro, devendo estar presentes em concentração adequada nas partes invadidas e em forma acessível ao patógeno, de tal maneira que mudanças na concentração da(s) substância(s) impliquem em mudanças na expressão da doença (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Com base nos resultados apresentados e nos trabalhos de avaliação de resistência do maracujazeiro azedo à bacteriose, pode-se verificar que existe variabilidade genética para resistência à bacteriose entre diferentes espécies do gênero *Passiflora* e dentro da espécie *P. edulis* Sims, contudo a variabilidade genética intra-específica é mais baixa e ainda não existem cultivares com imunidade à bacteriose. Por esse motivo, o desenvolvimento de híbridos intraespecíficos e populações de retrocruzamentos pode ser uma importante estratégia para o desenvolvimento de novas cultivares com maior nível de resistência à bacteriose. Essa variabilidade deve ser aproveitada por meio de seleção e clonagem das plantas que se destacam dentro de cada população para compor, no futuro, um banco de matrizes que possam ser utilizadas como genitoras dentro do programa de melhoramento do maracujazeiro azedo.

## 6.4 CONCLUSÕES

Foram verificados diferentes níveis de resistência à bacteriose das cultivares e genótipos (matrizes) obtidos por retrocruzamentos.

Verificou-se que a cultivar BRS Rubi do Cerrado foi a mais resistente a bacteriose, e a cultivar BRS Gigante Amarelo foi a mais suscetível.

Entre os genótipos (matrizes) obtidos por retrocruzamentos, merecem destaque o CPAC-EC4-223, CPAC-ES4-239, CPAC-EC4-124 e CPAC-ERE-476 que apresentaram níveis de resistência iguais à cultivar BRS Rubi do Cerrado em relação a AACPL.

## 6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERIAM, L. O. S.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A. e MELETTI, L. M. M. Avaliação de resistência de híbridos de maracujazeiro-amarelo a *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. In: XXIII Congresso Paulista de Fitopatologia, 2000, Campinas, SP. **Summa Phytopathologica** 26:125-125. 2000.

BOUZA, R.B. Reação em progênies de maracujá-azedo à antracnose, septoriose, cladosporiose e bacteriose em condições de campo e casa de vegetação. 2009. 160p. **Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)**. Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

CAMPBELL, C. L. e MADDEN, L. V. **Introducyion to Plant Disease** Epidemiology. New York. John Wiley e Sons. 1990.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados as melhoramento genético**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2004. v. 1, 480 p.

EMBRAPA CERRADOS (2012) Memória do Lançamento do Híbrido de Maracujazeiro BRS Rubi do Cerrado Disponível em <http://www.snt.embrapa.br/publico/usuarios/produtos/253-Anexo1.PDF/> Acesso em: 25 maio 2013.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Importância e avanços do pré-melhoramento de Passiflora. In: LOPES, M. A.; FÁVERO, A. P.; FERREIRA, M. A. J. F.; FALEIRO, F. G. (Org.). **Curso Internacional de pré-melhoramento de plantas**. 1 ed. Brasília:Embrapa, 2006, p. 138-142.

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

FONSECA, K.G.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; PEIXOTO, J.R.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, E.C. Análise da recuperação do genoma recorrente em maracujazeiro-azedo com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 145-153. 2009.

FURMANN, E. Reação de híbridos interespecíficos de maracujazeiro à bacteriose e características físico-químicas de frutos. 2011. 95p. **Dissertação (Mestrado Agronomia)** Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

ISHIDA, A. K. N.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Mancha-bacteriana do maracujazeiro (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*): etiologia e estratégias de controle. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2009. 23p. (**Documentos/ Embrapa Amazônia Oriental**).

JUNQUEIRA, K.P., FALEIRO, F. G, UESUGI, C.H, JUNQUEIRA, N.T.V, BELLON, G, SANTOS, E. C DOS, e RAMOS, L.N. (2011). Desempenho agrônomico de maracujazeiros tratados com produtos alternativos e fertilizantes foliares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 33(1), 040-047. Epub March 11, 2011. Retrieved February 17, 2014, from [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010029452011000100006&lng=eetln&g=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010029452011000100006&lng=eetln&g=pt). 10.1590/S0100-29452011005000019.

- JUNQUEIRA, K. P. Resistência genética e induzida de maracujazeiro à bacteriose. 143p. Brasília, 2010. Tese (**Doutorado Fitopatologia**) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BELLON, G.; RAMOS, J. D.; BRAGA, M. F.; SOUZA, L. S. Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero passiflora por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2008. vol.30, n.1, Jaboticabal- SP.
- 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 maracujáazedo cultivadas sem agrotóxicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n.8, p.1005-1010, 2003.
- JUNQUEIRA, L.P.; JUNQUEIRA, N.T.V.; PEIXOTO, J.R.; ALENCAR, C.M.; VAZ, C.F.; LAGE, D.A.C. e BELLON, G. Efeito do gesso agrícola, pó de rocha silicatada e ferro EDTA no controle da bacteriose em maracujazeiro-azedo. Anais, 38º.Congresso **Brasileiro de Fitopatologia**, Brasília, DF. 2005. pp. 62. (Suplemento).
- JUNQUEIRA, N.T.V.;BRAGA, M.F; FALEIRO, F.G; PEIXOTO, J.R; Uso de espécie silvestres de Passiflora no pré melhoramento do maracujazeiro.**Curso internacional de pré-melhoramento de plantas**. Brasilia-DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006, p.133-137.
- KADO, C. L. e HESKETT, M. S. Selective media for isolation of Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas and Xanthomonas. **Phytopathology** 60: 969-976. 1970.
- KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. e CAMARGO, L. E. A. (Ed.). Manual de Fitopatologia. Doenças de plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, 2005.
- KOSOSKI, R. M.; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, N. T. V.; UESUGI, C. H.; MELO, B de. Reação de genótipos de maracujazeiro-azedo a *Xanthomonas campestris* pv. *Passiflora*, em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 24, n. 1, p. 60-66, 2008.
- LELLIOTT, R. A. e STEAD, D. E. Methods for the diagnosis of bacterial plant disease. Oxford, Blakwell **Scientific Publications**. 1987. 216p.
- MEDEIROS, R. B. de; FERREIRA, M. A. S. V.; DIANESE, J. C. **Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta - patógeno**. Brasília: Ed. da UnB, 2003. 289 p.
- MIRANDA, J. F. Reação de variedades de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) à bacteriose causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. Piracicaba, 2004. 48p. **Dissertação** (Mestrado Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2004.
- 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. 148f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia de Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2003.
- ROMEIRO, R. S. **Identificação de bactérias fitopatogênicas**. Viçosa, MG, UFV, Impr. Univ., 92p. 1976.

SANTOS FILHO, H. P.; LARANJEIRA, F. F.; SANTOS, C. C. F. e BARBOSA, C. J. Doenças do maracujazeiro. In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P., (Ed). Maracujá: produção e qualidade na passiflora. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. Pp. 239-280.

SCHAAD, N. W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 2 ed. St. Paul, Thr American Phytopathological Society, 157 p. 1988.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). *Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular*. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.227-248.

SOUSA, M.A.F. Produtividade e reação de progênies de maracujazeiro azedo a doenças em campo e casa de vegetação. 248p. **Tese** (Doutorado em Fitopatologia). Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

SOUSA, M. A. de F. Produtividade e reação a doenças em genótipos de maracujazeiro-azedo, cultivados no Distrito Federal. 2005. 138f. **Dissertação** (Mestrado Agronomia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2005.

SUASSANA, T. M. F. Seleção de maracujá amarelo para resistência ao crestamento bacteriano. 2004. 54p. **Tese** (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2004.

TORRES, F.J.; PONTES, J. Estudo sobre o controle da bacteriose ou “morte precoce” (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Fitopatologia Brasileira**, v.19, n.1, p. 233-236, 1976.

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

VIANA, F.M.P.; COSTA, A.F. Doenças do maracujazeiro. In: FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E.; VIANA, F.M.P. (Ed.) **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 270-291.

VILLELA, J. G. A. RESISTÊNCIA DE CULTIVARES COMERCIAIS DE MARACUJAZEIRO AZEDO A ISOLADOS DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* EM CONDIÇÕES CONTROLADAS DE CASA DE VEGETAÇÃO. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília; 2011. 36 p. **Monografia**.

WENDLAND, A.; LEITE JUNIOR, R. P. e EUNO, B. Avaliação do comportamento de genótipos de maracujazeiro amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa*) a bacteriose causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. **Fitopatologia Brasileira** 23:218. 1998.

## **CAPÍTULO 7**

**RESISTÊNCIA DE ESPÉCIES SILVESTRES DE MARACUJAZEIRO E  
GENÓTIPOS OBTIDOS POR RETROCRUZAMENTOS À VIROSE DO  
ENDURECIMENTO DOS FRUTOS**

**RESISTANCE OF WILD PASSION FRUIT SPECIES AND GENOTYPES  
OBTAINED BY BACKCROSSING THE FRUIT WOODINESS VIRUSES**

# RESISTÊNCIA DE ESPÉCIES SILVESTRES DE MARACUJAZEIRO E GENÓTIPOS OBTIDOS POR RETROCRUZAMENTOS À VIROSE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS

## RESUMO

O endurecimento dos frutos causado pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) é considerada a principal virose da cultura do maracujazeiro. A identificação de fontes de resistência é a etapa básica de todo programa de melhoramento genético. Nesse sentido, objetivou-se, avaliar a resistência de espécies silvestres de maracujazeiro e genótipos obtidos por retrocruzamento à virose do endurecimento dos frutos em condições de casa-de-vegetação. No estudo das espécies silvestres, utilizaram-se dez acessos de espécies silvestres e a cultivar BRS Sol do Cerrado. A inoculação foi realizada mecanicamente em 20 plantas de cada acesso. A avaliação da incidência da doença foi realizada 30 dias após a inoculação. Utilizou-se um isolado de CABMV do Distrito Federal. Considerando apenas a incidência no estudo das espécies silvestres, verificou-se que *P. misera* e *P. suberosa* foram aparentemente imunes ao vírus. Os acessos das espécies *Passiflora cerradense*, *P. coccinia* e *P. setacea* apresentaram resistência moderada com incidência de 10%, 25% e 30% respectivamente. No estudo dos genótipos obtidos por retrocruzamento, utilizaram-se 12 genótipos com o delineamento experimental em blocos casualizados, constituído por 5 blocos e 4 plantas por parcela. A inoculação foi realizada mecanicamente. A severidade da doença foi realizada com base em escala de notas, avaliada aos 30 e aos 45 dias após a inoculação. Foram avaliadas, além da incidência, a severidade da virose nas folhas, número de folhas com a nota 4 e porcentagem de folhas com nota 4. Nos genótipos obtidos por retrocruzamento observou-se uma incidência de 100%, porém diferentes níveis de resistência foram encontrados considerando a severidade da doença. As cultivares comerciais apresentaram maior severidade da doença quando comparadas com os genótipos obtidos por retrocruzamentos.

**Palavras chave:** *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, *Passiflora*, virose, Resistência genética

## RESISTANCE OF WILD PASSION FRUIT SPECIES AND GENOTYPES OBTAINED BY BACKCROSSING THE FRUIT WOODINESS VIRUSES

### ABSTRACT

The woodiness of the fruit caused by Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is considered the main viruses of yellow passion fruit. The identification of resistance sources is the basic step of any breeding program. The objective of this work was to evaluate the resistance of accessions of wild species of passion fruit and backcrossing genotypes to the CABMV in green house conditions. It was evaluated ten accessions of wild species and a BRS Sol do Cerrado commercial hybrid as reference. Inoculation was performed mechanically in 20 plants of each accession. Disease incidence was evaluated 30 days after inoculation. A CABMV isolate from Federal District was used. Considering only the disease incidence, *P. misera* and *P. suberosa* were apparently immune to the virus. *Passiflora cerradence*, *P. coccinia* and *P. setacea* showed moderate resistance with an disease incidence of 10% , 25% and 30% respectively. In the study of backcrossing breeding, 12 genotypes were evaluated in randomized blocks experimental design, consisting of 5 blocks and 4 plants per plot. The inoculation was done mechanically. Disease severity was based on grading scale evaluated at 30 and 45 days after inoculation. The following characteristics were evaluated: total number of leaves, mean of severity note on the leaves, leaf number with note 4 , percentage of leaves with note 4 and disease incidence . The genotypes obtained by backcrossing showed a 100% incidence , but different resistance levels were found considering the disease severity. The cultivars showed higher disease severity compared with the genotypes obtained by backcrossing.

**Keywords:** *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, *Passiflora*, viruses, genetic resistance

## 7.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o maior produtor e consumidor mundial de maracujá-azedo, com 923.035 toneladas numa área aproximada de 61.842 hectares em 2010, o que ressalta o potencial produtivo e indica a importância do cultivo dessa fruteira para a economia do País (IBGE, 2013). No entanto, o rendimento médio das plantas de maracujá no Brasil de aproximadamente 14 ton ha<sup>-1</sup> ainda é considerado baixo, considerando o potencial produtivo da cultura que é superior a 50 ton ha<sup>-1</sup> (FALEIRO et al., 2008).

A ocorrência de doenças nessa cultura é um dos principais fatores que tem contribuído para redução na produtividade e qualidade dos frutos (PIMENTEL et al., 2008; CERQUEIRA-SILVA et al., 2008). O maracujazeiro é atacado por diversos fungos, bactérias e vários vírus, entre os quais o causador da virose do endurecimento dos frutos que é considerada uma doença de elevada importância econômica na cultura do maracujazeiro. O agente causal frequentemente relatado no Brasil é o *Passionfruit woodiness virus* (PWV), entretanto estudos de caracterização molecular, indicou elevada similaridade com isolados do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (NASCIMENTO et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2006; CERQUEIRA-SILVA et al., 2008), sugerindo a prevalência desse vírus no Brasil. Internacionalmente é aceito que o vírus do endurecimento dos frutos seja causado por PWV ou CABMV (VAN REGENMORTEL et al., 2000; ALFENAS et al., 2005).

O vírus pode ser transmitido por várias espécies de afídeos (*Aphis fabae* Scopoli, *Aphis nerii* Boyer de Fonscolombe, *Aphis gossypii* Glover, *Myzus nicotianae* Blackman e *Myzus persicae* Sulzer), além de ser facilmente transmitidos via extrato foliar tamponado e por enxertia (ZERBINI et al., 2005; DI PIERO et al., 2006). Plantas infectadas apresentam mosaico foliar, que pode ser acompanhado ou não de bolhosidade e deformação. Os frutos podem apresentar-se deformados, pequenos e duros, ocorre redução significativa da área foliar e do peso da parte aérea e do sistema radicular da planta.

A identificação de fontes de resistência é a etapa básica de todo programa de melhoramento genético. A base genética das cultivares comerciais de maracujazeiro-azedo é relativamente estreita (JUNQUEIRA et al., 2003) e para ampliar essa base genética, espécies silvestres de maracujá têm sido utilizadas com sucesso em programas de melhoramento genético (FALEIRO e JUNQUEIRA, 2009). A transferência de genes de resistência de espécies silvestres para as comerciais tem sido feita, por meio de hibridações interespecíficas seguidas de um programa de retrocruzamentos auxiliados por marcadores moleculares (FALEIRO et al., 2008; FALEIRO e JUNQUEIRA, 2009, FONSECA et al., 2009).

Neste trabalho, objetivou-se avaliar a resistência de espécies silvestres de maracujazeiro e de genótipos obtidos por hibridação interespecífica seguida de retrocruzamento ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) em casa de vegetação, visando a identificação de genótipos com maiores níveis de resistência ao vírus para uso per si ou como parentais no programa de melhoramento do maracujazeiro azedo.

## 7.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 7.2.1 Avaliação da reação do vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) em espécies silvestres de maracujazeiro.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação (20-30 °C e UR 70-90%) da Embrapa Cerrados, localizada em Planaltina, DF, 15°39'84'' de latitude S e 47°44'41'' de longitude W, altitude de 1.000 m. Foram avaliados onze acessos de espécies de maracujá (Tabela 1), sendo que a cultivar BRS Sol do Cerrado da espécie comercial *Passiflora edulis* Sims., foi utilizada como padrão de suscetibilidade.

**Tabela 1-** Reação de espécies silvestres de maracujazeiro ao vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), em casa de vegetação. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.

Nº Acessos	Acessos de <i>Passiflora</i>	Código dos acessos( BAG)
1	<i>Passiflora suberosa</i> Mast.	CPAC MJ-35-01
2	<i>Passiflora misera</i> HBK.	CPAC MJ-37-01
3	<i>Passiflora cerradense</i> Sacco	CPAC MJ-45-01
4	<i>Passiflora coccinia</i> Mast.	CPAC MJ-08-05
5	<i>Passiflora setacea</i> DC.	CPAC MJ-12-04
6	<i>Passiflora quadrangularis</i>	CPAC MJ-07-01
7	<i>Passiflora edulis</i> Sims 'roxo	CPAC MJ-21-03
8	<i>Passiflora cincinata</i> Mast.	CPAC MJ-26-01
9	<i>Passiflora alata</i> Curtis.	CPAC MJ-02-02
10	<i>Passiflora nitida</i> Kunth.	CPAC MJ-01-01
11	BRS Sol do cerrado	BRS Sol do Cerrado

A produção de mudas de cada espécie foi feita a partir de sementes em bandejas de poliestireno estendido de 72 células, preenchidas com substrato (120 ml/célula) a base de vermiculita e casca de *Pinus* sp. (Plantmax®). Após 30 dias da germinação das sementes, as mudas foram transplantadas para sacos plásticos, com capacidade de 3 litros, de uma mistura de terra, areia, esterco de gado, super triplo, KCl, FTE BR12 e Calcário. Neste experimento, vinte plantas de cada acesso foram inoculadas aos 60 dias após a semeadura.

Utilizou-se um isolado de CABMV obtido no Distrito Federal mantido em plantas de maracujazeiro em casa de vegetação. Confirmou-se que o isolado tratava-se de CABMV pelo método sorológico de imunodifusão dupla em gel de agarose e Elisa Indireto (“enzyme-linked immunosorbent assay”) com anti-soro específico contra o CABMV, conforme descrito por ANJOS et al. (2002).

O inóculo para a transmissão mecânica foi preparado no almofariz através de maceração do material foliar infetado na proporção de 1 g de tecido (folha) para 10 ml de suspensão tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. Em seguida, adicionou-se pequena quantidade de “celite” (abrasivo) ao extrato obtido e o vírus foi inoculado, friccionando as partes superiores das folhas com o dedo, onde continha o extrato. Foram inoculadas três folhas por planta. Aproximadamente 10 minutos após a inoculação, as plantas foram lavadas, a fim de que o abrasivo não queimasse as folhas inoculadas.

A avaliação da infecção viral foi feita com base na incidência, ou seja, pela detecção da expressão dos sintomas do vírus em cada planta inoculada, quantificando a porcentagem de plantas com sintomas.

### **7.2.2 Avaliação do vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) em genótipos obtidos por retrocruzamentos**

O experimento também foi conduzido em casa de vegetação nas mesmas condições do experimento anterior. Os genótipos (Matrizes) utilizados neste trabalho foram obtidos a partir do programa de melhoramento genético do maracujazeiro realizado na Embrapa Cerrados visando à obtenção de variedades mais produtivas, com maior resistência a doenças e qualidade físico-química dos frutos.

A partir de seis progênes obtidas de diferentes gerações de retrocruzamentos entre o maracujazeiro comercial (*P. edulis*) com espécies silvestres *P. caerulea*, *P. edulis* “roxo silvestre” e *P. setacea* foram obtidas 315 plantas matrizes. Destas, 12 plantas (Genótipos) foram selecionadas para este trabalho baseada na maior resistência à bacteriose e coloração

de polpa mais intensa (avermelhada) (Tabela 2). Com exceção do BRS Rubi do Cerrado e BRS Gigante Amarelo, dos quais foram utilizadas sementes comerciais, frutos resultantes dos cruzamentos descritos na tabela 2 foram colhidos e as sementes, representando cada família de meio-irmãos, foram retiradas e semeadas em bandejas de poliestireno de 72 células, em ambiente com nebulização. Após 30 dias da germinação, as mudas foram transferidas para saquinhos com capacidade de 1 litro, constituídos de uma mistura de terra, areia, esterco de gado, Super Triplo, KCl, FTE BR12 e Calcário.

**Tabela 2-**Genótipos (matrizes) de maracujazeiros resultantes do processo de retrocruzamento e cultivares utilizadas no estudo e suas respectivas origens. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.

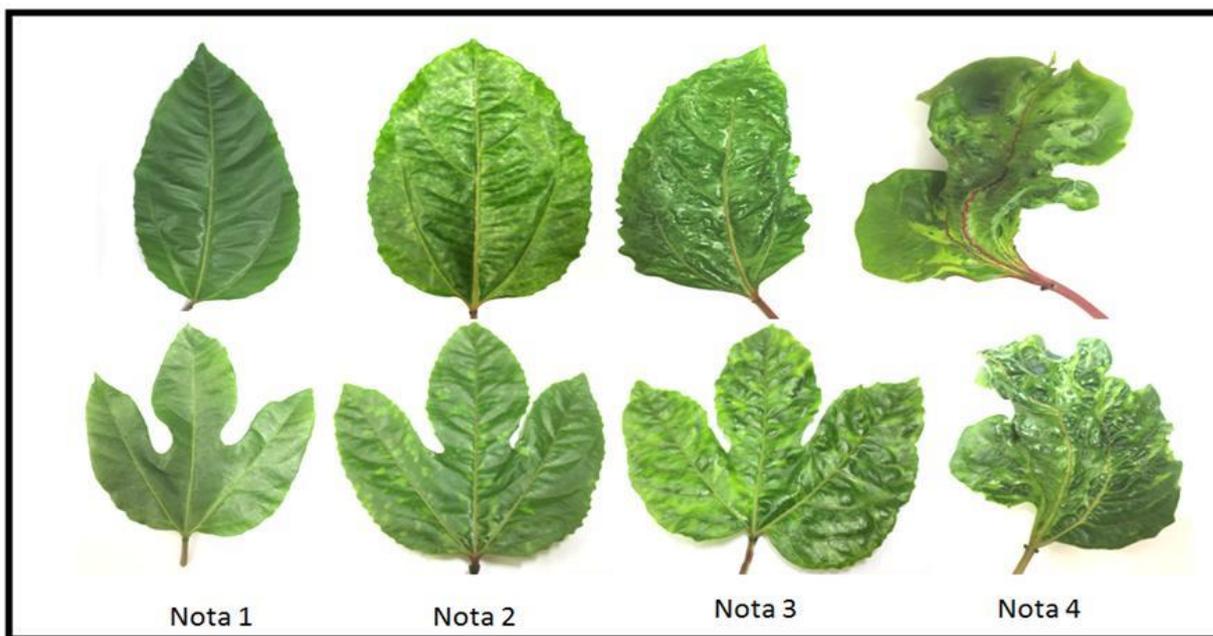
Genótipos (matrizes)	Origem dos genótipos (matrizes)
CPAC-ERE-476	<i>P. edulis</i> “flavicarpa” x <i>P. edulis</i> “roxo” silvestre
CPAC-EC4-121	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
CPAC-EC4-124	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
CPAC-EC4-223	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
CPAC-EC4-325	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
CPAC-ERE-575	<i>P. edulis</i> “flavicarpa” x <i>P. edulis</i> “roxo” silvestre
CPAC-ES4-239	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
CPAC-EC4-128	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
CPAC-EC5-356	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)
CPAC-ES4-138	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
BRS Gigante Amarelo	<i>Passiflora edulis</i> Sims
BRS Rubi do Cerrado	<i>Passiflora edulis</i> Sims

Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados, constituído por 5 blocos e 4 plantas por parcela. As plantas de cada genótipo foram inoculadas aos 60 dias após a semeadura. As avaliações de severidade da doença foram realizadas com base na escala de notas proposta por Junqueira et al.(2003), com modificações (Tabela 3, Figura 1).

**Tabela 3-** Escala de notas proposta por JUNQUEIRA et al. (2003) com modificações, utilizada para avaliação da severidade de virose em folhas de genótipos de maracujazeiro. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.

Nota	Descrição
1	Folhas sem sintomas de mosaico (R)*
2	Folhas com mosaico leve, sem deformações foliares (MS)*
3	Folhas com mosaico intenso e bolhas, sem deformações foliares (S)*
4	Folhas com mosaico intenso, redução do tamanho, bolhas e deformações foliares (AS)*

\*(R) Resistente, (MS) Medianamente susceptível, (S) Susceptível e (AS) Altamente susceptível



**Figura 1-** Escala de notas utilizado para avaliação da severidade da virose em plantas inoculadas com Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.

As plantas avaliadas foram marcadas com uma fita acima das folhas inoculadas, ponto em que se deu início a avaliação. Além da incidência da doença (% de plantas com sintomas), foram avaliadas as seguintes características: número total de folhas, média da nota de severidade da virose nas folhas, número de folhas com a nota 4 e porcentagem de folhas com

nota 4. Ambas as características foram avaliadas aos 30 e 45 dias após a inoculação. Foram realizadas análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan, ao nível de 1% de significância. Como subsídio adicional para a seleção dos genótipos com maior nível de resistência, o índice de seleção com base na soma de postos (ranks) proposto por Mulamba e Mock (1978) foi calculado com base no ranqueamento dos genótipos referente às características média da nota de severidade, número de folhas com nota 4 e porcentagem de folhas com nota 4 aos 30 e 45 dias.

### 7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os acessos das diferentes espécies de maracujazeiro silvestre apresentaram diferentes níveis de resistência à virose do endurecimento dos frutos. Na Tabela 4, verificamos que a incidência, ou seja, a porcentagem de plantas com expressão de sintomas do CABMV, variou de 0% a 100% em condições de casa de vegetação.

**Tabela 4-** Reação de espécies silvestres de maracujazeiro ao vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), em casa de vegetação. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2014.

Espécies silvestres	Código acessos BAG	Plantas inoculadas	Plantas com sintoma	% de plantas com sintomas	Nota média dos sintomas
<i>Passiflora suberosa</i> Mast.	CPAC MJ-35-01	20	0	0	-
<i>Passiflora misera</i> HBK.	CPAC MJ-37-01	20	0	0	-
<i>Passiflora cerradense</i> Sacco	CPAC MJ-45-01	20	2	10	2
<i>Passiflora coccinia</i> Mast.	CPAC MJ-08-05	20	5	25	2
<i>Passiflora setacea</i> DC.	CPAC MJ-12-04	20	6	30	2
<i>Passiflora quadrangularis</i> Linn.	CPAC MJ-07-01	20	16	80	3
<i>Passiflora edulis</i> Sims 'roxo	CPAC MJ-21-03	20	17	85	3
<i>Passiflora cincinnata</i> Mast.	CPAC MJ-26-01	20	18	90	2
<i>Passiflora alata</i> Curtis.	CPAC MJ-02-02	20	18	90	4
<i>Passiflora nitida</i> Kunth.	CPAC MJ-01-01	20	20	100	4
BRS Sol do cerrado	BRS Sol do Cerrado	20	20	100	4

A utilização de variáveis como incidência e severidade, utilizando método de escala de notas, tem sido bastante utilizada em trabalhos de melhoramento genético com a finalidade de identificar genótipos resistentes (COIMBRA, 2010). Considerando-se apenas a incidência, verificamos que *P. misera* e *P. suberosa* não apresentaram sintomas da doença. Este resultado corrobora com o estudo de Maciel et. al (2009). Estes autores realizaram um *screening* de 16

espécies de passifloras nativas e verificaram que *P. suberosa* foi imune a quatro isolados brasileiros do CABMV. Esse resultado abre a possibilidade de utilização dessas duas espécies (*P. misera* e *P. suberosa*) em cruzamentos com o maracujazeiro-azedo (*P. edulis*). Entretanto, até o momento, não foi obtido sucesso em cruzamentos interespecíficos de *P. edulis* com *P. suberosa* e *P. misera*, visto que essas espécies pertencem a diferentes subgêneros (*Passiflora* e *Decaloba*) e possuem números de cromossomos diferentes (OTONI et al., 1996; ULMER e MACDOUGAL, 2004).

Os acessos das espécies *Passiflora cerradense*, *P. coccinia* e *P. setacea* foram moderadamente resistentes com incidência de 10%, 25% e 30% respectivamente. Tais espécies silvestres são também boas fontes de resistência à virose com potencial uso em programas de melhoramento genético do maracujazeiro azedo. Dentro desta perspectiva, o programa de retrocruzamentos envolvendo a espécie comercial *P. edulis* e a espécie silvestre *P. setacea* tem sido conduzido com sucesso (FONSECA et al., 2009). Junqueira et al. (2005; 2006) citam várias espécies silvestres de maracujá com resistência a doenças e potencial de utilização em programas de melhoramento genético. Dentre as espécies indicadas como potenciais fontes de resistência a diferentes doenças, são citadas *P. cincinnata*, *P. caerulea*, *P. incarnata*, *P. maliformes*, *P. foetida*, *P. nitida*, *P. quadrangularis* e *P. setacea*. Híbridizações interespecíficas envolvendo tais espécies silvestres têm sido realizadas com sucesso (JUNQUEIRA et al., 2008).

No caso da virose, os acessos das espécies *P. quadrangularis*, *P. edulis* 'roxo silvestre', *P. cincinnata*, *P. alata*, *P. nitida* e a cultivar de *P. edulis* BRS Sol do Cerrado, foram suscetíveis com incidência acima de 80% (Tabela 3). É importante considerar que pode haver variabilidade genética intraespecífica para resistência à virose, ou seja, diferentes acessos de uma espécie podem ter diferentes níveis de resistência. Esta consideração é corroborada com os diferentes níveis de incidência à virose obtidos pelo acesso 'roxo silvestre' (85%) e a cultivar BRS Sol do Cerrado (100%) da espécie *P. edulis*.

Em diferentes estudos realizados com cultivares comerciais de maracujazeiro-azedo *P. edulis*, não foram constatados níveis de resistência que pudessem oferecer resultados satisfatórios no controle da virose (JUNQUEIRA et al., 2003; LEÃO et al., 2006; PINTO et al., 2008). Esses autores verificaram que a variabilidade dentro das cultivares comerciais estudadas para resistência a virose é muito baixa, ressaltando a importância de trabalhos de melhoramento que visem à introgressão de genes de resistência de espécies silvestres nas cultivares de maracujazeiro-azedo.

A análise do nível de resistência dos genótipos obtidos por retrocruzamentos com base na incidência da virose não mostrou diferenças entre eles, ou seja, todos apresentaram 100% de incidência. Entretanto, foram observadas diferenças significativas pelo teste F, a 1% e a 5% de probabilidade, entre os genótipos e os períodos de avaliação para as 4 características avaliadas (Tabela 4). Para três características, as diferenças foram altamente significativas entre os genótipos de maracujá e para o período de avaliação. Os coeficientes de variação variaram de 8,24% a 19,21% ressaltando uma boa precisão experimental. Foram verificadas altas estimativas do coeficiente de determinação, as quais foram superiores a 73% para três das quatro características avaliadas com base na média, o que mostra a acurácia e confiabilidade dos dados (CRUZ et al., 2004). Não foram observados efeitos da interação entre os genótipos e o período de avaliação para as quatro características avaliadas (Tabela 5).

**Tabela 5-** Resumo da análise de variância e valores de probabilidade dados relativos ao número de folhas, média da nota da severidade da virose nas folhas, número de folhas com nota máxima (4) e porcentagem de folhas com nota 4. UnB/Embrapa Cerrados, Brasília, DF, 2014.

<b>Fonte de variação</b>	<b>GL</b>	<b>N° Folhas</b>	<b>Média da nota da severidade da virose nas folhas</b>	<b>N° de folhas com nota máxima( 4)</b>	<b>% de folhas com nota4</b>
Genótipos (G)	11	0**	0**	5,0*	0,01**
Período de avaliação (P)	1	0**	0**	0**	1,09*
G x P	11	34,82	33,65	100	38,77
Média		6,1	2,87	2,52	43,35
Coeficiente de variação (%)		8,24	6,54	17,6	19,21
Coeficiente de determinação (%)		94,8	77,82	46,08	73,67

A comparação entre as médias das quatro características avaliadas nas 10 famílias de meio irmãos e nas duas cultivares comerciais evidenciaram as diferenças significativas (Tabela 6). Quanto ao número total de folhas, o genótipo com maior quantidade foi o CPAC-EC4-124, tanto aos 30 como aos 45 dias e o genótipo com menor quantidade foi o BRS Rubi do Cerrado. Esta característica dá uma idéia do vigor e do desenvolvimento inicial das mudas dos diferentes genótipos.

**Tabela 6-** Médias dos dados relativos ao número de folhas, média da nota, numero de folhas com nota máxima (4) e porcentagem de folhas com nota 4 de 12 genótipos de maracujazeiro em duas épocas de avaliação (30 e 45 dias) após inoculação. UnB/Embrapa Cerrados, Brasília, DF, 2014.

Genótipos	N° de folhas		Média da nota da severidade da virose nas folhas		N° de folhas com nota máxima( 4)		% de folhas com nota4		Índice soma ranks
	30 dias	45 dias	30 dias	45 dias	30 dias	45 dias	30 dias	45 dias	
<b>BRS Rubi do Cerrado</b>	3,85i A	5,80g B	3,22a A	3,14 a A	2,10c B	2,65bcd A	59,91a A	48,81a B	50
<b>CPAC-ERE-476</b>	4,55h A	6,50ef B	2,70bcd B	2,94bc A	2,15c B	2,55cd A	48,50b A	39,95cde B	31
<b>CPAC-EC4-121</b>	5,85bc A	7,55b B	2,61de B	2,82c A	2,15c B	2,60cd A	37,32d A	34,91ef A	11
<b>CPAC-EC4-124</b>	6,35 a A	8,25ab B	2,51e B	2,91c A	2,35bc A	2,55cd A	37,64d A	31,79ef B	14
<b>CPAC-EC4-223</b>	5,25ef A	6,40ef B	2,69bcd B	2,95bc A	2,15c B	2,45d A	42,73bcd A	39,44de A	22
<b>CPAC-EC4-325</b>	5,45de A	7,10c B	2,79bc B	3,07ab A	2,20bc B	3,05a A	41,05cd A	46,37abc A	38
<b>CPAC-ERE-575</b>	4,7gh A	6,25f B	2,77bc B	3,08ab A	2,15c B	2,70bcd A	46,66bc A	47,53ab A	39
<b>CPAC-ES4-239</b>	5,10ef A	7,55b B	2,83b A	2,87c A	2,35bc B	2,70bcd A	46,84bc A	36,59ef B	33
<b>CPAC-EC4-128</b>	4,90fgh A	6,90cd B	2,81bc A	3,13a B	2,30bc B	2,95ab A	47,92b A	44,52abcd A	47
<b>CPAC-EC5-356</b>	5,73cd A	7,80b B	2,68cd A	2,90c B	2,53b B	2,86abc A	44,76bc A	37,39ef B	28
<b>BRS Gigante Amarelo</b>	4,95fg A	6,70de B	2,81bc A	3,07ab B	2,10c B	3,15a A	42,97bcd A	48,14a A	42
<b>CPAC-ES4-138</b>	6,15b A	7,55b B	2,75bcd A	2,95bc B	2,90a A	3,05a A	47,14bc A	41,07bcde B	43

As medias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e pelas mesmas letras maiúsculas na linha (dentro de cada época de avaliação) não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Duncan a 1% de probabilidade.

A característica média da nota da severidade da virose na folha é uma indicação do nível de resistência de cada genótipo. As escalas diagramáticas, proposta por Junqueira et al. (2003) e por Novaes e Rezende (1999) tem sido utilizada com sucesso por diversos autores que avaliaram a reação de genótipos de maracujá-azedo ao CABMV (JUNQUEIRA et al., 2003; ABREU, 2006; FONSECA et al., 2009; PINTO et al., 2008; LEÃO et al., 2006; SOUZA, 2005; COIMBRA, 2010). Entre os genótipos avaliados no presente trabalho, a cultivar BRS Rubi do Cerrado foi a que apresentou maior média da nota da severidade da virose na folha aos 30 dias. Aos 45 dias, os genótipos que apresentaram maior média foram BRS Rubi do Cerrado, CPAC-EC4-128, CPAC-ERE-575, BRS Gigante Amarelo e CPAC-EC4-325. Os genótipos com menor média, ou seja, com maior nível de resistência foram CPAC-EC4-121, CPAC-ES4-239, CPAC-EC5-356 e CPAC-EC4-124, entretanto esses genótipos não diferiram estatisticamente de CPAC-ERE-476, CPAC-EC4-223, CPAC-ES4-138. Resultados semelhantes foram obtidos por Fonseca et.al (2009), avaliando a resistência de uma população de retrocruzamento de maracujazeiro e verificou alta suscetibilidade do progenitor recorrente da espécie comercial *P. edulis* com uma nota média de 3,9 e da

população de retrocruzamento RC4 com nota média de 3,7. A alta suscetibilidade da espécie comercial *P. edulis* também foi verificada por Abreu (2006). Santos (2013), trabalhou com híbridos interespecíficos entre *P. setacea* e *P. edulis* e genótipos de *P. edulis* em condições de campo, verificando diferentes níveis de resistência entre as progênies e os genitores de *P. edulis*.

A cultivar BRS Gigante Amarelo e os genótipos CPAC-ES4-138 e CPAC-EC4-325, apresentaram maior número de folhas com nota máxima (4) de severidade da virose aos 45 dias. Entretanto, não diferiram estatisticamente de CPAC-EC4-128 e CPAC-EC5-356.

Em relação a porcentagem de folhas com nota 4, verificou-se que aos 45 dias as duas cultivares comerciais BRS Gigante Amarelo e BRS Rubi do Cerrado, foram as que apresentaram menor nível de resistência quando comparadas com os genótipos obtidos pelo programa de retrocruzamentos (Tabela 4), mas não diferiram estatisticamente de CPAC-EC4-325, CPAC-ERE-575 e CPAC-EC4-128. Os genótipos com maior nível de resistência observados no presente trabalho com base na porcentagem de folhas com nota 4 aos 45 dias foram, CPAC-ES4-239, CPAC-EC4-121, CPAC-EC4-124 e CPAC-EC5-356, que não diferiram estatisticamente de CPAC-ERE-476 e CPAC-EC4 223. Com base no índice da soma de ranks, os genótipos CPAC-EC4-121 e CPAC-EC4-124 foram os que apresentaram os menores valores, ou seja, são aqueles que seriam selecionados com base na análise multivariada das características relacionadas à resistência à virose. Acredita-se que pelo menos parte da resistência das espécies silvestres *P. caerulea*, *P. setacea* e *P. edulis* “roxo silvestre” pode ser transferida para cultivares comerciais (JUNQUEIRA et al., 2005). Segundo Fonseca et al. (2009), o nível de resistência à virose do genitor *P. setacea*, embora transferido eficientemente para plantas F1, diminui ao longo dos ciclos de retrocruzamentos com a espécie comercial *P. edulis*, possivelmente pelo fato de ser uma resistência de herança quantitativa. Como a resistência é aparentemente quantitativa, análises fenotípicas precisam ser feita com alta acurácia, envolvendo experimentos em condições controladas e também experimentos em nível de campo com avaliações ao longo do ano e durante todo ciclo da planta e, como sugerido por Santos (2013), utilizando teste sorológicos e moleculares como ferramenta auxiliar na quantificação da doença. Acredita-se que o aumento do nível de resistência das plantas seja importante para diminuir os problemas da virose e também para levar a plantas com maior tolerância, ou seja, que consigam produzir mesmo na ocorrência da doença.

## 7.4 CONCLUSÕES

Diferentes níveis de resistência à virose do endurecimento dos frutos foram observados entre os acessos de diferentes espécies de maracujá, sendo que as espécies *Passiflora. misera* e *P. suberosa* não apresentaram sintomas do vírus e as espécies *P. cerradense*, *P. coccinia* e *P. setacea* apresentaram baixa incidência da doença com sintomas menos severos.

No caso dos genótipos obtidos por retrocruzamentos e cultivares comerciais, foi observada uma incidência de 100%, entretanto com diferentes níveis de resistência considerando a severidade da doença. As cultivares comerciais apresentaram maior severidade da doença quando comparadas com os genótipos obtidos por retrocruzamentos.

## 7.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, S.P.M. (2006) Desempenho agrônômico, características físico-químicas e reação a doenças em genótipos de maracujá-azedo cultivados no Distrito Federal. **Tese** (Mestrado em Ciências Agrárias) - Brasília – DF, Universidade de Brasília, 129p.

ALFENAS, P.F.; BRAZ, A.S.K.; TORRES, L.B.; SANTANA, E.; NASCIMENTO, V.S.; CARVALHO, M.G.; OTONI, W.C.; ZERBINI, F.M. Transgenic passion fruit expressing RNA derived from Cowpea aphid-borne mosaic virus is resistant to passion fruit woodiness disease. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.33- 38, 2005.

ANJOS, J.R.N.; 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: Embrapa Cerrados, 2002. 17p.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M., MOREIRA, C.N., FIGUEIRA, A.R., CORREA, R.X. (2008) Detection of a resistance gradient to *Passion fruit woodiness virus* and selection of ‘yellow’ passion fruit plants under field conditions. **Genetics and molecular research**, 7:1209-1216.

COIMBRA, K.G. (2010) Desempenho Agrônômico de Progênies de Maracujazeiro-Azedo no Distrito Federal. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Brasília – DF, Universidade de Brasília, 125p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2004. v. 1, 480 p.

Di PIERO, R.M.; REZENDE, J.A.M; YUKI, V.A.; PASCHOLATI, S.F.; DELFHINO, M.A. Transmissão do PassionFruit Woodiness Virus por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e Colonização de Maracujazeiro pelo Vetor. *Neotropical Entomology*, v. 35, n. 1, 2006, p 139-149. (**Nota Científica**).

FALEIRO, F. G. (Org.) ; FARIAS NETO, A.L. (Org.) ; RIBEIRO JR., Walter Quadros (Org.) . **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios**. 1. ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. v. 1000. 184p .

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. **Passion fruit (*Passiflora* spp.) improvement using wild species**. In: MARIANTE, A.S.; SAMPAIO, M.J.A.; INGLIS, M.C.V. The state of Brazil’s plant genetic resources. Second National Report. Conservation and Sustainable Utilization for food and agriculture. Embrapa **Technological Information**: Brasília, DF. 2009. pág 101-106.

FONSECA, K.G. DA, FALEIRO, F.G., PEIXOTO, J.R., JUNQUEIRA, N.T.V., JUNQUEIRA, K.P., SILVA, M.S., VAZ, C.D.E.F. (2009) Análise da recuperação do genitor recorrente em maracujazeiro-azedo por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 31(1):145–153.

FURMANN, E. Reação de híbridos interespecíficos de maracujazeiro à bacteriose e características físico-químicas de frutos. Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2011; 95 p. (**Dissertação de Mestrado em Agronomia**).

IBGE (2011). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Banco de dados agregados: produção agrícola municipal. Disponível em: [http //www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br) (Acesso em 22 de outubro de 2013).

JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BELLON, G.; RAMOS, J. D.; BRAGA, M. F.; SOUZA, L. S. Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero passiflora por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2008. vol.30, n.1, Jaboticabal- SP.

JUNQUEIRA, K. P.; Faleiro, F, G ; RAMOS, J. D. ; BELLON, G.;JUNQUEIRA, N,T,V ; BRAGA, M,F . Confirmação de hibridações interespecíficas no gênero Passiflora por meio de marcadores RAPD. In: XIX **Congresso Brasileiro de Fruticultura**, 2006, Cabo Frio, RJ. p.384.

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.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81-106.

JUNQUEIRA, N.T.V., ANJOS, J.R.N. DOS, SILVA, A.P.D.O., CHAVES, R.D.C., GOMES, A.C. (2003) Reação às doenças e produtividade de onze cultivares de maracujá-azedo cultivadas sem agrotóxicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38(8):1005-1010.

LEÃO, R.M.K., PEIXOTO, J.R., JUNQUEIRA, N.T.V., RESENDE, R.O., MATTOS, J.K.A., MELO, B. (2006) Reação de progênies de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (Cowpea aphid-borne mosaic virus - CABMV) em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, 22:87-92.

MACIEL, S.C., NAKANO, D.H., REZENDE, J.A.M., VIEIRA, M.L.C. (2009) Screening of passiflora species for reaction to Cowpea aphid-borne mosaic virus reveals an immune wild species. **Scientia Agricola**, 66(3):414-418.

MULAMBA, N.N.; MOCK, J.J. Improvement of yield potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. **Egypt J. Gen. Cytop.**, Alexandria, v. 7, p. 40-51, 1978.

NASCIMENTO, A.V., SANTANA, E.N., BRAZ, A.S., ALFENAS, P.F., PIO-RIBEIRO, G., ANDRADE, G.P., DE CARVALHO, M.G., ZERBINI, F.M. (2006). Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Archives of virology**, 151(9):1797–809.

NASCIMENTO, A.V.S., SOUZA, A.R.R., ALFENAS, P.S., ANDRADE, G.P., CARVALHO, M.G., PIO-RIBEIRO, G., ZERBINI, F.M. (2004) Análise filogenética de potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 29(4):378-383.

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

OTONI, W.C., CASALI, V.W.D., POWER, J.B., DAVEY, M.R. Isolamento de protoplastos de mesófilo de *P. suberosa* L.: influência da idade das plantas matrizes. *Revista Ceres*, 43:157-164, 1996.

PIMENTEL, L.D., STENZEL, M.N.C., CRUZ, C.D., BRUCKNER, C.H.. Seleção precoce de maracujazeiro pelo uso da correlação entre dados de produção mensal e anual. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43:1303-1309, 2008.

PINTO, P.H.D., PEIXOTO, J.R., JUNQUEIRA, N.T.V., RESENDE, R.O., MATTOS, J.K.A., MELO, B. Reação de genótipos de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (Cowpea aphid-borne mosaic virus – CABMV). *Bioscience journal*, Uberlândia, 24(2):19-26, 2008.

SANTOS, EILEEN AZEVEDO; MELHORAMENTO DO MARACUJAZEIRO-AZEDO (*Passiflora edulis* Sims) VISANDO À RESISTÊNCIA AO *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (Tese de doutorado) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 178p, 2013.

SOUSA, M.A.F. Avaliação da produtividade, incidência e severidade de doenças em frutos de 17 genótipos de maracujazeiro-amarelo, cultivados no Distrito Federal. Brasília, Universidade de Brasília: 2005, 120p. **Dissertação de Mestrado.**

ULMER, T., MACDOUGAL, J.M. *Passiflora: Passionflowers of the World*. 276p, 2004.

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. e WICKNER, R. (Eds.) *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. New York: **Academic Press**. 2000.

ZERBINI, F.M., ALFENAS, P.F., ANDRADE, E.C. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 13:191-244, 2005.