



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

**VALIDAÇÃO DE DESCRITORES, CARACTERIZAÇÃO E  
DIVERSIDADE GENÉTICA DE CULTIVARES DE  
ESPÉCIES COMERCIAIS E SILVESTRES DE  
MARACUJAZEIRO**

**KENIA GRACIELLE DA FONSECA**

**TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA/DF**

**MARÇO/2017**



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

**VALIDAÇÃO DE DESCRITORES, CARACTERIZAÇÃO E  
DIVERSIDADE GENÉTICA DE CULTIVARES DE  
ESPÉCIES COMERCIAIS E SILVESTRES DE  
MARACUJAZEIRO**

**KENIA GRACIELLE DA FONSECA**

**ORIENTADOR: FÁBIO GELAPE FALEIRO**  
**COORIENTADOR: JOSÉ RICARDO PEIXOTO**

**TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**PUBLICAÇÃO: 054D/2017**

**BRASÍLIA/DF**

**MARÇO/2017**



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

**VALIDAÇÃO DE DESCRITORES, CARACTERIZAÇÃO E  
DIVERSIDADE GENÉTICA DE CULTIVARES DE ESPÉCIES  
COMERCIAIS E SILVESTRES DE MARACUJAZEIRO**

**KENIA GRACIELLE DA FONSECA**

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO  
DO GRAU DE DOUTOR EM AGRONOMIA.**

**APROVADA POR:**

---

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

---

**Márcio Carvalho Pires, Dr., Universidade de Brasília, CPF: 844.256.601-53,  
mcpires@unb.br (Examinador Interno)**

---

**Marcelo Fideles Braga, Dr., Embrapa Cerrados, CPF: 398.831.161-87,  
marcelo.fideles@embrapa.br (Examinador externo)**

---

**Keize Pereira Junqueira, Dra., Embrapa Produtos e Mercado, CPF: 717.667.741-72,  
keize.junqueira@embrapa.br (Examinador externo)**

---

**Fabício Santana Santos, Dr., SNPC-MAPA, CPF: 655.593.555-34,  
fabricio.santos @agricultura.gov.br (Examinador Externo)**

**BRASÍLIA/DF, 10 de MARÇO de 2017.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Fonseca, Kenia Gracielle

Validação de descritores, caracterização e diversidade genética de cultivares de espécies comerciais e silvestres de maracujazeiro. Kenia Gracielle da Fonseca. Orientação de Fábio Gelape Faleiro e coorientação de José Ricardo Peixoto. Brasília, 2017.

183p.: il.

Tese de Doutorado (D) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2017.

1. *Passiflora* spp. 2. proteção de cultivares. 3. variabilidade genética. 5. multivariada. 6. marcadores moleculares.

I. Faleiro, F.G. II. Doutor

CDD ou CDU  
Agris / FAO

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

FONSECA, K.G. **Validação de descritores, caracterização e diversidade genética de cultivares de espécies comerciais e silvestres de maracujazeiro**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, 183 p. Tese de Doutorado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Kenia Gracielle da Fonseca

TÍTULO DA TESE: Validação de descritores, caracterização e diversidade genética de cultivares de espécies comerciais e silvestres de maracujazeiro.

GRAU: Doutor

ANO: 2017

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 à fonte.

-----  
Nome: Kenia Gracielle da Fonseca

CPF: 731.172.261-68

Email: kenia.gfonseca@gmail.com

A DEUS

**Ofereço**

Aos meus amados pais Áurea (*in memoriam*) e Marcos

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por todas graças e bênçãos, por direcionar meus caminhos, me proteger, me fortalecer e simplesmente transformar e transbordar minha vida!

À Universidade de Brasília e ao Departamento de Agronomia pela oportunidade de realização do curso de Pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

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

Ao Orientador Dr. Fábio Faleiro pela orientação excepcional, por toda dedicação, paciência, auxílio e ensinamentos. Não teria conseguido chegar até aqui sem sua valiosa ajuda desde o mestrado.

Ao Professor José Ricardo, pelos ensinamentos e amizade.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e sugestões para a melhoria do trabalho.

Aos pesquisadores Dr. Nilton Junqueira, Dra. Ana Maria, Dr. Herbert, Dra. Keize e Dr. Eduardo Alano por todas informações e contribuições para o trabalho.

Aos meus pais Áurea (*in memoriam*) e Marcos, a base da minha vida e maiores incentivadores, pelo amor incondicional, carinho e ensinamentos. Aos meus irmãos Aurimar e Kesley, à minha cunhada Arlanza e sobrinha Karine por todo incentivo.

Ao Marcelo Cunha por todo amor, incentivo e confiança.

Às minhas amadas sobrinha e afilhadas Karine, Sarah e Isabella por todos momentos de alegria.

À minha segunda família, Família Akimoto por todo amor e carinho, em especial à minha querida madrinha Ida, um anjo que Deus colocou na minha vida, por todos os conselhos.

À minha querida amiga-irmã e comadre Graciele pela amizade singular, incentivo e pelo presente mais precioso: a nossa Bella.

Às queridas amigas sempre presente na minha vida Erivanda, Luciana e Keize e aos amigos que sempre me ampararam: Boza, Cláudia, Alex, Noêmia, Felipe e Rivi.

Às grandes amigas que fiz no decorrer do curso: Susan pela valiosa ajuda e conselhos, Jamile por toda sua generosidade em ajudar, pelos momentos de descontração, por todas risadas e todos passeios, Cloh e Tamara por todos agradáveis momentos de alegria e desespero. E

também à Ana Paula, que por destino nos reencontramos nessa caminhada, pela sincera amizade.

Ao Dr. Sebastião Pedro e prof. Janine, pelo incentivo desde a graduação.

À Mariana Barth, João Batista, João Pedro, Marcelo e Carolina pela contribuição no trabalho.

À tia Ana e Paty por todo carinho.

Aos produtores rurais e viveiristas que me receberam em suas propriedades: Dona Lucília, Dona Leda, Magela, Deocleciano, Valdecir e Camilo.

Aos funcionários da Embrapa Cerrados.

A todos familiares e amigos.

*Muito obrigada!*

## RESUMO GERAL

A variabilidade genética existente no maracujazeiro pode ser utilizada para diversificar o sistema de produção com a obtenção de produtos tecnológicos. Para a proteção de novas cultivares exige-se a utilização de descritores mínimos e ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE). Neste trabalho, objetivou-se caracterizar cultivares e matrizes de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims) e espécies e cultivares de maracujazeiro silvestre (*Passiflora* spp.) mediante a utilização de descritores morfoagronômicos e marcadores moleculares visando observar a capacidade dessas ferramentas em diferenciar as cultivares estudadas. Outro objetivo do trabalho foi validar os descritores propostos pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC). A caracterização morfoagronômica foi realizada na Embrapa Cerrados, Planaltina, DF; em propriedades rurais de Sobradinho, DF, Planaltina, GO, Núcleo Rural Tabatinga, DF e Núcleo Rural Pípiripau, DF e em dois viveiros localizados em Planaltina, DF. Utilizou-se uma lista com 33 descritores morfoagronômicos para a espécie silvestre *Passiflora cincinnata*, e para seis cultivares de maracujazeiro silvestre (BRS Pérola do Cerrado, BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora, BRS Roseflora, BRS Céu do Cerrado e BRS Rosea Púrpura) e 25 descritores morfoagronômicos) para três cultivares de maracujazeiro azedo (BRS GA1, BRS SC1 e BRS RC) e para as cinco matrizes que deram origem à essas cultivares (CPMSC1, CPGA1, CPMGA2, BRSMR1 e CPACMJM08). Os descritores morfoagronômicos categóricos foram analisados por meio da distribuição de frequência e análises multivariadas e os quantitativos por análises de variância e comparação entre médias das cultivares. Foram também utilizados na caracterização das cultivares marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) e SSR (*Simple Sequence Repeats*). Os descritores morfoagronômicos foram eficientes para a caracterização dos maracujazeiros e para a quantificação da variabilidade genética entre as cultivares ou espécies. Verificou-se diferentes taxas de validação dos descritores devido a variações na classificação fenotípica ocasionadas pela influência ambiental. Os marcadores moleculares foram úteis na diferenciação das cultivares e na quantificação da variabilidade genética existente. No presente estudo, foram sugeridos alguns ajustes (inclusão de termos, classes fenotípicas e características, exclusão de algumas características) no documento orientador do MAPA a fim de minimizar os equívocos e aumentar a precisão e acurácia dos descritores na diferenciação das cultivares.

**Palavras-chave:** *Passiflora* spp., proteção de cultivares, variabilidade genética, multivariada, marcadores moleculares.

## ABSTRACT

The genetic variability in passion fruit can be used to diversify the crop system with new technological products. The use of minimum descriptors and distinctness, uniformity and stability (DUS) tests are required for the intellectual protection of new varieties. The purpose of this work was to characterize varieties and matrices of sour passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) and wild passion fruit species and varieties (*Passiflora* spp.) using morphoagronomic descriptors and molecular markers to observe the ability of these tools to differentiate the varieties studied. Another goal was to validate the descriptors proposed by the Brazilian Plant Variety Protection Office (SNPC). The morphoagronomic characterization was performed at Embrapa Cerrados, Planaltina - Federal District; on farms at Sobradinho - Federal District, Planaltina, GO, Núcleo Rural Tabatinga - Federal District and Núcleo Rural Pipiripau - Federal District and in two seedlings farms located in Planaltina - Federal District. A list of 33 morphoagronomic descriptors was used for *Passiflora cincinnata* and other six wild passion fruit varieties (BRS Pérola do Cerrado, BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora, BRS Roseflora, BRS Céu do Cerrado and BRS Rosea Púrpura) and 25 morphoagronomic descriptors were used for three varieties of sour passion fruit (BRS GA1, BRS SC1 and BRS RC) and for the five matrices that gave origin to these varieties (CPMSC1, CPGA1, CPMGA2, BRSMR1 and CPACMJM08). The categorical morphoagronomic descriptors were analyzed by frequency distribution and multivariate analysis. The quantitative descriptors were evaluated by analysis of variance and comparison among averages of the varieties. Molecular markers RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) and SSR (Simple Sequence Repeats) were also used for the characterization of varieties. The morphoagronomic descriptors were efficient for characterization of passion fruit and to quantify the genetic variability among varieties or species. Different validation rates for descriptors were observed because of variations in the phenotypic classification due to environmental influence. Molecular markers were useful to differentiate the varieties and to quantify the genetic variability among passion fruit species and varieties. In this study, some adjustments (inclusion of terms, phenotypic categories and characteristics, exclusion of some characteristics) were suggested in the MAPA (Brazilian Ministry of Agriculture Livestock and Food Supply) guiding document in order to minimize the misunderstandings and increase the differentiation among passion fruit varieties.

**Keywords:** *Passiflora* spp., variety protection, genetic variability, multivariate analysis, molecular markers.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2 OBJETIVO GERAL .....	3
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
4.1 Maracujazeiro .....	4
4.1.1 Aspectos gerais .....	4
4.1.2 Aspectos botânicos .....	6
4.1.3 Melhoramento genético.....	7
4.2 Registro e proteção de cultivares.....	9
4.2.1 Aspectos gerais .....	9
4.2.2 Proteção e testes de DHE .....	11
4.3 Marcadores moleculares .....	13
4.3.1 Aspectos gerais .....	13
4.3.2 Marcadores e proteção de cultivares.....	16
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	17
CAPÍTULO 1. CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E MOLECULAR DE SELEÇÕES DE MARACUJAZEIRO SILVESTRE <i>Passiflora cincinnata</i> MAST.....	25
RESUMO .....	26
ABSTRACT .....	27
1.1 INTRODUÇÃO .....	28
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
1.2.1 Caracterização morfoagronômica.....	30
1.2.2 Caracterização molecular .....	31
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
1.3.1 Caracterização morfoagronômica.....	33
1.3.2 Caracterização molecular .....	42
1.4 CONCLUSÕES .....	45
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46
CAPÍTULO 2. CARACTERIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE DESCRITORES MORFOAGRONÔMICOS UTILIZADOS NOS PROCESSOS DE PROTEÇÃO DE CULTIVARES DE MARACUJAZEIRO AZEDO ( <i>Passiflora edulis</i> Sims).....	49
RESUMO .....	50
ABSTRACT .....	51
2.1 INTRODUÇÃO .....	52
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
2.4 CONCLUSÕES .....	66
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
CAPÍTULO 3. OBTENÇÃO E VALIDAÇÃO DE DESCRITORES PARA A CULTIVAR DE MARACUJAZEIRO SILVESTRE BRS PÉROLA DO CERRADO (BRS PC) EM DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO.....	70
RESUMO .....	71
ABSTRACT .....	72

3.1 INTRODUÇÃO .....	73
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	75
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	77
3.4 CONCLUSÕES .....	86
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87
CAPÍTULO 4. CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E MOLECULAR DE CULTIVARES DE MARACUJAZEIROS ORNAMENTAIS .....	89
RESUMO .....	90
ABSTRACT .....	91
4.1 INTRODUÇÃO .....	92
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	94
4.2.1 Caracterização morfoagronômica .....	94
4.2.2 Caracterização molecular .....	96
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	98
4.3.1 Caracterização morfoagronômica .....	98
4.3.2 Caracterização molecular .....	110
4.4 CONCLUSÕES .....	113
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	115
CAPÍTULO 5. UTILIZAÇÃO DE DESCRITORES MORFOAGRONÔMICOS E MARCADORES RAPD PARA GARANTIR A QUALIDADE DE MATRIZES DE MARACUJAZEIRO AZEDO .....	119
RESUMO .....	120
ABSTRACT .....	121
5.1 INTRODUÇÃO .....	122
5.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	123
5.2.1 Caracterização morfoagronômica .....	123
5.2.2 Caracterização molecular .....	125
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	126
5.3.1 Caracterização morfoagronômica .....	126
5.3.2 Caracterização molecular .....	135
5.4 CONCLUSÕES .....	136
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	137
CAPÍTULO 6. CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE MATRIZES DE MARACUJAZEIRO AZEDO E ORNAMENTAL UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES .....	140
RESUMO .....	141
ABSTRACT .....	142
6.1 INTRODUÇÃO .....	143
6.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	145
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	146
6.4 CONCLUSÃO .....	154
6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	155
ANEXOS .....	159

ANEXO A. INSTRUÇÕES PARA EXECUÇÃO DOS ENSAIOS DE DISTINGUIBILIDADE, HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE DE CULTIVARES DE MARACUJÁ ( <i>Passiflora edulis</i> Sims) .....	160
ANEXO B. INSTRUÇÕES PARA EXECUÇÃO DOS ENSAIOS DE DISTINGUIBILIDADE, HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE DE CULTIVARES DE MARACUJÁ DAS ESPÉCIES <i>Passiflora alata</i> Curtis; <i>Passiflora amethystina</i> J.C.Mikan; <i>Passiflora caerulea</i> L.; <i>Passiflora cincinnata</i> Mast.; <i>Passiflora coccinea</i> Aubl.; <i>Passiflora foetida</i> L.; <i>Passiflora gardneri</i> Mast.; <i>Passiflora ligularis</i> Juss.; <i>Passiflora mucronata</i> Lam.; <i>Passiflora nitida</i> Bonpl. ex Kunth; <i>Passiflora quadrangularis</i> L.; <i>Passiflora setacea</i> DC.; <i>Passiflora tenuifila</i> Killip e <i>Passiflora tripartita</i> (Juss.) Poir. (abrangendo cultivares ornamentais, medicinais, frutíferas e híbridos interespecíficos) .....	171
OBSERVAÇÃO .....	183

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O maracujazeiro pertence à família Passifloraceae e ao gênero *Passiflora*. Estima-se mais de 500 espécies dessa família, sobretudo da América e África (BERNACCI, 2003). Apesar de possuir centenas de espécies, poucas são cultivadas comercialmente. Atualmente, a principal espécie plantada é a *Passiflora edulis* Sims, conhecida como maracujá-amarelo ou azedo (BERNACCI et al., 2003).

O valor comercial do maracujá azedo foi descoberto há aproximadamente 50 anos, quando os primeiros pomares paulistas foram implantados (MELETTI, 2011). Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial da fruta, com uma área de 57.183 hectares e produção de 823.284 toneladas (ABF, 2016). Os frutos são destinados principalmente para a indústria de sucos, entretanto, devido à variabilidade interespecífica e intraespecífica, o interesse pelo gênero vai além, considerando o seu potencial ornamental, propriedades medicinais e produção de frutos para consumo in natura (BERNACCI et al., 2005; HEIDEN, 2008; CERQUEIRA-SILVA et al., 2014).

A grande variabilidade existente no maracujá pode ser utilizada nos programas de melhoramento genético para desenvolvimento de novas cultivares (JUNQUEIRA et al., 2005; FERREIRA, 2005; BERNACCI et al., 2005; VIANA et al., 2005). Atualmente, existem mais de 30 cultivares catalogadas no Registro Nacional de Cultivares (RNC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), entretanto nem todas estão efetivamente disponíveis aos produtores (CERQUEIRA-SILVA, 2014) e algumas são parentais de híbridos. Essa reduzida disponibilidade para os produtores implica numa maior vulnerabilidade dos cultivos às doenças, colocando em risco a sustentabilidade da cadeia produtiva do maracujá. Na maioria das vezes, as doenças depreciam a qualidade do fruto e reduzem a produtividade e a longevidade da cultura (JUNQUEIRA et al., 2005; MELETTI et al., 2005).

Para ampliar o número de cultivares disponíveis para os produtores é importante utilizar todas as potencialidades do maracujá, por meio do uso de recursos genéticos para obtenção de novas plantas com resistência ou tolerância a doenças, aptidão ornamental, medicinal e alimentos funcionais. O desenvolvimento de cultivares destes diferentes tipos de maracujá para a diversificação do sistema de produção é considerada uma importante demanda para a pesquisa (FALEIRO et al., 2006).

Para que as cultivares desenvolvidas pelos programas de melhoramento genético cheguem aos produtores e beneficiem toda cadeia produtiva, é essencial um sistema organizado

de produção e comercialização de sementes e mudas e para isso é necessário o registro das cultivares no Registro Nacional de Cultivares (RNC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Além do registro, as cultivares podem ser protegidas no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) do MAPA garantindo os direitos dos obtentores, maiores investimentos em pesquisa e, conseqüentemente, acesso do produtor à cultivares com maior qualidade. Esses processos exigem que a cultivar seja produto de melhoramento genético e atendam aos critérios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE), os quais são verificados por meio dos ensaios de DHE envolvendo a obtenção de descritores mínimos publicados pelo SNPC (JESUS et al., 2015; JESUS et al., 2016; BRASIL, 2016).

Em 2008, o SNPC publicou um conjunto de instruções oficiais para realização de testes DHE, onde consta uma lista com 25 descritores morfoagronômicos para *Passiflora edulis* Sims e outra lista com 33 descritores para cultivares de espécies silvestres e híbridos interespecíficos de outras espécies do gênero *Passiflora*. A aplicação segura e eficaz dessas instruções requer a validação experimental com cultivares conhecidos, a fim de se estabelecer cultivares-exemplo, fundamentais para viabilizar a utilização das metodologias em diferentes regiões e por distintos avaliadores (BRASIL, 2016).

Marcadores moleculares do DNA, como o RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) e SSR (*Simple Sequence Repeats*), apesar de não serem aceitos como metodologia oficial para proteção de cultivares, têm se mostrado eficientes na caracterização e na quantificação da variabilidade genética de várias espécies de plantas, motivo pelo qual vêm sendo utilizados como ferramenta auxiliar (FALEIRO, 2011).

Diante do exposto, este estudo possui duas linhas principais de investigação: 1. estudos de caracterização de maracujazeiro azedo e silvestre utilizando descritores morfoagronômicos e marcadores moleculares para conhecer e quantificar a diversidade genética existente e 2. validação dos descritores mínimos utilizados nos processos de proteção de cultivares de *P. edulis* Sims e outras espécies do gênero *Passiflora* e proposição de ajustes para a melhoria da precisão e acurácia de tais descritores na diferenciação das cultivares.

## 2 OBJETIVO GERAL

Obter e validar descritores mínimos utilizados nos processos de proteção de cultivares de *Passiflora edulis* Sims e outras espécies e híbridos interespecíficos do gênero *Passiflora* e utilizar características morfoagronômicas e moleculares para a caracterização e quantificação da diversidade genética de cultivares de espécies comerciais e silvestres de maracujazeiro obtidas em programas de melhoramento genético visando ao uso diversificado do maracujá para consumo in natura, processamento industrial e como porta-enxertos, alimentos funcionais, plantas ornamentais e medicinais.

## 3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização morfoagronômica e molecular de acessos de *Passiflora cincinnata* Mast, por meio de 33 descritores morfoagronômicos e marcadores moleculares RAPD e ISSR;
- Obter e validar 25 descritores da espécie *P. edulis* Sims de maracujazeiro azedo comercial BRS Gigante Amarelo (BRS GA1), BRS Sol do Cerrado (BRS SC1) e BRS Rubi do Cerrado (BRS RC);
- Obter e validar descritores mínimos para a cultivar de maracujazeiro silvestre BRS Pérola do Cerrado (BRS PC), em diferentes sistemas de produção;
- Obter e validar 33 descritores para os maracujazeiros ornamentais BRS Estrela do Cerrado, BRS Roseflora, BRS Rubiflora, BRS Rosea Púrpura (BRS RP), BRS Céu do Cerrado (BRS CC) e BRS Pérola do Cerrado (BRS PC) e realizar a caracterização utilizando marcadores moleculares;
- Caracterizar matrizes de maracujazeiro azedo por meio de descritores morfoagronômicos e marcadores RAPD para confirmação de misturas genéticas;
- Caracterizar e estimar a diversidade genética de matrizes de maracujazeiro azedo e ornamental utilizando marcadores microssatélites (SSR).

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Maracujazeiro

#### 4.1.1 Aspectos gerais

A morfologia da flor de maracujazeiro por estar associada aos símbolos da Paixão de Cristo deu origem ao seu nome popular em muitos países fora do seu centro de origem (*passion fruit* nos países de língua inglesa, *passionsblumen* na Alemanha, *fruit de la passion* em francês, entre outros) e posteriormente foi oficializado por Lineu em sua nomenclatura científica latina *Passiflora* (HEIDEN, 2008).

O maracujá pertence à família Passifloraceae e há controvérsias quanto ao número de gêneros e espécies dessa família devido às incertezas taxonômicas e novas descrições de espécies (BERNACCI et al., 2005; CERQUEIRA-SILVA et al., 2014). Acredita-se que há mais de 580 espécies, sendo a maioria da América Tropical, com ampla distribuição no Brasil, representada por aproximadamente 140 espécies do gênero *Passiflora* (CERVI, 2006; OLIVEIRA; RUGGIERO, 2005).

A década de 90 foi marcante para a passicultura, com uma ampliação significativa da área cultivada com maracujá no País inteiro. Após isso, o surgimento de várias agroindústrias de sucos em diversos estados, e a adoção de novas tecnologias consolidaram essa atividade, que se transformou em uma oportunidade de capitalização a curto prazo (MELETTI, 2011).

O cultivo de maracujá, que geralmente é realizado em pequenas propriedades de três a cinco hectares, tem sido uma atividade atrativa pelo alto valor agregado da produção e apresenta uma importância social no sentido de gerar de três a quatro empregos diretos e ocupar de sete a oito pessoas nos diferentes elos da cadeia produtiva (MELETTI, 2011).

A produção de maracujá no Brasil, no ano de 2014, foi de 823.284 toneladas (ABF, 2016). A região Nordeste foi responsável pela maior produção e o estado da Bahia é o principal produtor da fruta no País.

Apesar da grande produção, o volume de fruta fresca e suco exportado pelo Brasil é muito pequeno quando comparado com outras frutas, pois o mercado interno absorve quase a totalidade da produção. A maior parcela da exportação é representada pelos sucos concentrados, comercializados mais intensamente na Holanda, Estados Unidos, Porto Rico, Japão e Alemanha, os quais importam 76% do suco concentrado produzido no Brasil (MELETTI, 2011).

O potencial das espécies silvestres é relatado por Costa e Tupinambá (2005), com a possibilidade de utilização como alimentos funcionais e plantas medicinais, entretanto, há carência de estudos nesse sentido. Além disso, o gênero apresenta aptidão ornamental devido à beleza e diversidade das folhas e flores de maracujazeiro. Em países do hemisfério norte, sua utilização é relatada há mais de um século, como elemento de decoração e também de renda para os produtores (PEIXOTO, 2005). A utilização dessas espécies para fins de pesquisa e desenvolvimento tecnológico foi facilitada pela Lei nº 13.123/2015 (BRASIL, 2015) que passou a regular o acesso ao patrimônio genético do País, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade.

Pesquisa e desenvolvimento tem impulsionado a exploração dessas outras utilidades de maracujazeiro na última década (FALEIRO et al., 2015), com o lançamento de três cultivares de maracujazeiro com aptidão ornamental em 2007 (BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora) (EMBRAPA, 2017a), a primeira cultivar (BRS Pérola do Cerrado - BRS PC) originada de uma espécie silvestre (*Passiflora setacea* DC.) com quádrupla aptidão em 2013 (EMBRAPA, 2017b) e a primeira cultivar da espécie silvestre *Passiflora cincinnata* Mast (BRS Sertão Forte - BRS SF) em 2016 (EMBRAPA, 2017c).

A grande quantidade de resíduo agroindustrial é um problema que tem sido solucionado por meio do seu aproveitamento. A casca do maracujá é rica em niacina (vitamina B3), ferro, cálcio e fósforo (GONDIM et al., 2005). Estudos revelam que a casca de maracujá apresenta alto teor de fibras, sendo um ingrediente promissor para o enriquecimento de formulações, sendo assim, casca e sementes podem gerar fonte de renda aos empreendedores (NASCIMENTO et al., 2013). Oliveira et al. (2002) relatam que a casca do maracujá constitui boa matéria-prima para produção de doce em calda, sensorialmente aceitável por várias faixas etárias de consumidores, principalmente por crianças. O óleo extraído das sementes pode ser utilizado na alimentação humana e animal, indústria cosmética, entre outros e o farelo resultante da extração do óleo é rico em proteínas e carboidratos, e apresenta alto teor de fibras (FERRARI et al., 2004).

#### 4.1.2 Aspectos botânicos

As plantas do gênero *Passiflora*, em sua maioria, são trepadeiras herbáceas ou lenhosas, com gavinhas auxiliares de ramos cilíndricos. Apresentam uma grande diversidade em formato de folhas, provavelmente devido à pressão evolutiva, a maioria são simples e alternas; lobada ou inteira, estípulas presentes, às vezes decíduas, ou ausentes; pecíolo com ou sem nectários sésseis, estipitados ou pedunculados, algumas ainda apresentam glândulas nos lobos dos sinus (BERNACCI, 2003; ULMER; MACDOUGAL, 2004; NUNES; QUEIROZ, 2006, VANDERPLANCK, 2000; TEIXEIRA, 1994; RUGGIERO et al. 1996).

As gavinhas, geralmente solitárias, desenvolvem-se nas axilas das folhas e são ausentes em espécies lenhosas (CUNHA et al., 2002).

A maioria das espécies floresce abundantemente durante vários meses no ano. Geralmente as flores permanecem abertas por um dia, embora algumas espécies como *P. aurantia*, *P. cinnabarina*, *P. herbertiana* e *P. jorullensis* mantenham suas flores abertas por até três dias (ULMER; MACDOUGAL, 2004).

As flores ocorrem de forma isolada ou aos pares, e em algumas espécies, reunidas em inflorescências, hermafroditas, normalmente muito vistosas, brancas ou coloridas; hipanto tubular, campanulado ou cilíndrico; cinco sépalas, carnosas, subcoriáceas ou, raramente, membranáceas, às vezes dorsalmente corniculadas ou aristadas próximo ao ápice; cinco pétalas, membranáceas, alternas às sépalas, raramente ausentes. Opérculo e límen presentes ou ausentes; estames, alternos às pétalas, inseridos no hipanto ou androginóforo, livres ou unidos em torno do ovário (BERNACCI, 2003; LEITÃO FILHO; ARANHA, 1974; VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004).

A corona é a característica mais marcante do gênero *Passiflora*. Sua origem vem sendo investigada durante muitos anos e acredita-se ser derivada de sépalas e pétalas. O androginóforo forma um longo tubo floral de órgãos sexuais femininos e masculinos, soldados e elevados, raramente muito curto ou ausente. Cinco estames, anteras versáteis, lineares a oval-oblongas. Ovário globoso, ovoide ou fusiforme. Estiletos em número de três, distintos ou unidos na base, cilíndricos ou clavados. Estigmas capitados, orbiculares ou reniformes. As brácteas são pequenas ou foliáceas, verticiladas e involucrais ou alternadas no pedúnculo, algumas vezes decíduas. Pedúnculo único ou pareado, com 1 a 2 flores (NUNES; QUEIROZ, 2006).

A espécie *P. edulis* Sims cultivada, apresenta flores hermafroditas, abrindo uma única vez, por volta das 12 horas e fechando à noite; autoincompatíveis, isto é, o pólen produzido em

determinada flor não pode fecundá-la e nem pode fecundar de forma eficaz as demais flores produzidas na mesma planta (JUNQUEIRA et al., 2001). Devido principalmente à morfologia floral e à presença de grãos de pólen pesados e pegajosos, a polinização natural do maracujazeiro-azedo é dependente de insetos polinizadores. As flores de *P. edulis* apresentam características adaptadas à polinização por abelhas de grande porte. Estas são conhecidas por mamangavas-de-toco, abelhas do gênero *Xylocopa* que, segundo Benevides et al. (2009), devido ao seu grande porte, ao visitarem a flor do maracujazeiro, encostam seu dorso nos estames onde estão os grãos de pólen, fazendo sua retirada e levando-os para o estigma, efetuando dessa maneira a polinização.

De acordo com Ulmer e Macdougall (2004), o sistema radicular das passifloras é do tipo axial, podendo desenvolver raízes adventícias quando as plantas são propagadas por estacas. O caule apresenta hábito trepador, por esse motivo são delgados, pouco lenhosos e necessitam de um suporte para suprir a necessidade de luz. São eretos, cilíndricos, lisos ou pilosos, angulados, angular-estriados, angular-alado, poucos são achatados e alguns são descritos como subangular e estriados.

Os frutos são usualmente bagas indeiscentes, globosos ou ovoides, raramente fusiforme, possuem coloração amarela existindo, entretanto, frutos de coloração vermelha e roxa (VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004; NUNES; QUEIROZ, 2006). As sementes são comprimidas, reticuladas, pontuadas ou transversalmente alveoladas, envolvidas por um arilo mucilaginoso, endosperma oleaginoso, nuclear. São do tipo ortodoxas ou ortodoxas intermediárias (BERNACCI, 2003; NUNES; QUEIROZ, 2001).

#### **4.1.3 Melhoramento genético**

Algumas doenças têm sido limitantes para a expansão do maracujazeiro. Entre elas, segundo Junqueira et al. (2005), se destacam a bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*), murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*), virose do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus-CABMV* e *PWV*) e antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) que, na maioria das vezes em conjunto com as pragas (broca-da-haste, mosca do botão floral) provocam prejuízos expressivos e ainda, se favorecidas por condições edafoclimáticas, não podem ser controladas eficazmente pelos métodos tradicionais de controle. Esses fatores reduzem a produtividade, a qualidade dos frutos e a longevidade do pomar (OLIVEIRA et al., 1994).

O reduzido número de cultivares disponíveis para os produtores implica numa maior vulnerabilidade dos cultivos às doenças, deixando muito suscetível a cadeia produtiva do maracujá (RUGGIERO et al., 1996; JUNQUEIRA et al., 2003), entretanto, o maracujá apresenta grande variabilidade genética, possível de ser utilizada nos programas de melhoramento genético para desenvolvimento de novas cultivares (FERREIRA, 2005; BERNACCI et al., 2005; FALEIRO et al., 2015).

A utilização de híbridos e variedades melhoradas geneticamente com maior produtividade, qualidade de frutos, resistência a doenças e adaptadas aos diferentes agroecossistemas no Brasil é a medida mais eficaz para a expansão do cultivo e para o controle de pragas e doenças. Os programas de melhoramento genético vêm trabalhando no intuito de desenvolver variedades com essas características, pois é de fundamental importância para garantir a viabilidade econômica do agronegócio do maracujá (FALEIRO et al., 2006; FALEIRO et al., 2011; FALEIRO et al., 2013).

Segundo Faleiro et al. (2005) a caracterização e a exploração da variabilidade genética entre as espécies de *Passiflora* e, também, dentro da espécie cultivada (*P. edulis* Sims) podem revelar fontes de resistência ou tolerância de maior valor para o controle de doenças no campo ou utilização em programas de melhoramento genético. Além das espécies silvestres, o uso de variedades comerciais em programas de melhoramento é necessário com a finalidade de fornecer genes relacionados à produtividade e à qualidade dos frutos.

O melhoramento do maracujazeiro, de acordo com Viana e Gonçalves (2005), de forma geral, está diretamente relacionado ao fruto, focando três pontos principais: melhoramento visando atender às exigências do mercado, aumento na produtividade e resistência a doenças. Vários métodos podem ser aplicados a cultura do maracujazeiro, por apresentar a maioria das espécies alógamas, seja via aumento da frequência de genes favoráveis, seja pela exploração do vigor híbrido (BRUCKNER, 1997).

A base essencial de um bom programa de melhoramento é a escolha do germoplasma, pois suas características determinarão o potencial máximo ao qual a população submetida ao melhoramento pode alcançar (HALLAUER; MIRANDA FILHO, 1988). Sendo assim, estudos mais aprofundados de caracterização agrônômica e molecular de variedades comerciais e silvestres de maracujá são necessários e de grande interesse para o melhoramento genético, orientando a escolha de genitores e o planejamento dos cruzamentos (FALEIRO et al., 2005).

Algumas espécies não cultivadas têm trazido contribuições importantes ao melhoramento genético do maracujá por apresentarem resistência a doenças ou 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, ainda pouco exploradas. Entre essas, destacam-se *P. setacea*, *P. cincinnata*, *P. caerulea*, *P. incarnata*, *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. nitida* e *P. quadrangulares* (MELETTI et al., 2005).

Os programas de melhoramento do maracujazeiro apresentam algumas particularidades no que diz respeito à autoincompatibilidade, 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, especialmente, quando são via seminal (PEREIRA et al., 2005; BRUCKNER et al., 2005).

O melhoramento do maracujazeiro constitui-se, desde seu início, em campo de pesquisa promissor, mas somente na década de 90 foram lançadas as primeiras cultivares (MELETTI et al., 2005; FALEIRO et al. 2008a).

## **4.2 Registro e proteção de cultivares**

### **4.2.1 Aspectos gerais**

A capacidade criadora do homem teve o reconhecimento e a valorização de sua importância para o avanço tecnológico a partir da Convenção de Paris para a Proteção da Propriedade Industrial em 1883 e evoluíram até a globalização da economia, momento em que a propriedade intelectual adquiriu maior importância. O estímulo à inovação e ao desenvolvimento tecnológico ocorreu com a consolidação do Acordo sobre os Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual Relacionados ao Comércio (Trade Related Intellectual Property Rights - TRIPS), em vigor desde 1995, o qual inclui o direito de autoria e direitos conexos às diferentes formas de propriedade intelectual; marcas de fábrica ou de comércio; indicações geográficas, inclusive denominações de origem; desenhos e modelos industriais; informação confidencial e patentes (VIANA, 2011).

O artigo 27.3(b) da seção do acordo TRIPS dispõe sobre patentes e estabelece que os países-membros da OMC (Organização Mundial do Comércio) podem optar por um sistema patentário, um modelo *sui generis* ou uma combinação de ambos, para proteção intelectual das variedades vegetais. O direito do obtentor, segundo Viana (2011), é uma forma *sui generis* de propriedade intelectual por apresentar características únicas e particulares, adequadas

especialmente ao objeto da proteção: as variedades vegetais. Para a concessão de patentes são indispensáveis os requisitos de novidade, aplicação industrial, atividade inventiva e suficiência descritiva e para concessão do Certificado de Proteção de Cultivares exige-se requisitos de novidade, distinguibilidade, homogeneidade, estabilidade e denominação própria.

No Brasil, a proteção dos direitos relativos à propriedade intelectual referente à cultivar é amparada pela Lei n° 9.456, de 25 de abril de 1997, conhecida como Lei de Proteção de Cultivares, a qual criou no âmbito do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), responsável pela gestão dos aspectos administrativos e técnicos da matéria. Dentre as diversas competências que lhe são atribuídas, destacam-se a análise de requerimentos e a outorga dos certificados de proteção aos obtentores (BRASIL, 1997; AVIANI, 2011a).

Esses certificados são considerados bem móveis para todos os efeitos legais e única forma de proteção de cultivares e de direito que poderá obstar a livre utilização de plantas ou de suas partes de reprodução ou de multiplicação vegetativa no País, conforme art. 2° da Lei de Proteção de Cultivares. Os direitos de exclusividade concedidos por essa lei não impedem o uso da cultivar protegida para obtenção de nova cultivar por terceiro, para fins de pesquisa, mesmo sem a autorização do detentor do direito (BRASIL, 1997; WOLFF, 2009).

De acordo com o art. 4° da Lei de Proteção de Cultivares, é passível de proteção a nova cultivar ou a cultivar essencialmente derivada, de qualquer gênero ou espécie vegetal. A solicitação de proteção, que só poderá se referir a uma única cultivar, deverá conter o requerimento e outros requisitos definidos na lei, além da comprovação das características de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) para cultivares nacionais e estrangeiras, previstos no art. 14, inciso VII (BRASIL, 1997).

Vale ressaltar que o termo cultivar (*cultivated variety*) corresponde à uma planta selecionada com base em características específicas, desejáveis do ponto de vista agrônomo (AVIANI, 2011b) e para a Lei de Proteção de Cultivares (BRASIL, 1997) é considerada sinônimo de variedade de planta ou espécie vegetal. Segundo o art. 3°, inciso IV: “cultivar: a variedade de qualquer gênero ou espécie vegetal superior que seja claramente distinguível de outras cultivares conhecidas por margem mínima de descritores, por sua denominação própria, que seja homogênea e estável quanto aos descritores através de gerações sucessivas e seja de espécie passível de uso pelo complexo agroflorestal, descrita em publicação especializada disponível e acessível ao público.”

De acordo com os arts. 11 e 12 da Lei de Proteção de Cultivares, o período de proteção

estabelecido no momento de concessão do certificado, pode variar de 15 a 18 anos conforme a espécie. Após o prazo de vigência, a cultivar cairá em domínio público e poderá ser utilizada livremente por qualquer pessoa, sem necessidade da autorização do titular da proteção (AVIANI, 2011c; BRASIL, 1997).

A obtenção do Certificado de Proteção, todavia, não habilita o titular a produzir ou comercializar a cultivar, que só ocorre com a inscrição no Registro Nacional de Cultivares (RNC) e no Registro Nacional de Sementes e Mudanças (RenaseM) (BRASIL, 2003; AVIANI, 2011c; LEITE; CAMPOS, 2011), atividades compreendidas pelo Sistema Nacional de Sementes e Mudanças - SNSM (instituído nos termos da Lei 10.711/2003 e de seu regulamento), que tem por objetivo garantir a identidade e a qualidade do material de multiplicação e de reprodução vegetal produzido, comercializado e utilizado em todo o território nacional (BRASIL, 2003).

#### **4.2.2 Proteção e testes de DHE**

No Brasil, os testes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) são necessários, segundo Aviani et al. (2008), para a comprovação das características na ocasião da proteção de cultivares e são realizados pelos melhoristas em estações experimentais. Esses testes seguem metodologia própria para cada espécie e exigem um conhecimento da espécie por parte do examinador.

Os conceitos de DHE são definidos pela Lei nº 9.456/97 (BRASIL, 1997) no art. 3º, incisos VI, VII e VIII. É considerada cultivar distinta, a que se distingue claramente de qualquer outra cuja existência na data do pedido de proteção seja reconhecida; cultivar homogênea, a que, utilizada em plantio, em escala comercial, apresente variabilidade mínima quanto aos descritores que a identifiquem, segundo critérios estabelecidos pelo órgão competente e; cultivar estável, aquela que reproduzida em escala comercial, mantenha a sua homogeneidade através de gerações sucessivas.

Segundo Machado (2011), a União Internacional para Proteção das Obtenções Vegetais (UPOV), elaborou documentos para definir os princípios gerais (todas as espécies) e específicos (cada gênero ou espécie) para as Diretrizes de DHE, conhecidos como TGP (*Technical Guideline Procedures*).

Dentre esses documentos, o TGP/ 7 se destaca por estabelecer orientação direta para o

desenvolvimento das Diretrizes de DHE da UPOV, cujos grupos técnicos produziram, também, diretrizes específicas de DHE para 264 gêneros ou espécies (UPOV, 2016; MACHADO, 2011).

O TGP/9 é um documento que descreve sobre avaliações da distinguibilidade, as quais podem ser realizadas visualmente ou por mensurações e são divididas em qualitativas, quantitativas e pseudoqualitativas, dependendo da sua forma de expressão (UPOV, 2015; MACHADO, 2011).

De acordo com Aviani (2011b), a distinguibilidade é assegurada pela comparação entre as cultivares por meio de um conjunto de características (morfológicas, fisiológicas ou moleculares) definidas pelo órgão de proteção e divulgadas em publicação oficial. Essas características também são conhecidas como descritores e são utilizados na identificação de cultivar, permitindo determinar quais deles diferenciam a nova cultivar de outras variedades conhecidas, portanto, distinguibilidade está diretamente relacionada à inovação.

As características qualitativas (QL) são autoexplicativas, independentemente significativas e expressas em estágios descontínuos, geralmente, não são influenciadas pelo ambiente e todos os níveis de expressão do fenótipo devem ser listados, porém, sua ordem não é importante. Características pseudoqualitativas (PQ) são aquelas que a expressão varia em mais de uma dimensão, entretanto, a amplitude da expressão é parcialmente contínua. Cada nível de expressão deve ser identificado de forma adequada para descrever a amplitude da característica, de forma semelhante às características qualitativas (descontínuas). As características quantitativas (QN) expressam toda a amplitude de variação, de um extremo ao outro. A amplitude de expressão é dividida em diversos estágios, para fins de descrição, gerando uma distribuição homogênea na escala. As Diretrizes de DHE não especificam a diferença necessária para distinguibilidade. No entanto, os estágios de expressão devem ser significativos para a avaliação de DHE (MACHADO, 2011).

A diferenciação entre duas cultivares utilizando características quantitativa é um pouco mais complexa do que quando usadas características qualitativas ou pseudoqualitativas. As avaliações devem ser mais minuciosas e efetuadas por meio de mensurações, que consomem mais tempo e requerem uso de ferramentas estatísticas (SANTOS, 2011a).

O TGP/10 é um documento da UPOV que contém duas abordagens para a avaliação de homogeneidade: plantas atípicas, cuja distinção é clara em relação às outras que compõem a cultivar e desvios-padrão, que são baseados nas estatísticas da comparação da cultivar candidata com as cultivares mais parecidas utilizadas no Teste de DHE. O método preconiza que uma cultivar candidata não deve ser significativamente menos homogênea do que as cultivares mais

parecidas (UPOV, 2008; SANTOS, 2011b).

A observação da homogeneidade ocorre por meio da variação na expressão de características dentro das cultivares. Essa variação é resultado da combinação dos componentes genéticos e ambientais. A variação devido a influência ambiental é caracterizada pelo tipo de expressão da característica: qualitativa (QL), pseudoqualitativa (PQ) ou quantitativa (QN), sendo maiores para características quantitativas e pseudoqualitativas. Já o componente genético é influenciado principalmente pelo modo de propagação da cultivar, em cultivares alógamas (incluindo variedades sintéticas), espera-se uma variação genética bem maior do que em cultivares com outras formas de propagação (UPOV, 2008; SANTOS, 2011b).

A verificação da estabilidade em um Teste de DHE não é tão claramente definida como a distinguibilidade e homogeneidade, e segundo Santos e Machado (2011), a experiência tem demonstrado que, na maioria das situações, uma cultivar homogênea será estável.

### **4.3 Marcadores moleculares**

#### **4.3.1 Aspectos gerais**

Marcadores moleculares do DNA e tecnologias da engenharia genética têm sido utilizados como ferramentas auxiliares nas diferentes etapas do melhoramento genético, que vão desde a caracterização do germoplasma até as etapas finalísticas de desenvolvimento e seleção de plantas melhoradas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; VIEIRA et al., 2005; PEREIRA et al., 2005; FALEIRO, 2007; FERREIRA; FALEIRO, 2008; FALEIRO, 2011).

De acordo com Faleiro (2011), os marcadores moleculares permitem gerar uma grande quantidade de informações a respeito da identidade genética, diversidade, frequência gênica, relacionamentos filogenéticos, mapeamento genético, seleção assistida, entre outras. Essas informações são extremamente úteis para as etapas de conservação, caracterização e uso efetivo dos recursos genéticos nos programas de melhoramento e também em etapas ligadas aos ciclos de seleção e recombinação e ao pós-melhoramento (FALEIRO et al., 2008b).

Em maracujazeiro-azedo, os marcadores moleculares podem ser utilizados de forma eficiente nas diversas etapas dos programas de melhoramento. Na etapa de pré-melhoramento eles são utilizados na caracterização e na avaliação de bancos de germoplasma, no mapeamento e na análise de genes de interesse. Na etapa do melhoramento propriamente dito, os marcadores são empregados tanto no melhoramento populacional quanto nas atividades de hibridação,

auxiliando a maximização não só dos ganhos genéticos, mas também da heterose. Na etapa de pós-melhoramento, podem ser utilizados para assegurar a paternidade de cultivares, seminais ou clonais, desenvolvidas e monitorar a pureza das sementes ou clones produzidos e repassados aos agricultores (PEREIRA et al., 2005).

Os marcadores moleculares de acordo com Faleiro (2007) e Ferreira (2008), diferentemente dos descritores morfológicos, possuem número de polimorfismo ilimitado, não sofrem influência ambiental e podem ser analisados em qualquer estágio da planta. A aplicação desses marcadores tem complementado a caracterização dos bancos de germoplasma, possibilitando a obtenção de grande volume de informações para facilitar o manejo dos bancos e também para potencializar o uso dos recursos genéticos em programas de melhoramento (FALEIRO, 2007).

Dentre os marcadores moleculares, o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) apresenta como principais vantagens a facilidade e rapidez na obtenção dos marcadores, a necessidade de quantidades mínimas de DNA e a universalização das análises, ou seja, pode ser utilizado para qualquer espécie. Esses marcadores têm como características principais a obtenção de '*fingerprints*' (impressões digitais) genômicos de indivíduos, variedades e populações, a análise estrutural e diversidade genética em populações de melhoramento e bancos de germoplasma, o estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies, a construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e a localização de genes de interesse econômico (FALEIRO, 2007).

Os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) são fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb onde o procedimento de obtenção é baseado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando *primers* com sequências repetidas de nucleotídeos (microssatélites). Os *primers* para ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) amplificam grande número de bandas informativas por reação e não há necessidade de conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para construção do *primer* utilizado (FALEIRO, 2007), motivo pelo qual é amplamente utilizado em estudos de diversidade e variabilidade genética, além de ter baixos custos de desenvolvimento e os procedimentos laboratoriais poderem ser transferidos para qualquer espécie de planta (BARTH et al., 2002). Os *primers* são compostos por uma sequência do microssatélite usualmente de 16 a 25 pb de comprimento, que é utilizado para amplificar principalmente as sequências Inter-SSR de diferentes tamanhos (FALEIRO, 2007).

Existem também os marcadores obtidos a partir de regiões do DNA com microssatélites SSR (sequências simples repetidas) que são sequências curtas (1 a 6 pb), repetidas em tandem,

distribuídas aleatoriamente (FALEIRO, 2007). São muito mais frequentes e distribuídos ao acaso, permitindo a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto.

Entre os marcadores citados acima, de acordo com Moe et al. (2010), os SSR's se destacam por serem abundantes no genoma, codominantes, multialélicos, possuem boa reprodutibilidade e ampla cobertura do genoma.

Os marcadores microssatélites apresentam como vantagens a expressão codominante e o multialélicismo. Os marcadores SSR possuem o mais elevado conteúdo de informações de polimorfismo na terminologia de marcadores moleculares, facilidade de detecção por reação de cadeia da polimerase (PCR), possíveis localizações dos microssatélites, reprodutibilidade e facilidade de interpretação além da possibilidade de detecção de vários marcadores no mesmo gel (multiplex) sendo mais rápido e eficiente quando comparado a outros tipos de marcadores (BUSO, 2003; FALEIRO, 2007; BORÉM; MIRANDA, 2009; MOE et al., 2010; ARAGÃO, 2011). Os marcadores SSR revelam polimorfismo em um *loco* devido a diferença no número de vezes em que um nucleotídeo se repete naquele *loco* (BUSO, 2003).

Para os marcadores SSR, os *primers* utilizados para a amplificação via PCR são específicos, e se anelam nas regiões que flanqueiam os microssatélites, geralmente com tamanho entre 20 e 30 pb, número suficientemente grande para que estes *primers* não encontrem outra sequência complementar que não a do microssatélite, o que restringe o uso à espécie para a qual os *primers* foram construídos. Com isso, é necessário primeiramente o desenvolvimento dos *primers* para a espécie por meio da construção de bibliotecas genômicas, seleção de clones positivos utilizando-se como sondas sequências repetitivas, e posterior sequenciamento para finalmente desenhar os *primers*, que em alguns casos, poderão ser usados em espécies geneticamente relacionadas (FALEIRO et al., 2003; HOFFMANN; BARROSO, 2006). As novas tecnologias de sequenciamento de alto desempenho têm permitido a obtenção de grande quantidade de *primers* para obtenção de marcadores microssatélites para diferentes espécies do gênero *Passiflora* (ARAYA, 2016).

### 4.3.2 Marcadores e proteção de cultivares

Considerando a definição de descritor prevista na Lei de Proteção de Cultivares, que o define como “característica morfológica, fisiológica, bioquímica ou molecular que seja herdada geneticamente, utilizada na identificação de cultivar” (BRASIL, 1997), as técnicas moleculares vêm sendo utilizadas no âmbito da proteção de cultivares como ferramentas auxiliares nas análises dos processos, no sentido de comprovação da origem genética da cultivar (teste de paternidade), na identificação de cultivares em casos de uso indevido e em atividades de fiscalização (AVIANI; SANTOS, 2011).

De acordo com Aviani e Santos (2011), os perfis genéticos (“fingerprinting”) de cultivares, obtidos por meio de marcadores, podem ser anexados ao pedido de proteção pelos obtentores para fins de caracterização de cultivares, embora não apresentem caráter decisivo. A possibilidade de utilização de marcadores moleculares é prevista no documento TGP/15 (UPOV, 2013) e a Instrução Normativa nº 58/2009 estabeleceu os procedimentos para envio e recebimento de DNA genômico de cultivar protegida ou candidata à proteção.

Os tipos de marcadores que podem ser utilizados são: microssatélites ou Single Sequence Repeat (SSR), Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs), Cleaved Amplified Polymorphic (CAPS) e Sequence-characterized Amplified Regions (SCAR). Entre eles, o mais difundido é o SSR. O emprego dos marcadores CAPS e SCAR na definição de perfis de DNA das cultivares ainda é pouco explorado e os SNPs possuem um custo de análise dispendioso quando comparado aos demais e poucas espécies possuem plataformas de genotipagem disponíveis para este tipo de marcador (AVIANI; SANTOS, 2011).

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABF, **ANÚARIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA**, Michelle Treichel ... [et al.]. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016. 88 p.: il.

ARAGÃO de, F.A.S. **Divergência genética de acessos e interação genótipo x ambiente de famílias de meloeiro**. 2011. 137 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Melhoramento Genético Vegetal). Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2011.

ARAYA, S. Desenvolvimento, validação, transferibilidade e aplicação de marcadores microssatélites em estudos genéticos das Passifloras. 2016. 283f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

AVIANI, D.M. Escopo do direito do titular. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de Cultivares no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, Brasília: Mapa/ACS, 2011c. p.65-71.

AVIANI, D.M. Proteção de cultivares no Brasil. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de Cultivares no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, Brasília: Mapa/ACS, 2011a. p.27-33.

AVIANI, D.M. Requisitos para a proteção. In BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de Cultivares no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, Brasília: Mapa/ACS, 2011b, p.37-43.

AVIANI, D.M.; SANTOS, F.S. Uso de marcadores moleculares em proteção de cultivares. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de Cultivares no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, Brasília: Mapa/ACS, 2011. p.155-158.

AVIANI, D.M.; SANTOS, F.S.; CARVALHO, I.M.; MACHADO, V.L.S., PACHECO, L.G.A. Abordagem sobre proteção e registro de cultivares. In: FALEIRO, F.G.; FARIAS NETO, A.L.; RIBEIRO JÚNIOR, W.Q. (Ed.) **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008, p.165-183.

BARTH, S.; MELCHINGER, A. E.; LUBBERSTEDT, T. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, v.11, p.495-505, jul. 2002.

BENEVIDES, C.R., GAGLIANONE, M.C., HOFFMANN, M. Visitantes florais do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg. *Passifloraceae*) em áreas de cultivo com diferentes proximidades a fragmentos florestais na Região Norte Fluminense, RJ. **Revista Brasileira de Entomologia**, 2009, 53(3): 415–421.

BERNACCI, L.C. (Coord.) *Passifloraceae*. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHEERD, 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.

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: Embrapa Cerrados, 2005. p. 559-586.

BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.; SOARES-SCOTT, M.D. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 2, p. 355-356, 2003.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. 5.ed. Viçosa: Editora da UFV, 2009, 529p.

BRASIL. **Lei N° 9.456**, de 25 de abril de 1997. Institui a Lei de Proteção de Cultivares e dá outras providências. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/L9456.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9456.htm)> Acesso em: 05 nov. 2014.

BRASIL. **Lei N° 10.711**, de 05 de agosto de 2003. Dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudas e dá outras providências. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/2003/110.711.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/110.711.htm)>. Acesso em: 06 jan. 2015.

BRASIL. **Lei N° 13.123**, de 20 de maio de 2015. Regulamenta o inciso II do § 1° e o § 4° do art. 225 da Constituição Federal, o Artigo 1, a alínea j do Artigo 8, a alínea c do Artigo 10, o Artigo 15 e os §§ 3° e 4° do Artigo 16 da Convenção sobre Diversidade Biológica, promulgada pelo Decreto no 2.519, de 16 de março de 1998; dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade; revoga a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001; e dá outras providências. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2015-2018/2015/Lei/L13123.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2015/Lei/L13123.htm)>. Acesso em: 10 mar. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Formulário 3 - Espécies em regime de proteção: instruções de DHE e tabela de Descritores Mínimos**. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/protecaocultivares/formulariosprotecaocultivares/MARACUJA\\_OUTRAS\\_SPP\\_FORMULARIO\\_16DEZ2008\\_P.doc](http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/protecaocultivares/formulariosprotecaocultivares/MARACUJA_OUTRAS_SPP_FORMULARIO_16DEZ2008_P.doc)>. Acesso em: 29 dez. 2016.

BRUCKNER, C.H. Perspectivas do melhoramento do maracujazeiro. In: Manica, I (Ed.) **Maracujá: temas selecionados**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997.p.25-46.

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. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.317-338.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V. Marcadores Microsatélites em Espécies Vegetais. Desenvolvimento e Caracterização de Marcadores Microsatélites em Espécies Vegetais Tropicais. **Biotecnologia, Ciência e**

**Desenvolvimento.** Brasília, Ed. 30. P. 46-50. Jan-jun. 2003.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M. **Diversidade genética molecular e reação a doenças de acessos silvestres e comerciais de maracujazeiro (*Passiflora spp.*) presentes em bancos de germoplasma.** Campinas, 2014. 196f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, 2014.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; JESUS, O.N.; SANTOS, E.S.L.; CORRÊA, R.X.; SOUZA, A.P. Genetic breeding and diversity of the genus *Passiflora*: progress and perspectives in molecular and genetic studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, n.8, p. 14122-14152, 2014.

CERVI, A.C. O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. **Adumbrationes ad Summae Editionem**, v.16, p.1-5, 2006.

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

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

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Memória do Lançamento dos Híbridos de Maracujazeiro Ornamental.** Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/lancamentoorneamental/>>. Acesso em: 20 jan. 2017a.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Lançamento da cultivar de maracujazeiro silvestre BRS Pérola do Cerrado.** Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/lancamentoperola/>>. Acesso em: 20 jan. 2017b.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Lançamento Oficial da Cultivar de Maracujazeiro Silvestre BRS Sertão Forte (BRS SF).** Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/lancamentosertaoforte/>>. Acesso em: 20 jan. 2017c.

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

FALEIRO F.G., JUNQUEIRA N.T.V., BRAGA M.F., PEIXOTO J.R. Pré-melhoramento do maracujá. In: LOPES, M.A.; FÁVERO, A.P.; FERREIRA, M.A.J.F.; FALEIRO, F.G.; FOLLE, S.M.; GUIMARÃES, E.P. (Ed.). **Pré-melhoramento de plantas: Estado da arte e experiências de sucesso.** Embrapa Informações Tecnológicas, Brasília, DF, 2011, p.549-570.

FALEIRO, F.G. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento vegetal. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M.; REIS JUNIOR, F.B. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011, p.55-118.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de**

**conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102p. il.

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.; 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. (Ed.). **Agricultura Tropical: Quatro Décadas de Inovações Tecnológicas, Institucionais e Políticas.** 1 ed. Brasília: Embrapa, 2008a. p. 411-416.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; COSTA, A.M. **Ações de pesquisa e desenvolvimento para o uso diversificado de espécies comerciais e silvestres de maracujá (*Passiflora* spp.).** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2015. (Documentos, N° 329). 26p.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; JESUS, O.N.; COSTA, A.M. Avanços e perspectivas do melhoramento genético de *Passifloras* no Brasil. In: CARRANZA, C.J.; OCAMPO, D.; MIRANDA, D.; PARRA, M.; CASTILLO, J.; RODRÍGUES, A. (Ed.) **Libro de memorias - Congreso Latinoamericano de Pasifloras.** Corporación Cepass Colombia: Neiva, Huila, Colômbia. 2013. p. 12-23.

FALEIRO, F.G.; PIRES, J.L.; LOPES, U.V. Uso de marcadores moleculares RAPD e microssatélites visando a confirmação da fecundação cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. **Agrotropica**, Itabuna, v.15, p.41-46, 2003.

FERRARI, R.A.; COLUSSI, F.; AYUB, R.A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá – aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v.26, n.1, p.101-102, 2004.

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. Genotipagem de coleções de germoplasma vegetal. In: FALEIRO, F.G.; FARIAS NETO, A.L.; RIBEIRO JÚNIOR, W.Q. **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2008. p. 75-89.

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.

GONDIM, J.A.M.; MOURA, M.F.V.; DANTAS, A.S.; MEDEIROS, R.L.S.; SANTOS, K.M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, p. 825-827, 2005.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding** 2. Ed. Ames: Iowa State University Press, 1988. 468 p.

HEIDEN, G. Maracujá: A religiosidade como agente dispersor. 531-552. In: BARBIERI, R.L.; STUMPF, E.R.T. **Origem e evolução das plantas cultivadas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008, p. 531-552.

HOFFMANN, L.V.; BARROSO, P.A.V. **Marcadores Moleculares como Ferramentas para Estudos de Genética de Plantas**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 36p.

JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J.; FALEIRO, F.G.; SOARES, T.L.; GIRARDI, E.A. **Descritores morfoagronômicos ilustrados para *Passiflora* spp.** Brasília, DF: Embrapa, 2016. 122p.

JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J.; SOARES, T.L.; FALEIRO, F.G. **Aplicação de descritores morfoagronômicos utilizados em ensaios de DHE de cultivares de maracujazeiro-doce, ornamental, medicinal, incluindo espécies silvestres e híbridos interespecíficos (*Passiflora* spp.): manual prático**. Brasília, DF: Embrapa, 2015. 45p.

JUNQUEIRA, N.T.V.; ANJOS, J.R.N.; SILVA, A.N.P.; CHAVES R.C.; GOMES, A.C.; Reaction to diseases and yield of eleven cultivars of sour-passion fruit cultivated with no pesticides. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 38: 1005-1010, 2003.

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

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. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81-108.

LEITÃO FILHO, H. F.; ARANHA, C. **Botânica do Maracujazeiro**. In: SIMPÓSIO DA CULTURA DO MARACUJÁ, 1, 1974, Campinas. Resumos... Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1974. p. 13.

LEITE, M.V.; CAMPOS, S.R.F. Aspectos legais da produção, comercialização e do uso de sementes no Brasil. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de Cultivares no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, Brasília: Mapa/ACS, 2011. p.93-96.

MACHADO, R.Z. Elaboração de diretrizes de distiguibilidade, homogeneidade e estabilidade. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de Cultivares no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento

Agropecuário e Cooperativismo, Brasília: Mapa/ACS, 2011, p.121-142.

MELETTI, L.M.M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, Volume Especial, E. 083-091, 2011.

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

MOE, K.T., ZHAO, W.G., SONG, H.S., KIM, Y.H., CHUNG, J.W., CHO, Y.I., PARK, P.H., PARK, H.S., CHAE, S.C., PARK, Y.J. Development of SSR markers to study diversity in the genus. **Cymbidium.Biochemical Systematics and Ecology**, v.38, p.585-594, 2010.

NASCIMENTO, E.M.G.C.; ASCHERI, J.L.R.; CARVALHO, C.W.P.; GALDEANO, M.C. Benefícios e perigos do aproveitamento da casca de maracujá (*Passiflora edulis*) como ingrediente na produção de alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v.72, n.3, p.1-11, 2013.

NUNES, T.S.; QUEIROZ, L.P. A família Passifloraceae na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus**, v. 1, n. 1, p. 33-46, 2001.

NUNES, T.S.; QUEIROZ, L.P. Flora da Bahia: *Passifloraceae*. **Sitientibus**, 2006, v.6, n.3, p. 194-226.

OLIVEIRA, J.C.; NAKAMURA, K.; MAURO, A.O.; CENTURION, M.A.P.C. Aspectos gerais do melhoramento do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.) **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista: UESB, 1994.p. 27-37.

OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônomo. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 143-158.

OLIVEIRA, L.F.; NASCIMENTO, M.R.F.; BORGES, S.V.; RIBEIRO, P.C.N.; RUBACK, V.R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* F. *flavicarpa*) para produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 22: 259-262, 2002.

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

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.

RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A.R.; VOLPE, C.A.; OLIVEIRA, J.C. de; DURIGAN, J.F.; BAUMGARTNER, J.G.; SILVA, J.R.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, M.E.; KAVATI, R.;

PEREIRA, V. de P. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília, MAARA, Secretaria de Desenvolvimento Rural, Embrapa-SPI, 1996. 64p. (Série Publicações Técnicas FRUPEX, 19).

SANTOS, F.S. Analisando a distinguibilidade. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de Cultivares no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, Brasília: Mapa/ACS, 2011a. p.169-176.

SANTOS, F.S. Analisando a homogeneidade. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de Cultivares no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, Brasília: Mapa/ACS, 2011b. p.177-182.

SANTOS, F.S.; MACHADO, R.Z. Analisando a estabilidade. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de Cultivares no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, Brasília: Mapa/ACS, 2011. p.183-185.

TEIXEIRA, C. G. Cultura. In: **Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. 2ª ed. rev. e ampl. Campinas: ITAL, 1994. p. 1-142 (Série Frutas Tropicais, 9).

ULMER T., MACDOUGAL J. M. **Passiflora: Passionflowers of the world**. Portland: Timber Press, 2004. 27 p.

UPOV. INTERNATIONAL UNION FOR THE PROTECTION OF NEW VARIETIES OF PLANTS. **Document TGP/7 Development of Test Guidelines**, October 28, 2016. Disponível em: < [http://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp\\_7.pdf](http://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp_7.pdf)> Acesso em: 13 dez. 2016.

UPOV. INTERNATIONAL UNION FOR THE PROTECTION OF NEW VARIETIES OF PLANTS. **Document TGP/9 “Examining Distinctness”**, October 29, 2015. Disponível em: < [http://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp\\_9.pdf](http://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp_9.pdf)> Acesso em: 13 dez. 2016.

UPOV. INTERNATIONAL UNION FOR THE PROTECTION OF NEW VARIETIES OF PLANTS. **Document TGP/10 “Examining Uniformity”**, October 30, 2008. Disponível em: < [http://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp\\_10.pdf](http://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp_10.pdf)> Acesso em: 13 dez. 2016.

UPOV. INTERNATIONAL UNION FOR THE PROTECTION OF NEW VARIETIES OF PLANTS. **Document TGP/15 Guidance on the use of biochemical and molecular markers in the examination of Distinctness, Uniformity and Stability (DUS)** October 24, 2013. Disponível em: < [http://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp\\_15.pdf](http://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp_15.pdf) > Acesso em: 13 dez. 2016.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. 3ª ed. Cambridge: The MIT Press, 2000. 224 p.

VIANA, A.A.N. A proteção de cultivares no contexto da Ordem Econômica Mundial. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de Cultivares no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, Brasília: Mapa/ACS, 2011. p.11-16.

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

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.

WOLFF, S. **Subsídios ao IV Relatório Nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica - CDB: Diagnóstico sobre a Legislação Ambiental Brasileira**. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Departamento de Conservação da Biodiversidade. 2009, 120p.

---

## **CAPÍTULO 1**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E MOLECULAR DE SELEÇÕES DE  
MARACUJAZEIRO SILVESTRE *Passiflora cincinnata* MAST.**

**MORPHOAGRONOMIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF  
SELECTIONS OF WILD PASSION FRUIT *Passiflora cincinnata* MAST.**

## RESUMO

A espécie de maracujazeiro silvestre *Passiflora cincinnata* Mast. é amplamente distribuída nas regiões Centro-Oeste e Nordeste, além do Estado de Minas Gerais. Muitos acessos dessa espécie são resistentes à antracnose, toleram bem a seca e o fogo e apresentam boa conservação pós-colheita. Descritores morfoagronômicos e moleculares são importantes para a caracterização desses significativos recursos genéticos, além de serem requisitos básicos para o registro e proteção de cultivares no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Neste trabalho, objetivou-se realizar a caracterização morfoagronômica e molecular de 12 plantas selecionadas de *P. cincinnata*. Para a caracterização morfoagronômica foram avaliadas 33 características qualitativas e quantitativas categóricas. Foram estimadas distâncias genéticas entre as plantas selecionadas baseadas nos descritores de folha, flores e frutos. Para a caracterização molecular, amostras de DNA genômico de cada uma das 12 plantas foram extraídas e amplificadas via Reação em Cadeia Polimerase utilizando-se nove *primers* decâmeros para RAPD e sete *primers* para ISSR. Calculou-se o nível de entropia e a correlação entre descritores morfoagronômicos e moleculares. Alguns descritores morfoagronômicos não permitiram a diferenciação das 12 plantas e os acessos 2 e 4 são iguais quanto à classificação categórica. Foram obtidos 110 marcadores RAPD e 154 marcadores ISSR, os quais foram transformados em dados binários. Os coeficientes de dissimilaridade genética foram próximos de zero, entretanto, foi possível verificar a variabilidade genética entre as 12 plantas, sendo que a planta 7 foi a mais divergente das demais plantas selecionadas. Verificou-se a utilidade e a complementaridade dos descritores morfoagronômicos e marcadores moleculares no estudo da variabilidade genética de plantas selecionadas de *P. cincinnata*.

**Palavras-chave:** *Passiflora* spp., proteção de cultivares, variabilidade genética, descritores, marcadores de DNA.

## ABSTRACT

*Passiflora cincinnata* Mast. is widely distributed in the Midwest and Northeast regions in Brazil, besides the state of Minas Gerais. Many accessions of this species are resistant to anthracnose, shows drought and fire tolerance and present long time of postharvest conservation. Morphoagronomic and molecular descriptors are important for the characterization of these significant genetic resources. This characterization is a basic requirement for the variety registration and protection in the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA). In this work, the purpose was to perform a morphoagronomic and molecular characterization of 12 selected plants of *P. cincinnata*. For the morphoagronomic characterization, 33 categorical qualitative and quantitative characteristics were evaluated. Genetic distances were estimated among the selected plants based on leaf, flower and fruit descriptors. For molecular characterization, genomic DNA samples from 12 plants were extracted and amplified via Polymerase Chain Reaction using nine decamer primers for RAPD and seven primers for ISSR. The level of entropy and the correlation between morphoagronomic and molecular descriptors were calculated. Some morphoagronomic descriptors did not allow the differentiation of the 12 plants and the accesses 2 and 4 were equal in categorical classification. A total of 110 RAPD markers and 154 ISSR markers were obtained, which were transformed into binary data. The genetic dissimilarity coefficients were close to zero however, it was possible to verify the genetic variability among 12 selected plants. Plant number 7 is the most divergent among other selected plants. It could be concluded that the morphoagronomic descriptors and molecular markers in the genetic variability studies of selected *P. cincinnata* plants were useful and complemented each other.

**Keywords:** *Passiflora* spp., variety protection, genetic variability, descriptors, DNA markers.

## 1.1 INTRODUÇÃO

O maracujá é originário da América Tropical e Subtropical e pertence à família Passifloraceae, a qual apresenta mais de quinhentas e oitenta espécies (OLIVEIRA; RUGGIERO, 2005). O Brasil é um dos mais importantes centros de diversidade dos maracujás, contando com mais de 200 espécies do gênero *Passiflora* nativas do País (FERREIRA, 1994).

O Brasil é o maior produtor de maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims) e várias doenças tem afetado a cultura. A utilização da ampla diversidade genética do gênero *Passiflora* tem contribuído com programas de melhoramento genético a fim de proporcionar resistência ou tolerância a doenças, longevidade, adaptação a condições climáticas adversas, além de contribuir com outras aptidões do gênero como potencial ornamental, medicinal e de frutas especiais. Essa diversidade genética pode ser obtida das espécies silvestres, entre as quais se destacam *P. setacea*, *P. cincinnata*, *P. caerulea*, *P. incarnata*, *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. nitida* e *P. quadrangularis* (MELETTI et al., 2005; CERQUEIRA-SILVA, 2016).

A espécie *Passiflora cincinnata* Mast. é também conhecida por maracujá-do-cerrado, maracujá-do-mato, maracujá-brabo, maracujá-de-casca-verde, maracujá-mochila, maracujá-tubarão, maracujá-de-vaqueiro. É uma espécie polimorfa, apresentando variabilidade quanto ao tamanho do fruto, cor da flor, cor e gosto do suco. Pode ser encontrada em vegetação tipo Cerrado *stricto sensu*, Campo sujo, Campo limpo, capoeiras, em bordas de Cerradão ou em Matas ciliares. É amplamente distribuída na região Centro-Oeste, Nordeste e em Minas Gerais. A comercialização da fruta e o consumo do suco dessa fruta é comum em algumas cidades do Estado da Bahia, Minas Gerais e Goiás (BRAGA et al., 2006; OLIVEIRA; RUGGIERO, 2005).

De acordo com a descrição botânica, a espécie *Passiflora cincinnata* é uma planta trepadeira, glabra, raramente aveludada-pilosa. Possui caule cilíndrico ou subangular e pecíolos de 1,5 a 5 cm, biglandulares, com glândulas sésseis de aproximadamente 0,2 cm de diâmetro. As folhas são simples, 3-5 palmatipartidas; verdes escuras na face abaxial, verdes pálidas na face adaxial; finamente serrilhadas, crenada-serrilhadas ou subinteiras, com 8 cm de comprimento e 8 a 10 cm de largura. Brácteas foliáceas, ovais, obtusas e glandulares na base, com 0,2 a 0,4 cm de comprimento e 0,15 a 0,25 cm de largura. Flores de 7 a 12 cm de diâmetro. Tubo do cálice é curto e campanulado. Sépalas apresentam 3 a 5 cm de comprimento e 1 a 2 cm de largura, subcoriáceas, internamente azul rosadas ou violetas, externamente verdes e dorsalmente corniculadas. Pétalas azul-rosadas ou violetas, com 2,5 a 3 cm de comprimento e 0,8 a 1,0 cm de largura. Corona de filamentos em várias séries; com 2 a 4 cm, purpúreos na

metade inferior, bandeados de azul-rosado escurecido, azul-pálido no centro e azul na metade superior; as séries seguintes constituídas de filamentos lineares, de 0,3 a 0,5 cm, brancos na metade inferior; as 4 últimas séries, formadas de filamentos capilares de 1 a 2 cm, azul-pálidos e brancos; e androginóforo de 1,5 cm. Os frutos são ovoides, apresentando 5 a 6 cm de comprimento e 3 a 4 cm de largura, com sementes ovais, de 0,5 a 0,6 cm de comprimento e 0,4 cm de largura (CERVI, 1997; OLIVEIRA; RUGGIERO, 2005).

Essa espécie silvestre de maracujá possui características interessantes a serem consideradas em programas de melhoramento de maracujazeiro, tais como resistência a antracnose, tolerância à seca, boa conservação pós colheita, e sua safra coincide com a entressafra do maracujazeiro azedo (BRAGA et al., 2006). Diante dessa potencialidade, a Embrapa e parceiros realizam trabalhos de caracterização de germoplasma e de melhoramento genético desta espécie. A cada ano, são feitos ciclos de seleção e recombinação e em 2016 foi feito o lançamento da primeira cultivar dessa espécie (EMBRAPA, 2017).

Segundo Braga et al. (2006), sua produção é muito variável, existindo acessos muito produtivos (até 15 kg de frutos/planta/ano em condições de cultivo) e de frutos grandes. Suas flores são decorativas, podendo ser utilizadas com finalidade ornamental, geralmente abrem-se pela manhã e são polinizadas por insetos, principalmente pela mamangava (*Xylocopa* spp.).

Os descritores morfoagronômicos são importantes para a caracterização de espécies, além de serem requisitos básicos para o registro e proteção de cultivares. Para complementar as informações geradas pelos descritores morfoagronômicos, marcadores moleculares do DNA, como o RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) e o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), têm se mostrado eficientes na caracterização e na quantificação da variabilidade genética de várias espécies de plantas, motivo pelo qual vêm sendo utilizados como ferramenta auxiliar em programas de caracterização e uso de recursos genéticos e programas de melhoramento (FALEIRO, 2011). Para avançar nos estudos sobre recursos genéticos e melhoramento do maracujazeiro silvestre *Passiflora cincinnata* Mast, neste trabalho, objetivou-se realizar a caracterização morfoagronômica e molecular de plantas selecionadas, bem como estudar a importância de diferentes tipos de descritores e marcadores moleculares na caracterização e quantificação da variabilidade genética.

## 1.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.2.1 Caracterização morfoagronômica

A caracterização morfoagronômica das 12 plantas selecionadas de *Passiflora cincinnata* foi realizada no campo experimental da Unidade de Apoio da Fruticultura da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF (15°39'84" de latitude S e 47°44'41" de longitude W e altitude de 1.000 m). Essa caracterização foi baseada em 33 descritores morfoagronômicos para *Passiflora* spp. (ANEXO B) propostos pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (BRASIL, 2016). A mensuração das características quantitativas foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital e de um refratômetro digital conforme a necessidade de avaliação do descritor e, em seguida, atribuídos códigos sequenciais numéricos de acordo com a classe fenotípica dos descritores obtidos para cada planta de *P. cincinnata*. Para definição da classe fenotípica de cada descritor, foram analisadas, em média, 12 folhas, flores e frutos de cada planta, dependendo da disponibilidade. A classe fenotípica mais frequente (moda) foi utilizada para definir o código de cada descritor de cada planta selecionada.

A partir da distribuição de frequência das diferentes classes fenotípicas das 12 plantas selecionadas de *Passiflora cincinnata*, calculou-se o nível de entropia dos caracteres (H), por meio do coeficiente de entropia de Renyi:

$$H = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

onde:

H= entropia de n acessos em s classes fenotípicas do descritor considerado;

$p_i = f_i/n$  sendo:  $p_1 = f_1/n$  e  $(p_1 + p_2 + \dots + p_s = 1)$  desde que  $(n = f_1 + f_2 + \dots + f_s)$ , onde  $f_1, f_2, \dots, f_n$ , correspondem ao número de acessos em cada uma das classes fenotípicas (s) do descritor considerado.

A estimativa da entropia foi realizada com o auxílio do programa Multiv v.2.3 (PILLAR, 1997). A entropia de um determinado descritor será tão maior quanto maior for o número de classes fenotípicas e quanto mais equilibrada for a proporção entre a frequência dos acessos nas diferentes classes fenotípicas (VIEIRA et al., 2008).

A partir da matriz de descritores multicategóricos de cada planta, estimou-se a dissimilaridade genética entre as plantas selecionadas, considerando a análise de

correspondência simples que permite explorar um conjunto de dados multivariados de “n” indivíduos avaliados em “p” variáveis categóricas. A matriz de dissimilaridade genética das 12 plantas selecionadas de *Passiflora cincinnata* foi utilizada para realizar as análises de agrupamento por meio de dendrogramas, utilizando-se como critério o método do UPGMA (*Unweighted pair-group method arithmetic average*). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2013).

### 1.2.2 Caracterização molecular

A caracterização molecular das 12 plantas selecionadas de *Passiflora cincinnata*, utilizando marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), foi realizada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados, Planaltina-DF.

Amostras de DNA genômico de cada planta selecionada foram extraídas a partir do tecido foliar em estágio intermediário de maturação utilizando o método do CTAB, com modificações (FALEIRO et al., 2003). O tecido foliar fresco foi macerado mecanicamente com auxílio de nitrogênio líquido, almofariz e pistilo, posteriormente, foram adicionados em cada amostra, 800 µL de tampão contendo água Milli-Q, CTAB 7%, NaCl 5M, EDTA (0,5M), Tris-HCl (pH 8,0) 1M, PVP 40 (sólido) e β Mercaptoetanol. As amostras seguiram para banho-maria a 65 °C, por 1 hora. A desproteção foi realizada adicionando-se 700 µL de solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1); em seguida, as amostras foram agitadas e, na sequência, centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos, retirando-se, aproximadamente, 700 µL do sobrenadante que foi colocando em microtubos de 2 mL. Foram adicionados ao sobrenadante, 700 µL de isopropanol gelado (5°C), invertendo-se os microtubos para promover a precipitação do DNA. Os tubos foram colocados no freezer -20°C por 2 horas, foram centrifugados a 14.000 rpm, por dez minutos, descartando-se o sobrenadante. O pellet formado foi lavado duas vezes, com 300 µL de etanol a 70% e secado em ambiente escuro durante a noite. Após completamente seco, o pellet foi ressuscitado em 150 µL de água Milli-Q, contendo RNase na concentração de 40 µL/mL.

A quantidade de DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm (A260), e a relação A260/A280 foi utilizada para avaliar a pureza e a qualidade do material (SAMBROOCK et al., 1989). As amostras de DNA de cada acesso foram diluídas para 10ng/µL para RAPD e 5ng/µL

para ISSR.

Amostras de DNA de cada material genético foram amplificadas para obtenção de marcadores RAPD. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13  $\mu$ L, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 100  $\mu$ M de cada um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4  $\mu$ M de um primer (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 15  $\eta$ g de DNA.

Para obtenção dos marcadores RAPD foram utilizados nove *primers* decâmeros: OPD (04, 08), OPF (14), OPG (05 e 08) e OPH (04, 12, 16 e 17). As amplificações foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte sequência: 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.

Para marcadores ISSR, o DNA foi amplificado utilizando-se sete *primers* (ISSR-5, ISSR-6, ISSR-7, ISSR-8, ISSR-13, ISSR-14 e ISSR-15) e a seguinte reação: 20  $\eta$ g de DNA genômico, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, 0,3  $\mu$ M de primer em solução de 13  $\mu$ l contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 100  $\mu$ M de cada um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP). As amplificações foram efetuadas em termociclador programado por 5 minutos a 94 °C, 35 ciclos cada um constituído pela seguinte sequência: 40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 48 °C e 1 minuto a 72°C. Após os 35 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de dois minutos a 72 °C, e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C.

Após as amplificações via RAPD e ISSR, adicionou-se a cada amostra, 3  $\mu$ l de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores RAPD e ISSR gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as dissimilaridades genéticas entre os acessos, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, com o auxílio do Programa Genes (CRUZ, 2013).

As matrizes de dissimilaridades genéticas foram utilizadas para realizar análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando-se 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 (STATSOFT Inc, 1999).

O ajuste da matriz de dissimilaridade com o respectivo dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenético ( $r$ ), utilizando-se o programa NTSYS pc 2.1 (ROHLF, 2000).

A partir das matrizes de dissimilaridades genéticas obtidas com cada grupo de características (33 descritores categóricos totais, 11 descritores de folhas, 12 descritores de flores, 10 descritores de frutos, marcadores RAPD e ISSR) foram estimadas as correlações entre estas distâncias com base em cada grupo de descritores e marcadores moleculares, com base no coeficiente de correlação de Pearson, com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2013).

## **1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **1.3.1 Caracterização morfoagronômica**

Observou-se que a maioria dos descritores (73%) não apresentou polimorfismo, ou seja, a entropia foi nula ( $H=0$ ) para tais caracteres (Tabela 1). Apenas os descritores: coloração de ramo; forma, divisão e largura máxima do limbo foliar; comprimento do pecíolo; posição dos nectários; espessura da casca do fruto; coloração da polpa e número de sementes permitiram a diferenciação das 12 plantas. Todos descritores de flores apresentaram  $H=0$ , logo estes descritores não foram eficientes para diferenciar as plantas selecionadas da espécie *Passiflora cincinnata*. É importante mencionar que estas 12 plantas selecionadas passaram por ciclos de seleção e recombinação, havendo um certo estreitamento da base genética.

Os caracteres que destacaram por apresentar maior nível de entropia foram a espessura da casca (0,86), seguida da posição dos nectários, coloração da polpa e número de sementes (0,64). O maior nível de entropia está relacionado as diferentes frequências das classes fenotípicas apresentadas pelas 12 plantas selecionadas, evidenciando a variabilidade na expressão fenotípica, ocasionada pela variabilidade genética de plantas oriundas de sementes e o grau de polimorfismo dessa espécie, como por exemplo variação na coloração de polpa citado por Oliveira e Ruggiero (2005). Valores maiores de entropia podem ser verificados em estudos com maior número de acessos que apresentam maior variabilidade da espécie como foi relatado por Vieira et al. (2008) ao avaliar a variabilidade genética de 356 acessos de um banco de germoplasma de mandioca, o qual apenas um descritor (3,7%) apresentou  $H=0$ .

**Tabela 1.** Características avaliadas, classes fenotípicas e respectivas frequências, e entropia dos caracteres (H), considerando 12 plantas selecionadas de *Passiflora cincinnata* Mast. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

Característica	Classes fenotípicas	Frequência (%)	Entropia (H)
1.Ramo: coloração	verde-clara (1) verde-escura (2) verde-arroxeadada (3) roxa (4)	8% - 92% -	0,29
2.Limbo foliar: forma	lanceolada(1) ovada (2) cordata (3) oblonga (4) elíptica (5) fendida (6) partida (7) seccionada(8)	- - - - - 75% - 25%	0,56
3.Limbo foliar: divisão	simples (1) bilobada (2) trilobada (3) pentalobada (4) heptalobada (5)	- - 8% 92% -	0,29
4. Limbo foliar: comprimento	curto (3) médio (5) longo (7)	100% - -	0
5. Limbo foliar: largura máxima	estreita (3) média (5) larga (7)	17% 83% -	0,45
6. Limbo foliar: sinus	ausente (1) presente (2)	- 100%	0
7. Limbo foliar: profundidade do sinus	rasa (3) média (5) profunda (7)	- - 100%	0
8. Limbo foliar: bulado	ausente (1) presente (2)	100% -	0
9. Limbo foliar: pilosidade	ausente (1) presente (2)	- 100%	0
10. Pecíolo: comprimento	curto (3) médio (5) longo (7)	17% 83% -	0,45
11. Pecíolo: posição das glândulas (nectários)	adjacente ao limbo foliar (1) próximo ao meio do pecíolo (2) adjacente à inserção da folha no ramo (3) distribuídos ao longo do pecíolo (4)	- 67% 33% -	0,64
12. Flor: forma do hipanto	aplanada (1) campanulada (2) cilíndrica (3)	- 100% -	0
13. Flor: coloração predominante no perianto (sépalas e pétalas, internamente)	branca (1) rosada (2) vermelha (3) vermelha-arroxeadada (4) roxa (5) azul-arroxeadada (6)	- - - - - 100%	0

	azul (7)	-	
		-	
14. Flor: Período predominante de antese das flores	matutino (1) vespertino (2) noturno (3)	100% - -	0
15. Flor: comprimento da bráctea	curto (3) médio (5) longo (7)	- 100% -	0
16. Flor: comprimento da sépala	curto (3) médio (5) longo (7)	- 100% -	0
17. Flor: largura da sépala	estreita (3) média (5) larga (7)	- 100% -	0
18. Flor: comprimento da pétala	curto (3) médio (5) longo (7)	- 100% -	0
19. Flor: diâmetro da coroa	pequeno (3) médio (5) grande (7)	- - 100%	0
20. Flor: coloração predominante da coroa	branca (1) rosada (2) vermelha (3) vermelha-arroxeadada(4) roxa (5) azul-arroxeadada (6) azul (7)	- - - - 100% - -	0
21. Flor: bandeamento (anéis de cores diferentes entre si, inclusive brancos) nos filamentos mais longos da coroa	ausente (1) presente (2)	- 100%	0
22. Flor: número de anéis coloridos (excluídos os brancos) nos filamentos mais longos da coroa	um (1) mais de um (2)	- 100%	0
23. Flor: filamentos mais longos da coroa	lisos (1) ondulados (2)	- 100%	0
24. Fruto: forma	ovalada (1) oblonga (2) arredondada (3) oblata (4) elipsoide (5) fusiforme (6) oboval (7)	- - 100% - - - -	0
25. Fruto: diâmetro longitudinal	pequeno (3) médio (5) grande (7)	- 100% -	0
26. Fruto: diâmetro transversal	pequeno (3) médio (5) grande (7)	- 100% -	0
27. Fruto: coloração predominante da casca (epiderme)	verde (1) amarela (2) laranja (3) rosada (4) vermelha (5) roxa (6)	100% - - - - -	0
28. Fruto: lenticelas distribuídas em padrão de estria	ausente (1) presente (2)	100% -	0
29. Fruto: espessura da casca	muito fina (1) fina (2)	9% 64%	0,86

	média (3) espessa (4) muito espessa (5)	27% - -	
30. Fruto: tamanho da semente	pequeno (3) médio (5) grande (7)	- 100% -	0
31. Fruto: coloração da polpa	esbranquiçada (1) amarelo-esverdeada (2) amarela (3) amarelo-alaranjada (4) alaranjada (5) alaranjada-escura (6) vermelha (7)	- - 67% 33% - - -	0,64
32. Fruto: teor de sólidos solúveis totais	muito baixo (1) baixo (3) médio (5) alto (7) muito alto (9)	- 100% - - -	0
33. Fruto: número de sementes	muito pequeno (1) pequeno (3) médio (5) grande (7) muito grande (9)	- - 33% 67% -	0,64

Diferentes números de descritores foram obtidos para as 12 plantas selecionadas de *P. cincinnata* (Tabela 2). Foram obtidos todos os 33 descritores para as plantas 1, 5, 8, 10 e 12; 32 descritores para a planta 11; 30 descritores para as plantas 2, 3, 4, 7 e 9; e 11 descritores para a planta 6. Para muitos descritores, mais de uma classe fenotípica foi verificada em cada planta selecionada, evidenciando variações fenotípicas de folhas, flores e frutos na mesma planta. Araújo (2007) também verificou variação nas expressões das características entre acessos de *P. cincinnata*.

Segundo Cervi (1997), a espécie *P. cincinnata* apresenta folhas simples, 3-5 palmatipartidas. De acordo com os descritores morfoagronômicos obtidos relacionados ao limbo foliar, a espécie apresentou coloração do ramo predominantemente verde-arroxeadada; folhas predominantemente fendidas, pentalobadas (Figura 1A), pilosas, de comprimento curto, largura média e com sinus profundo; pecíolo de comprimento médio com nectários localizados próximos ao meio do seu comprimento. Descrições semelhantes quanto à largura do limbo foliar e comprimento de pecíolo foram citadas por Oliveira e Ruggiero (2005), entretanto, estes autores relataram maior comprimento do limbo foliar.

**Tabela 2.** Descritores avaliados e frequência da classe fenotípica em 12 plantas selecionadas de *Passiflora cincinnata*. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

DESC <sup>1</sup>	Plantas selecionadas											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1(33%) 3(67%)	3(100%)	1(4%) 3(96%)	1(30%) 3(70%)	1(24%) 3(76%)	1(95%) 3(5%)	1(25%) 3(75%)	1(40%) 3(60%)	1(25%) 3(75%)	1(41%) 3(59%)	1(24%) 3(76%)	1(26%) 3(74%)
2	6(100%)	6(5%) 8(95%)	6(83%) 8(17%)	6(15%) 8(85%)	6(81%) 8(19%)	6(95%) 8(5%)	6(90%) 8(10%)	6(85%) 8(15%)	6(15%) 8(85%)	6(59%) 8(41%)	6(71%) 8(29%)	6(100%)
3	4(100%)	4(100%)	3(4%) 4(96%)	4(100%)	3(19%) 4(81%)	4(100%)	4(100%)	3(5%) 4(95%)	3(5%) 4(95%)	3(27%) 4(73%)	3(81%) 4(19%)	3(39%) 4(61%)
4	3(100%)	3(95%) 5(5%)	3(83%) 5(17%)	3(100%)	3(95%) 5(5%)	3(100%)	3(100%)	3(95%) 5(5%)	3(100%)	3(100%)	3(100%)	3(100%)
5	3(29%) 5(71%)	3(40%) 5(60%)	3(29%) 5(71%)	3(40%) 5(60%)	3(29%) 5(71%)	3(20%) 5(80%)	3(35%) 5(65%)	3(10%) 5(90%)	3(30%) 5(70%)	3(55%) 5(45%)	3(52%) 5(48%)	3(43%) 5(57%)
6	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
7	7(100%)	5(5%) 7(95%)	7(100%)	7(100%)	5(5%) 7(95%)	7(100%)	7(100%)	7(100%)	7(100%)	5(14%) 7(86%)	7(100%)	7(100%)
8	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(95%) 2(5%)	1(100%)	1(100%)
9	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
10	3(48%) 5(52%)	3(35%) 5(65%)	3(17%) 5(83%)	3(35%) 5(65%)	3(24%) 5(71%) 7(5%)	3(60%) 5(40%)	3(45%) 5(55%)	3(25%) 5(75%)	3(45%) 5(55%)	3(55%) 5(45%)	3(33%) 5(67%)	3(39%) 5(61%)
11	2(43%) 3(57%)	2(15%) 3(85%)	2(4%) 3(96%)	2(25%) 3(75%)	2(67%) 3(33%)	2(100%)	2(95%) 3(5%)	2(85%) 3(15%)	2(65%) 3(35%)	2(95%) 3(5%)	2(76%) 3(24%)	2(61%) 3(39%)
12	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	-	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
13	2(6%) 5(94%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	-	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
14	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	-	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
15	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	-	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
16	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	-	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)

17	5 (97%) 7 (3%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5 (92%) 7 (8%)	-	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
18	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	-	5(100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
19	5 (6%) 7 (94%)	7(100%)	7(100%)	7(100%)	7(100%)	-	7(100%)	7(100%)	7(100%)	7(100%)	7(100%)	7(100%)
20	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	-	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
21	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	-	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
22	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	-	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)
23	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	-	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
24	3(100%)	3(100%)	3(100%)	3(100%)	3(100%)	-	3(100%)	3(100%)	3(100%)	3(100%)	3(100%)	3(100%)
25	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	-	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
26	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	-	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
27	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	-	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
28	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	-	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
29	1 (12%) 2 (63%) 3 (25%)	2(100%)	2 (67%) 3 (33%)	2 (67%) 3 (33%)	2 (37%) 3 (63%)	-	2(100%)	2 (17%) 3 (83%)	1 (67%) 2 (33%)	2 (57%) 3 (43%)	3(100%)	2 (75%) 3 (25%)
30	5(100%)	-	-	-	5(100%)	-	-	5(100%)	-	5 (80%) 7 (20%)	5(100%)	5(100%)
31	2 (80%) 3 (20%)	-	-	-	2 (80%) 3 (20%)	-	-	2(100%)	-	2 (80%) 3 (20%)	3(100%)	3(100%)
32	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	-	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2 (100%)	-	2(100%)
33	7(100%)	-	-	-	5 (60%) 7 (40%)	-	-	7(100%)	-	5 (20%) 7 (80%)	5(100%)	7(100%)

<sup>1</sup>Descritores 1 a 33 e respectivos códigos de classes fenotípicas - ver Tabela 1.

Quanto às flores, a espécie apresentou hipanto campanulado; perianto roxo (Figura 1B); antese matutina; bráctea, sépala e pétala de comprimento médio; sépala de largura média; corona roxa com diâmetro grande, com mais de um anel colorido nos filamentos mais longos, os quais são ondulados. Antese matutina também foi descrita por Oliveira e Ruggiero (2005) e relatada por Araújo (2007) e o comprimento de sépala foi semelhante às descrições de Cervi (1997) e Oliveira e Ruggiero (2005).

Os frutos apresentaram forma arredondada, com diâmetro longitudinal e transversal médios, casca verde e fina (Figura 1C), polpa amarelo-esverdeada com médio teor de sólido solúveis totais, grande número de sementes de tamanho médio. Transformando os dados quantitativos em códigos de acordo com a classe fenotípica, Magalhães (2010) observou resultados semelhantes para os descritores diâmetro longitudinal e transversal do fruto, espessura da casca, tamanho e número de sementes, apresentando diferença apenas no teor de sólidos solúveis totais, em seu estudo de caracterização de frutos de *P. cincinnata*. Diâmetro longitudinal e tamanho das sementes médios também foi citado por Oliveira e Ruggiero (2005), porém, a largura do fruto de 3,0 cm citada encaixa-se em pequena (<5cm), diferente da classificação média obtida no presente estudo. Vale ressaltar que a característica de frutos maiores foi utilizada como um dos critérios de seleção das plantas caracterizadas neste estudo, dentro do programa de melhoramento genético desta espécie realizado na Embrapa.



**Figura 1.** Estruturas de *Passiflora cincinnata* avaliadas: folha fendida pentalobada (A); flor com perianto e corona roxos com mais de um anel colorido (B); frutos médios com casca verde (C).

Observou-se diferentes porcentagens de classes fenotípicas entre as 12 plantas selecionadas de *Passiflora cincinnata* (Tabela 2), o que também foi observado por Araújo et al. (2008), que descreveu diferentes graus de discriminação dos descritores utilizados em um estudo de diversidade genética de 32 acessos de *P. cincinnata* com base em descritores

morfoagronômicos. Estas diferenças de classes fenotípicas entre plantas e acessos, evidencia a variabilidade genética intraespecífica.

As dissimilaridades genéticas entre as 12 plantas selecionadas de *P. cincinnata* calculadas com base na coincidência simples dos 33 descritores morfoagronômicos variaram de 0 a 0,364 (Tabela 3). Utilizando-se apenas os 11 descritores de folhas, a variação foi de 0 a 0,364 e utilizando-se apenas os 10 descritores de frutos, a variação foi de 0 a 0,333 (Tabela 4). Os 12 descritores de flores não apresentaram diferenças entre as 12 plantas selecionadas.

O coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ) foi de 0,85 para as análises dos 33 descritores categóricos, evidenciando consistência no ajuste entre a matriz de similaridade genética e sua representação gráfica (Figura 2).

É possível observar na matriz de dissimilaridade genética (Tabela 3) e na análise de agrupamento (Figura 2A) que a distância entre as plantas 1 e 3; 2 e 4; e 7 e 12 foi 0, ou seja, todas as características avaliadas apresentaram a mesma classificação quanto ao seu fenótipo, entretanto, apenas as plantas 2 e 4 coincidiram na dispersão gráfica (Figura 2B) pois nos outros dois casos a quantidade de descritores obtidos foram diferentes entre as plantas (Tabela 2). A análise de dispersão gráfica (Figura 2B) das plantas selecionadas apresenta resultado semelhante ao verificado na análise de agrupamento, evidenciando a maior dissimilaridade das plantas 6 e 11 em relação às demais plantas.

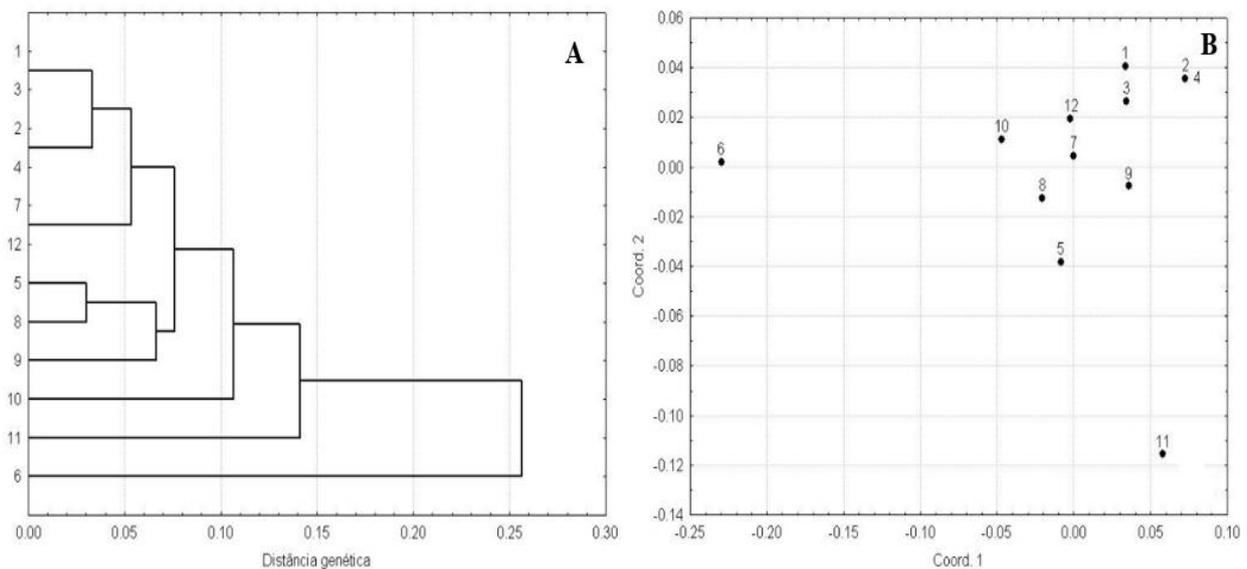
**Tabela 3.** Matriz de dissimilaridade genética entre 12 acessos de *Passiflora cincinnata*, calculada com base no índice de coincidência simples, utilizando 33 descritores morfoagronômicos para *Passiflora* spp. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

Planta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	0,033	0	0,033	0,091	0,273	0,033	0,061	0,100	0,091	0,188	0,061
2		0	0,033	0	0,100	0,364	0,067	0,100	0,067	0,133	0,172	0,067
3			0	0,033	0,067	0,273	0,033	0,067	0,100	0,100	0,138	0,033
4				0	0,100	0,364	0,067	0,100	0,067	0,133	0,172	0,067
5					0	0,182	0,033	0,030	0,067	0,121	0,094	0,091
6						0	0,182	0,182	0,273	0,182	0,364	0,182
7							0	0,033	0,067	0,067	0,103	0
8								0	0,067	0,091	0,125	0,061
9									0	0,133	0,138	0,067
10										0	0,156	0,091
11											0	0,125
12												0

**Tabela 4.** Matriz de dissimilaridade genética entre 12 acessos de *Passiflora cincinnata*, calculada com base no índice de coincidência simples, utilizando 12 descritores de folha (abaixo da diagonal) e 10 descritores de fruto (acima da diagonal). Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

Planta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	0	0	0	0,200	-	0	0,100	0,143	0	0,333	0,100
2	0,091	0	0	0	0,143	-	0	0,143	0,143	0	0,167	0
3	0	0,091	0	0	0,143	-	0	0,143	0,143	0	0,167	0
4	0,091	0	0,091	0	0,143	-	0	0,143	0,143	0	0,167	0
5	0,091	0,182	0,091	0,182	0	-	0,143	0,100	0,143	0,200	0,111	0,300
6	0,273	0,364	0,273	0,364	0,182	0	-	-	-	-	-	-
7	0,091	0,182	0,091	0,182	0	0,182	0	0,143	0,143	0	0,167	0
8	0,091	0,182	0,091	0,182	0	0,182	0	0	0,143	0,100	0,222	0,200
9	0,182	0,091	0,182	0,091	0,091	0,273	0,091	0,091	0	0,143	0,167	0,143
10	0,273	0,364	0,273	0,364	0,182	0,182	0,182	0,182	0,273	0	0,333	0,100
11	0,273	0,364	0,273	0,364	0,182	0,364	0,182	0,182	0,273	0,182	0	0,222
12	0,091	0,182	0,091	0,182	0	0,182	0	0	0,091	0,182	0,182	0

- não foi possível analisar frutos na planta 6



**Figura 2.** Análise de agrupamento (A) e dispersão gráfica (B) de 12 plantas de *Passiflora cincinnata* com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 33 descritores categóricos. O método UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

### 1.3.2 Caracterização molecular

Os *primers* utilizados geraram 110 marcadores RAPD e 154 marcadores ISSR (Tabela 5), obtendo-se a média de 12,2 e 22 marcadores por *primer*, respectivamente.

**Tabela 5.** Iniciadores utilizados para obtenção dos marcadores RAPD e ISSR para as 12 plantas de *Passiflora cincinnata* e respectivos números de bandas polimórficas e monomórficas. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

Iniciador	Sequência 5'→3'	Nº de	Nº de
		bandas Polimórficas	bandas Monomórficas
RAPD OPD-04	TCTGGTGAGG	5	3
RAPD OPD-08	GTGTGCCCA	7	8
RAPD OPF-14	TGCTGCAGGT	5	7
RAPD OPG-05	CTGAGACGGA	13	7
RAPD OPG-08	GGCTCATGTG	4	5
RAPD OPH-04	GGAAGTCGCC	8	6
RAPD OPH-12	ACGCGCATGT	1	6
RAPD OPH-16	TCTCAGCTGG	8	6
RAPD OPH-17	CACTCTCCTC	4	7
<b>Total</b>		<b>55</b>	<b>55</b>
ISSR-5 (TriAGC 3'RC)	AGCAGCAGCAGCAGC	3	6
ISSR-6 (TriAGG3'RC)	AGGAGGAGGAGGAGG	4	5
ISSR-7 (TriCAG3'RC)	CAGCAGCAGCAGCAG	25	5
ISSR-8 (DiGA 5'C)	CGAGAGAGAGAGAGAGA	13	8
ISSR-13 (DiGA 3'C)	GAGAGAGAGAGAGAGAC	26	1
ISSR-14(DiGA 5'CY)	CYGAGAGAGAGAGAGAGA	8	9
ISSR-15 (DiGT 5'CY)	CYGTGTGTGTGTGTGTGT	37	4
<b>Total</b>		<b>116</b>	<b>38</b>

Do total de marcadores RAPD, 50% foram polimórficos, polimorfismo menor ao obtido por Cerqueira-Silva et al. (2010) no estudo de variabilidade genética de 32 genótipos de *Passiflora cincinnata*.

As dissimilaridades genéticas entre as 12 plantas estimadas com base nos marcadores RAPD variaram de 0,067 (plantas 11 e 12) a 0,313 (plantas 6 e 7) (Tabela 6). Cerqueira-Silva et al. (2010) evidenciaram maiores distâncias para marcadores RAPD (0,20-0,85) para a mesma espécie em estudo, entretanto, distâncias genéticas semelhantes (0,031-0,417) foram relatadas por Junqueira et al. (2007) em um estudo de diversidade de acessos da espécie *Passiflora nitida*. A exemplo dos trabalhos citados acima, análises utilizando marcadores moleculares RAPD têm sido úteis em estudos de variabilidade genética de acessos de várias espécies do gênero *Passiflora* (VIANA et al., 2003; BELLON et al., 2007, 2009; JUNQUEIRA et al. 2007; CASTRO et al., 2011).

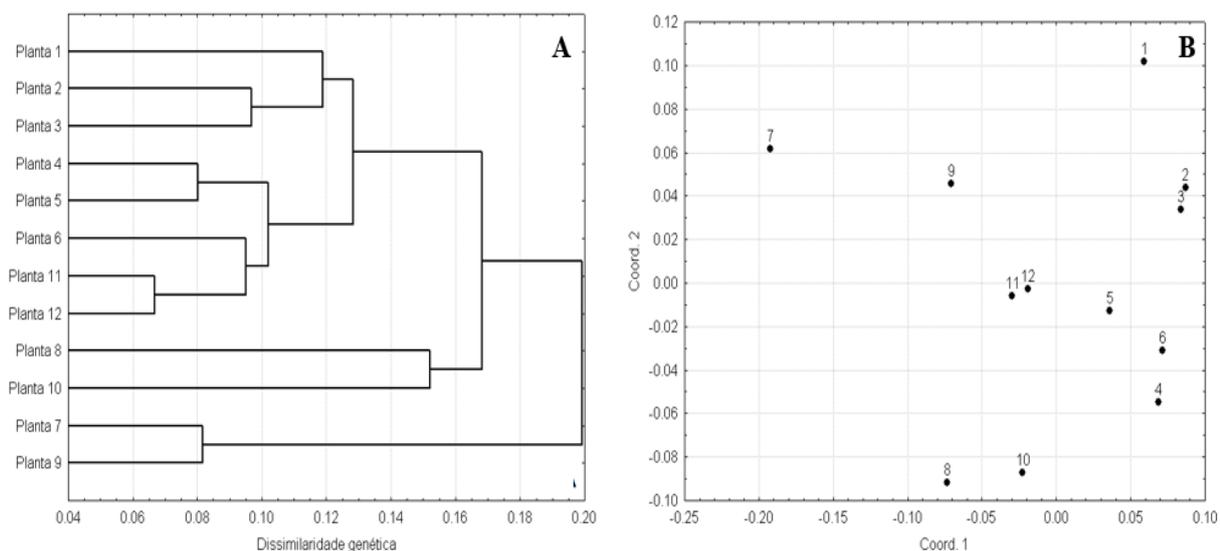
**Tabela 6.** Matriz de dissimilaridade genética entre 12 acessos de *Passiflora cincinnata*, calculada com base no complemento do coeficiente de Nei e Li, utilizando 110 marcadores RAPD (abaixo da diagonal) e 154 marcadores ISSR (acima da diagonal). Embrapa Cerrados/UnB, Brasília, DF, 2017.

Planta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	0,204	0,276	0,276	0,251	0,246	0,304	0,194	0,263	0,196	0,222	0,251
2	0,097	0	0,196	0,195	0,176	0,205	0,311	0,229	0,321	0,209	0,180	0,248
3	0,141	0,097	0	0,198	0,202	0,256	0,344	0,279	0,333	0,234	0,215	0,290
4	0,158	0,171	0,117	0	0,215	0,203	0,306	0,260	0,325	0,236	0,235	0,283
5	0,139	0,135	0,095	0,080	0	0,213	0,361	0,290	0,325	0,217	0,210	0,303
6	0,114	0,114	0,126	0,100	0,099	0	0,341	0,215	0,293	0,167	0,213	0,262
7	0,267	0,303	0,312	0,310	0,290	0,313	0	0,322	0,357	0,280	0,304	0,306
8	0,244	0,219	0,180	0,188	0,145	0,169	0,222	0	0,337	0,159	0,220	0,271
9	0,167	0,184	0,143	0,138	0,114	0,133	0,082	0,145	0	0,300	0,269	0,342
10	0,206	0,187	0,176	0,182	0,162	0,160	0,235	0,152	0,180	0	0,161	0,259
11	0,157	0,114	0,139	0,114	0,099	0,097	0,135	0,102	0,147	0,149	0	0,269
12	0,126	0,117	0,102	0,103	0,096	0,093	0,118	0,089	0,130	0,133	0,067	0

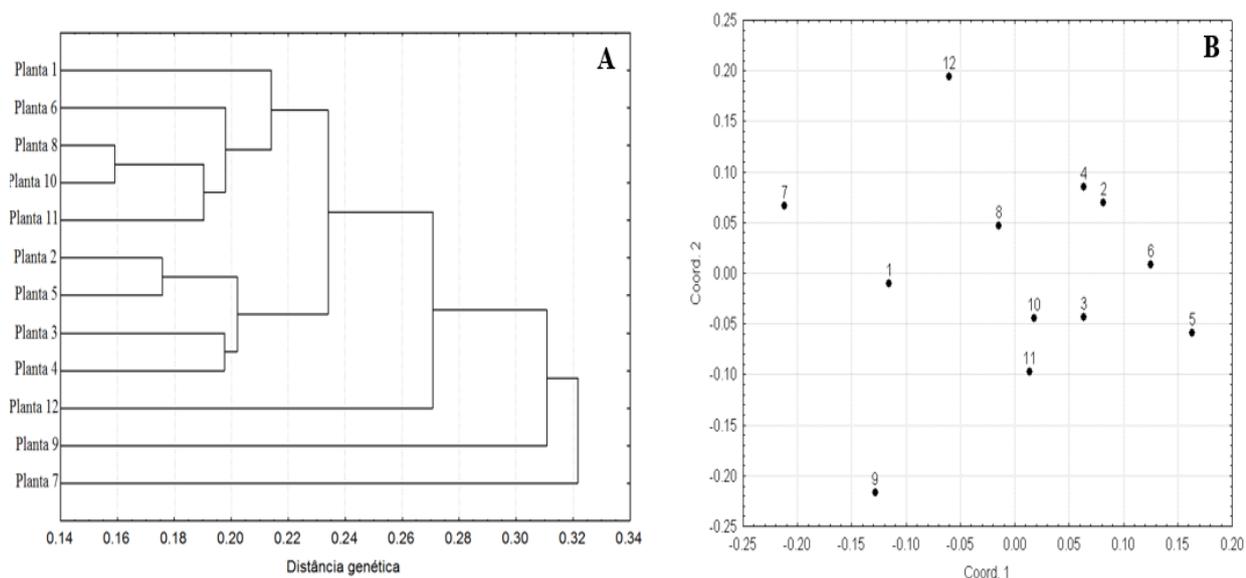
Obteve-se uma maior porcentagem de polimorfismo dos marcadores ISSR (75%) em relação aos marcadores RAPD. Elevado polimorfismo de marcadores ISSR em *Passifloras* também foi relatado por Santos et al. (2011) e Costa et al. (2012). Ainda é possível observar na Tabela 6 que as dissimilaridades genéticas estimadas com base nos marcadores ISSR variaram entre 0,159 (plantas 8 e 10) a 0,361 (plantas 5 e 7).

O coeficiente de correlação cofenético ( $r$ ) para os marcadores RAPD e ISSR foi de 0,84, indicando um excelente ajuste entre a matriz de dissimilaridade e as análises de agrupamento.

As análises de agrupamento e dispersão gráfica dos marcadores RAPD (Figura 3) e ISSR (Figura 4), realizadas com base nas matrizes de dissimilaridade genética, evidenciam a coerência entre estes dois marcadores moleculares nos estudos de variabilidade genética das 12 plantas selecionadas de *P. cincinnata*. A planta 7 foi a mais divergente com base nos dois marcadores e não houve plantas idênticas como observado na análise dos 33 descritores morfoagronômicos. Marcadores moleculares do DNA permitiram uma diferenciação mais precisa e detalhada das plantas selecionadas. Considerando que as plantas analisadas no presente estudo foram obtidas a partir de sementes de populações melhoradas da espécie *Passiflora cincinnata*, que é alógama e autoincompatível, esperava-se que as plantas selecionadas apresentassem diferenças genéticas entre elas, o que foi verificado com base nos marcadores moleculares do DNA.



**Figura 3.** Análise de agrupamento (A) e dispersão gráfica (B) de 12 matrizes de *Passiflora cincinnata* com base na matriz de dissimilaridade genética calculada utilizando-se 110 marcadores RAPD. O método UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.



**Figura 4.** Análise de agrupamento (A) e dispersão gráfica (B) envolvendo de 12 matrizes de *Passiflora cincinnata* com base na matriz de dissimilaridade genética calculada utilizando-se 154 marcadores ISSR (c). O método UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

As estimativas de dissimilaridade genética com base nos diferentes grupos de características são importantes e devem ser analisadas de forma complementar. Verificou-se

uma correlação forte e altamente significativa entre as dissimilaridades genéticas estimadas com base nos 33 descritores e nos descritores de folha e fruto (Tabela 7). A correlação das dissimilaridades genéticas estimadas com base nos descritores de flor com as dissimilaridades genéticas estimadas com base nos demais grupos de características foi nula, pois a matriz dissimilaridade genética para os descritores de flores foi igual a 0, ou seja, esses descritores de flores não diferenciaram as 12 plantas de *Passiflora cincinnata*. As estimativas de dissimilaridade genética com base nos marcadores RAPD e ISSR tiveram correlação negativa com os 33 descritores, descritores de folha e descritores de fruto, demonstrando que essas análises têm funções complementares. As dissimilaridades genéticas estimadas com base nos dois marcadores moleculares RAPD e ISSR tiveram correlação altamente significativa e positiva (0,32), demonstrando a coerência entre estes marcadores do DNA.

**Tabela 7.** Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson entre as distâncias genéticas calculadas com base nos 33 descritores morfoagronômicos, 12 descritores de folha, 11 descritores de flor, 10 descritores de fruto, marcadores RAPD e ISSR. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

<b>VARIÁVEIS</b>	<b>Descritores Folha</b>	<b>Descritores Flor</b>	<b>Descritores Fruto</b>	<b>RAPD</b>	<b>ISSR</b>
33 Descritores	0,77**	0	0,60**	-0,23	-0,32**
Descritor Folha	-	0	0,56	-0,09	-0,41**
Descritor Flor		-	0	0	0
Descritor Fruto			-	-0,30*	-0,42
RAPD				-	0,32**

\*\*,\* Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

## 1.4 CONCLUSÕES

Foi possível a caracterização morfoagronômica e molecular de plantas selecionadas do maracujazeiro silvestre *Passiflora cincinnata* Mast.

Descritores morfoagronômicos de flores não foram eficientes na diferenciação das 12 plantas selecionadas.

As plantas selecionadas 2 e 4 apresentaram os mesmos descritores morfoagronômicos, não sendo possível a diferenciação entre elas.

Os marcadores moleculares do DNA permitiram uma caracterização e diferenciação de todas as plantas analisadas neste trabalho.

Verificou-se a utilidade e a complementaridade dos descritores morfoagronômicos e marcadores moleculares no estudo de variabilidade genética de *Passiflora cincinnata*.

## 1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, F.P. **Caracterização da variabilidade morfoagronômica de maracujazeiro (*Passiflora cincinnata* Mast.) no semi-árido brasileiro.** Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2007. 94 f.

ARAÚJO, F.P.; SILVA, N.; QUEIROZ, M.A. Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* Mast com base em descritores morfoagronômicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 3, p.723-730, 2008.

BELLON, G.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, K.P.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SANTOS, E.C.; 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**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 1, p. 124-127, 2007.

BELLON, G.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, K.P.; JUNQUEIRA, N.T.V.; FONSECA, K.G.; BRAGA, M.F. Variabilidade genética de acessos obtidos de populações cultivadas e silvestres de maracujazeiro-doce com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 1, p. 197-202, 2009.

BRAGA, M.F. et al. Maracujá-do-cerrado. In: VIEIRA, R.F. et al. **Frutas nativas da região Centro-Oeste.** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 2006, p. 216-233.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Formulário 3 - Espécies em regime de proteção: instruções de DHE e tabela de Descritores Mínimos.** Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/protecaocultivares/formularios-protecao-cultivares/MARACUJA\\_OUTRAS\\_SPP\\_FORMULARIO\\_16DEZ2008\\_P.doc](http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/protecaocultivares/formularios-protecao-cultivares/MARACUJA_OUTRAS_SPP_FORMULARIO_16DEZ2008_P.doc)>. Acesso em: 29 dez. 2016.

CASTRO, A.P.G.; FALEIRO, F.G.; CARVALHO, D.D.C.; FONSECA, K.G.; VILELA, M.F.; JUNQUEIRA, N.T.V.; CARES, J.E. Genetic variability of *Passiflora* spp. from commercial fields in the Federal District, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.6, p.996-1002, 2011.

CERVI, A.C. ***Passifloraceae do Brasil.*** Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. Madrid, 1997, p. 38-40.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S.; SANTOS, E.S.L.; CARDOSO-SILVA, C.B.; PEREIRA, A.S.; OLIVEIRA, A.C.; CORRÊA, R.X. Genetic variability in wild genotypes of *Passiflora cincinnata* based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Research** 9 (4): 2421-2428 2010.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.; FALEIRO, F.G.; JESUS, O.N.; SANTOS, E.S.L.; SOUZA, A.P. The genetic diversity, conservation, and use of passion fruit (*Passiflora* spp.) In: AHUJA, M.R.; JAIN, S.M. (Eds.) **Genetic diversity and erosion in plants - case histories** v.2. Switzerland: Springer International Publishing Switzerland. 2016. p.215-231.

COSTA, J.L.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, G.A.F.; OLIVEIRA, E.J. Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 12: 253-260, 2012.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Lançamento Oficial da Cultivar de Maracujazeiro Silvestre BRS Sertão Forte (BRS SF)**. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/lancamentosertoaforte/>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

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. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M.; REIS JÚNIOR, F.B. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. p. 55-118.

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

JUNQUEIRA, K.P.; FALEIRO, F.G.; RAMOS, J.D.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 3, p. 571-575, 2007.

MAGALHÃES, A. C. **Caracterização de frutos e sementes e germinação de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener e *Passiflora cincinnata* Mast**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 2010.73 f.

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

OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônomo. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 143-158.

PILLAR, V.P. Multivariate exploratory analysis and randomization testing using Multiv. **Coenoses**, v.12, n.1, p.145-148, 1997.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1**. New York: Exeter Software, 2000. 98 p.

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

SANTOS, L.F.; OLIVEIRA, E.J.; SILVA, A.S.; CARVALHO, F.M.; COSTA, J.L.; PÁDUA,

J.G. ISSR Markers as a Tool for the Assessment of Genetic Diversity in *Passiflora*. **Biochemical Genetics** 49: 540-554, 2011.

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.

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

VIEIRA, E.A.; FIALHO, J.F.; SILVA, M.S; FUKUDA, W.M.G.; FALEIRO, F.G. Variabilidade genética do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa Cerrados acessada por meio de descritores morfológicos. **Científica**, Jaboticabal, v.36, n.1, p.56 - 67, 2008.

**CARACTERIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE DESCRITORES  
MORFOAGRONÔMICOS UTILIZADOS NOS PROCESSOS DE PROTEÇÃO DE  
CULTIVARES DE MARACUJAZEIRO AZEDO (*Passiflora edulis* Sims)**

**CHARACTERIZATION AND VALIDATION OF MORPHOAGRONOMIC  
DESCRIPTORS USED IN THE PROTECTION PROCESSES OF SOUR PASSION  
FRUIT (*Passiflora edulis* Sims) VARIETIES**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar e validar 25 descritores morfoagronômicos utilizados nos processos de proteção de cultivares de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims). Os descritores foram obtidos avaliando-se 24 estruturas (ramo, folhas, flores e frutos) de pelo menos 12 plantas de três cultivares em diferentes sistemas de produção. Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (BRS GA1 a céu aberto e em estufa, BRS RC e BRS SC1) e quatro repetições de seis medidas/classificações. Para os 25 descritores morfoagronômicos categóricos foram realizadas análises de distribuição de frequência e análise multivariada. Para os 15 descritores morfoagronômicos quantitativos foram realizadas análises de variância e teste de comparação de médias. A partir dos descritores categóricos e descritores quantitativos foram estimadas distâncias genéticas entre as cultivares nos diferentes sistemas de produção utilizando-se os índices da coincidência simples e Mahalanobis, respectivamente. A partir das matrizes de distâncias genéticas obtidas com cada grupo de características, foram realizadas análises de agrupamento e dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais. A maior taxa de validação dos descritores morfoagronômicos utilizados na proteção de cultivares foi obtida para a cultivar BRS RC. As análises de variância mostraram diferenças significativas entre as cultivares para dez descritores quantitativos. Foi possível observar uma tendência de agrupamento das cultivares avaliadas na mesma propriedade rural e sistema de produção (BRS GA1 no sistema convencional e BRS RC). Verificou-se a utilidade dos atuais descritores morfoagronômicos utilizados no processo de proteção, embora tenham sido verificadas diferenças na codificação devido à influência ambiental.

**Palavras-chave:** *Passiflora edulis* Sims, análise multivariada, interação genótipo ambiente.

## ABSTRACT

The purpose of this work was to characterize and validate 25 morphoagronomic descriptors used in protection processes of passion fruit varieties (*Passiflora edulis* Sims). The descriptors were obtained by evaluating 24 plant structures (branches, leaves, flowers and fruits) of at least 12 plants of three cultivars in different production systems. A completely randomized design was used with four treatments (BRS GA1 in the open field and in greenhouse, BRS RC and BRS SC1) and four replications of six structures measurements/classifications each. For the 25 categorical morphological descriptors, frequency distribution and multivariate analysis were performed. For the 15 quantitative morphoagronomic descriptors, variance analysis and comparisons of means were performed. From the categorical descriptors and quantitative descriptors, genetic distances among the cultivars in the different production systems were estimated using the simple coincidence indices and Mahalanobis distances, respectively. From the genetic distances matrices obtained with each group of characteristics, cluster and graphic dispersion analysis were performed based on multidimensional scales using the principal coordinate method. The highest validation rate of the morphoagronomic descriptors used to protect varieties was obtained BRS RC cultivar. Variance analysis showed significant differences among varieties for ten quantitative descriptors. It was possible to observe a cluster tendency in varieties evaluated in the same rural property and production system (BRS GA1 in the conventional system and BRS RC). The usefulness of the current morphological descriptors used in the protection process was verified, although differences in codification were verified due to environmental influence.

**Keywords:** *Passiflora edulis* Sims, multivariate analysis, environment genotype interaction.

## 2.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, entre as Passifloras, a espécie mais cultivada e comercializada é a *Passiflora edulis* Sims, conhecida por maracujá-amarelo ou maracujá-azedo, que apresenta alta produtividade, qualidade dos seus frutos e rendimento industrial (JUNQUEIRA et al., 2005; FALEIRO et al. 2005).

Durante muitos anos, o maracujá azedo foi considerado uma fruta de pomar doméstico e seu valor comercial foi descoberto somente no final da década de 60 com a instalação dos primeiros pomares paulistas e, atualmente, o Brasil se destaca como maior produtor e consumidor mundial da fruta, que é muito utilizada para sucos (MELETTI, 2011; ABF, 2016).

Ações de pesquisa e desenvolvimento têm permitido o avanço da cadeia produtiva do maracujazeiro azedo no Brasil. Tais ações envolvem a otimização do sistema de produção e o melhoramento genético para o desenvolvimento de cultivares mais produtivas, com maior nível de resistência a doenças e com maior qualidade e homogeneidade dos frutos (FALEIRO et al., 2008).

Os híbridos BRS Gigante Amarelo (BRS GA1), BRS Sol do Cerrado (BRS SC1) e BRS Rubi do Cerrado (BRS RC) foram lançados pela Embrapa e parceiros e apresentam algumas vantagens quando comparadas às variedades tradicionais, como por exemplo, maior produtividade, maior qualidade física e química dos frutos e maior nível de resistência a doenças (EMBRAPA, 2017a, 2017b, 2017c).

Ações de pós-melhoramento, validação e transferência de tecnologia são fundamentais para que novas cultivares desenvolvidas por programas de melhoramento genético do maracujazeiro sejam utilizadas (BORGES et al., 2005). Entre tais ações, o registro das cultivares no RNC-MAPA (Registro Nacional de Cultivares – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e a proteção no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC – MAPA) são de grande importância. Para o processo de proteção de cultivares, uma primeira lista de 25 descritores da espécie *Passiflora edulis* Sims foi desenvolvida e publicada para a caracterização das cultivares desta espécie. No entanto, a aplicação segura e eficaz desses descritores requer a validação experimental com diversos cultivares conhecidos, a fim de harmonizar as metodologias em diferentes regiões e por distintos avaliadores (BRASIL, 2017).

Segundo Ferreira (2008), a caracterização da variabilidade genética por meio de uma lista descritores morfológicos é muito utilizada e, no caso de proteção de cultivares, é uma exigência dentro dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade. Tais

descritores apresentam vantagens pelo fato de serem confiáveis, fáceis de estudar e apresentarem um baixo custo de caracterização, porém, apresentam polimorfismo limitado e sofrem influência ambiental.

A utilização de descritores para caracterização dos acessos, evidenciando variabilidade genética do gênero *Passiflora* tem sido relatada por diversos autores (CROCHEMORE et al., 2003; FREITAS et al., 2011; MACHADO et al., 2015; SANTOS et al., 2011). Neste trabalho, objetivou-se obter e validar os 25 descritores propostos pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC-MAPA) para a caracterização de três cultivares maracujá azedo.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para o trabalho de obtenção e validação dos descritores, foi realizada a caracterização de três híbridos de importância comercial lançados pela Embrapa e parceiros (BRS Gigante Amarelo – BRS GA1, BRS Rubi do Cerrado – BRS RC e BRS Sol do Cerrado – BRS SC1). As avaliações foram realizadas em diferentes propriedades rurais que cultivavam os três híbridos no sistema de produção convencional em espaçamento adensado (2,5 m entre linhas e 2 m entre plantas). O híbrido BRS GA1 foi também avaliado em uma propriedade rural que adota o sistema de produção de maracujá adensado em estufa. O híbrido BRS GA1 (convencional) e BRS RC (convencional) foram avaliadas na mesma propriedade rural (Tabela 1).

**Tabela 1.** Cultivar, procedência e sistema de produção utilizados para caracterização e validação de descritores de *Passiflora edulis* Sims. Embrapa Cerrados/UnB, Brasília, DF, 2017.

CULTIVAR	NOME FANTASIA	PROCEDÊNCIA	SISTEMA DE PRODUÇÃO
BRS GA1	BRS Gigante Amarelo	Planaltina de Goiás-GO	Convencional
BRS GA1	BRS Gigante Amarelo	Núcleo Rural Pípiripau, Planaltina-DF	Estufa
BRS RC	BRS Rubi do Cerrado	Planaltina de Goiás-GO	Convencional
BRS SC1	BRS Sol do Cerrado	Núcleo Rural Tabatinga, Planaltina – DF	Convencional

A caracterização e validação dos 25 descritores morfoagronômicos propostos pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), órgão vinculado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) foram realizadas considerando a caracterização morfológica em diferentes épocas ou locais, conforme as instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de maracujá da espécie *Passiflora edulis* Sims (ANEXO A) (BRASIL, 2017).

Dos 25 descritores utilizados na caracterização, dez são qualitativos/pseudoqualitativos e 15 quantitativos, sendo que seis estão relacionados ao ramo, limbo foliar e pecíolo, oito são referentes às flores e 11 são características dos frutos (ANEXO A).

Os dez descritores qualitativos/pseudoqualitativos abrangem a coloração do ramo, profundidade do sinus, posição dos nectários, bandeamento nos filamentos da corona, coloração dos anéis (exceto brancos) da corona, filamentos da corona, forma do fruto, coloração da casca do fruto, lenticelas e coloração da polpa.

As características quantitativas são: comprimento do limbo foliar (LFC), largura do limbo foliar (LFLM), comprimento do pecíolo (PC), comprimento da bráctea (FLCB), comprimento da sépala (FLCS), largura da sépala (FLLS), diâmetro da corona (FLDEC), largura dos anéis coloridos nos filamentos da corona (FLAFC), diâmetro longitudinal do fruto (FRDL), diâmetro transversal do fruto (FRDT), relação diâmetro longitudinal/diâmetro transversal (FRRDLT), massa média do fruto (FRMM), espessura da casca do fruto (FREC), teor de sólidos solúveis totais (FRSS) e número de sementes por fruto maduro (FRNS).

As avaliações das características qualitativas/pseudoqualitativas foram realizadas visualmente, atribuindo os códigos sequenciais numéricos de acordo com a classe fenotípica dos descritores para *Passiflora edulis* Sims (ANEXO A) (BRASIL, 2017) e a mensuração das características quantitativas foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital, refratômetro digital e balança de precisão, conforme a necessidade de avaliação do descritor e, posteriormente, foram também atribuídos códigos sequenciais numéricos de acordo com a classe fenotípica dos descritores para *Passiflora edulis* Sims (BRASIL, 2017). As análises dos frutos foram conduzidas no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Embrapa Cerrados. Para a característica espessura de casca, os frutos foram cortados ao meio (transversalmente) e foram realizadas três medições em diferentes posições, utilizando-se a média delas para definição da classe fenotípica e respectivo código numérico. Para cada cultivar, sistema de produção e descritor qualitativo/pseudoqualitativo e quantitativo foram avaliados 24 ramos, folhas, flores ou frutos obtidos de pelo menos 12 plantas.

Para os 25 descritores morfoagronômicos (qualitativos/pseudoqualitativos e quantitativos) categóricos foram realizadas análises de distribuição de frequência baseadas nas medidas/classificação das 24 estruturas e análise multivariada, a qual foi utilizada para estimar a distância genética entre os acessos utilizando análise de correspondência simples que permite explorar um conjunto de dados multivariados de “n” indivíduos avaliados em “p” variáveis categóricas. Foi estimada a % de validação dos descritores obtidos com base na % da

coincidência desses descritores com os descritores obtidos na ocasião do pedido de proteção de cada cultivar. Para definição da classe fenotípica de cada descritor para cada cultivar, utilizou-se como referência a maior frequência baseada nas 24 estruturas. No caso de empate foi utilizado como critério o código obtido na ocasião do pedido de proteção das cultivares.

As análises dos dados referentes aos 25 descritores morfoagronômicos categóricos (multivariada) e dos 15 descritores quantitativos foram realizadas utilizando o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (BRS Gigante Amarelo convencional e em estufa, BRS Rubi do Cerrado e BRS Sol do Cerrado) e quatro repetições, sendo cada repetição a média da medida/classificação de seis estruturas (ramos, folhas, flores e frutos).

Para os 15 descritores morfoagronômicos quantitativos foram realizadas análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 1% de significância. A contribuição relativa dos descritores quantitativos para a divergência genética entre as cultivares foi estimada de acordo com o critério proposto por Singh (1981), com o auxílio do Programa Genes (CRUZ, 2013).

A partir dos descritores categóricos e descritores quantitativos, foram estimadas distâncias genéticas entre as cultivares nos diferentes sistemas de produção utilizando-se os índices da coincidência simples e Mahalanobis, respectivamente, também com o auxílio do Programa Genes. A partir das matrizes de distâncias genéticas obtidas com cada grupo de características, foi realizada a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS (SAS INSTITUTE INC., 1989).

## **2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foram obtidos os 25 descritores propostos para *Passiflora edulis* Sims para os três híbridos avaliados em sistema convencional e para o BRS GA1 cultivado em estufa (Tabela 2). A partir das avaliações realizadas e com base na maior frequência das classes fenotípicas (considerando as 24 estruturas analisadas) dos descritores qualitativos categóricos, os três híbridos estudados se caracterizam por possuir ramo de coloração predominante verde-arroxeadado, sinus profundo, nectários adjacentes ao limbo foliar (Figura 1A), corona com anéis roxos sem bandeamento nos filamentos (Figura 1B), sendo estes ondulados.

Os frutos apresentaram forma elipsoide, com exceção do híbrido BRS SC1 (arredondada). O híbrido BRS RC apresentou frutos com casca amarela, vermelha e roxa e polpa alaranjada-escura (Figura 1F e 1C) e os demais apresentaram frutos com casca de coloração exclusivamente amarela (Figura 1D e 1E) e polpa alaranjada. Crochemore et al. (2003), ao caracterizar 55 acessos de *Passiflora* por meio de 22 descritores, observaram variação na coloração de polpa (amarela e alaranjada) nos frutos de maracujá azedo. No presente estudo a coloração de polpa variou de amarela a alaranjada-escura (Tabela 2).

Quanto aos descritores quantitativos categóricos (Tabela 2), as folhas apresentaram comprimento curto (<12 cm) e largura média (12 a 15 cm), com exceção do híbrido BRS GA1 quando cultivado em estufa que apresentou folhas com comprimento médio (12 a 15 cm) e largura máxima maior que 15 cm. As cultivares apresentaram pecíolo de comprimento longo (>3,5 cm), com exceção do híbrido BRS SC1, o qual apresentou comprimento curto (<3 cm). O comprimento da bráctea apresentou variações entre médio (3,5 a 4 cm) e longo (>4 cm), o comprimento da sépala também apresentou variações, sendo a maioria classificada como média (1,5-2 cm). A cultivar BRS GA1 (sistema convencional) foi a única a apresentar largura da sépala média (1,5 a 2cm), sendo que as das demais foram estreitas (<1,5 cm). As flores apresentaram diâmetro da corona grande (>8 cm), corona com anéis largos (>1,5 cm), exceto as do híbrido BRS GA1 (estufa) que apresentou esses anéis com largura média (1 a 1,5 cm).

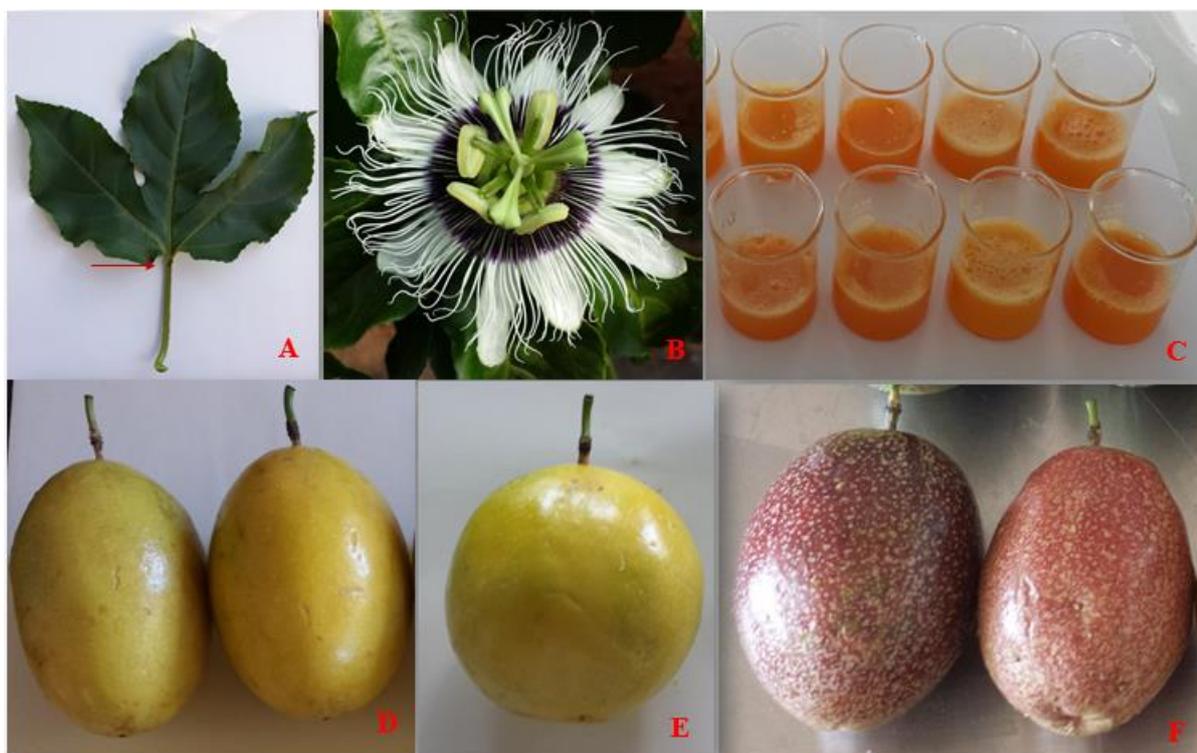
Os frutos apresentaram diâmetro longitudinal médio (10 a 13 cm), com exceção da cultivar BRS SC1 (pequeno: <10cm); diâmetro transversal médio (8 a 10 cm); a relação diâmetro longitudinal/diâmetro transversal foi pequena (0,9 a 1,2) para BRS GA1 (estufa) e BRS SC1 e média (1,2 a 1,5) para BRS GA1 (convencional) e BRS RC. A massa média dos frutos foi alta (>250 g), porém, a cultivar BRS SC1 apresentou frutos com massa média (entre 150 a 250g), a espessura da casca variou de fina (<0,6cm) a média (0,6 a 1 cm), teor de sólido de solúveis totais médio (10 a 13 °Brix) e grande número de sementes (>400), exceto para BRS SC1 que apresentou alto teor de SST (>13°Brix) e poucas sementes (<200).

Observou-se uma grande variação nas classes fenotípicas dentro de cada cultivar na maioria dos descritores (Tabela 2). Variações nesse sentido são comuns para maracujazeiro segundo Faleiro et al. (2005) e é a base para a observação da homogeneidade dos testes de DHE (UPOV, 2008), geralmente é resultado das combinações dos componentes genéticos e ambientais, sendo que o segundo componente apresenta variações mais elevadas em características quantitativas, de acordo com Santos (2011).

**Tabela 2.** Características (descritores) das cultivares de maracujazeiro azedo (BRS GA1, BRS RC e BRS SC1). Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

Característica	Identificação da característica	BRS GA1	BRS GA1 (Estufa)	BRS RC	BRS SC1
1. Ramo: coloração	verde-clara (1);verde-escura (2);verde-arroxeadada (3);roxa (4)	3 (100%)	3 (96%) 4 (4%)	2 (29%) 3 (71%)	1 (8%) 3 (92%)
2. Limbo foliar: comprimento	curto<12cm (3); médio 12-15cm (5); longo>15cm (7)	3(75%) 5 (25%)	5 (71%) 7 (29%)	3 (75%) 5 (25%)	3 (75%) 5 (25%)
3. Limbo foliar: largura máxima	estreita< 12 cm (3); média 12-15 cm (5); larga> 15 cm (7)	5 (71%) 7 (29%)	7 (100%)	3 (12%) 5 (71%) 7 (17%)	3 (13%) 5 (79%) 7 (8%)
4. Limbo foliar: profundidade do sinus	rasa(3); média (5); profunda (7)	7 (100%)	7 (100%)	7 (100%)	7 (100%)
5. Pecíolo: comprimento	curto<3cm (3);médio 3-3,5cm (5); longo> 3,5cm (7)	3 (8%) 5 (42%) 7 (50%)	5 (8%) 7 (92%)	3 (25%) 5 (29%) 7 (46%)	3 (67%) 5 (13%) 7 (25%)
6. Pecíolo: posição dos nectários	adjacente ao limbo foliar (1); distantes do limbo foliar (2)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
7. Flor: comprimento da bráctea	curto<2cm (3);médio 2-3cm (5); longo> 3cm (7)	5 (46%) 7 (54%)	3 (4%) 5 (83%) 7 (13%)	5 (37%) 7 (63%)	5 (63%) 7 (37%)
8. Flor: comprimento da sépala	curto<3,5cm (3);médio 3,5-4cm (5); longo>4cm (7)	5 (50%) 7 (50%)	3 (58%) 5 (42%)	5 (54%) 7 (46%)	3 (17%) 5 (58%) 7 (25%)
9. Flor: largura da sépala	estreita <1,5cm (3); média 1,5-2cm (5); larga >2cm (7)	3 (46%) 5 (54%)	3 (67%) 5 (33%)	3 (63%) 5 (37%)	3 (88%) 5 (12%)
10. Flor: diâmetro da corona	pequeno<7cm (3); médio 7-8cm (5); grande>8cm (7)	5 (4%) 7 (96%)	5 (37%) 7 (63%)	3 (4%) 5 (21%) 7 (75%)	3 (13%) 5 (8%) 7 (79%)
11. Flor: bandeamento nos filamentos da corona	ausente (1); presente (2)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
12. Flor: coloração dos anéis (exceto brancos) da corona	rosa (1); roxa (2)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)
13. Flor: largura dos anéis coloridos nos filamentos da corona	estreita<1cm (3); média 1-1,5cm (5); larga>1,5cm (7)	7 (100%)	5 (54%) 7 (46%)	5 (25%) 7 (75%)	5 (42%) 7 (58%)
14. Flor: filamentos da corona	reto (1); ondulado (2)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)
15. Fruto: diâmetro longitudinal	pequeno<10cm (3); médio 10-13cm (5); grande>13cm (7)	3 (4%) 5 (92%) 7 (4%)	3 (25%) 5 (75%)	3 (21%) 5 (75%) 7 (4%)	3 (83%) 5 (17%)
16. Fruto: diâmetro transversal	pequeno<8cm (3); médio 8-10cm (5); grande>10cm (7)	3 (8%) 5 (92%)	3 (8%) 5 (88%) 7 (4%)	3 (25%) 5 (75%)	3 (42%) 5 (58%)
17. Fruto: relação diâmetro longitud/diâmetro transversal	muito pequena<0,9(1); pequena 0,9-1,2(3); média 1,2-1,5 (5); grande 1,5-1,8 (7); muito grande>1,8 (9)	3 (4%) 5 (96%)	3 (63%) 5 (37%)	3 (8%) 5 (92%)	3 (88%) 5 (12%)
18. Fruto: forma	oval (1); oblonga (2); arredondada (3); oblata (4); elipsóide (5); oboval (6)	1 (8%) 3 (17%) 5 (75%)	3 (25%) 5 (71%) 6 (4%)	1 (25%) 5 (71%) 6 (4%)	1 (8%) 3 (71%) 5 (8%) 6 (13%)
19. Fruto: coloração da casca	amarela (1); vermelha (2); roxa (3)	1 (100%)	1 (100%)	1 (42%) 2 (46%) 3 (12%)	1 (100%)

20. Fruto: lenticelas	inconspícuas – não visíveis ou pouco visíveis (1); conspícuas - visíveis (2)	1 (100%)	1(100%)	2 (100%)	2 (100%)
21. Fruto: massa médio (c/polinização manual)	baixo<150g (3); médio 150-250g (5); alto>250g (7)	3 (8%) 5 (13%) 7 (79%)	3 (4%) 5 (21%) 7 (75%)	5 (37%) 7 (63%)	3 (33%) 5 (50%) 7 (17%)
22. Fruto: espessura da casca	fina <0,6cm (3); média >0,6-1cm (5); espessa >1,0cm (7)	3 (63%) 5 (37%)	3 (50%) 5 (50%)	3 (25%) 5 (75%)	3 (33%) 5 (67%)
23. Fruto: coloração da polpa	amarelo-esverdeada (1); amarela (2); alaranjada (3); alaranjada-escura (4)	2 (4%) 3 (92%) 4 (4%)	2 (12%) 3 (50%) 4 (38%)	4 (100%)	2 (8%) 3 (88%) 4 (4%)
24. Fruto: teor de sólidos solúveis totais	baixo<10° Brix (3); médio 10-13° Brix (5); alto>13° Brix (7)	3 (4%) 5 (67%) 7 (29%)	3 (17%) 5 (71%) 7 (12%)	3 (12%) 5 (71%) 7 (17%)	3 (8%) 5 (17%) 7 (75%)
25. Fruto: número de sementes por fruto maduro (c/ com polinização natural)	pequeno<200 (3); médio 200-400 (5); grande >400 (7)	3 (17%) 5 (17%) 7 (66%)	3 (4%) 5 (17%) 7 (79%)	3 (4%) 5 (38%) 7 (58%)	3 (63%) 5 (29%) 7 (8%)



**Figura 1.** Descritores morfoagronômicos avaliados para *Passiflora edulis* Sims: nectários adjacentes ao limbo foliar (A), corona com anéis roxos sem bandeamento nos filamentos (B), polpa alaranjada-escura para BRS RC (C), fruto com casca amarela para BRS GA1 (D) e BRS SC1 (E) e casca vermelha para BRS RC (F).

Verificou-se que 17 descritores foram eficientes na diferenciação das cultivares, considerando a maior frequência de cada descritor para definição do fenótipo. A cultivar BRS GA1 cultivada em estufa apresentou os descritores “comprimento do limbo foliar”, “largura máxima do limbo foliar”, “comprimento da sépala” e “largura dos anéis coloridos nos filamentos da corona” diferentes das demais cultivares, confirmando a influência ambiental na obtenção de descritores.

As análises de variância mostraram que houve diferenças significativas entre as cultivares para dez descritores quantitativos: comprimento do limbo foliar (LFC), largura máxima do limbo foliar (LFLM), comprimento do pecíolo (PC), comprimento da bráctea (FLCB), comprimento da sépala (FLCS), largura dos anéis coloridos nos filamentos da corona (FLAFC), diâmetro longitudinal do fruto (FRDL), relação diâmetro longitudinal/diâmetro transversal (FRRDLT), teor de sólidos solúveis totais (FRSS), número de sementes por fruto maduro (FRNS); sendo iguais estatisticamente apenas para as características largura da sépala (FLLS), diâmetro das extremidades da corona (FLDEC), diâmetro transversal do fruto (FRDT), massa média do fruto (FRMM), e espessura da casca do fruto (FREC) (Tabela 3).

Os valores do coeficiente de variação (CV) mostraram uma boa precisão experimental para a maioria dos descritores quantitativos, sendo o menor valor de 2,8% para diâmetro das extremidades da corona (FLDEC) e os maiores valores para número de sementes por fruto e massa média do fruto (19,1 e 16,7%, respectivamente). Sousa et al. (2012), no estudo de caracterização e diversidade genética de *Passiflora*, também observaram maiores valores do CV para massa média do fruto (32,76%), indicando a natureza complexa do caráter peso do fruto, provocada pela influência ambiental, o que não é interessante para descritores utilizados na caracterização e diferenciação das cultivares. De um modo geral, os valores do coeficiente de determinação foram altos para a maioria dos descritores, o que demonstra uma boa acurácia experimental.

É possível notar pelo teste de comparação de médias (Tabela 4) que o híbrido BRS GA1 quando cultivado em estufa apresenta folhas maiores com comprimento e largura máxima do limbo foliar e comprimento do pecíolo de 13,99 cm, 18,17 cm e 5,03 cm, respectivamente, enquanto o BRS SC1 apresenta as menores médias desses descritores de 11,07 cm, 13,05 cm e 2,91 cm, respectivamente.

**Tabela 3.** Significância pelo teste F e parâmetros genéticos dos dados relativos às características quantitativas de três híbridos de maracujazeiro azedo. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

FONTE DE VARIACÃO	Descritores quantitativos <sup>(1)</sup>														
	LFC	LFLM	PC	FLCB	FLCS	FLLS	FLDEC	FLLAFC	FRDL	FRDT	FRRDLT	FRMM	FREC	FRSS	FRNS
Tratamentos (significância)	0**	0**	0**	0**	0**	0,4 <sup>ns</sup>	0,08 <sup>ns</sup>	0**	0**	0,02*	0**	0,01*	0,02*	0**	0**
Média	11,9	14,8	3,8	2,9	3,8	1,4	8,5	1,7	10,5	8,6	1,2	257,8	0,6	12,2	359
CV (%)	4,6	4,9	9,2	4,8	4,0	6,9	2,8	9,9	5,8	4,5	3,1	16,7	7,5	5,3	19,1
Coefficiente de determinação	95,9	97,5	96,0	91,0	89,8	5,2	66,1	85,4	92,5	79,1	96,2	82,2	77,7	91,6	90,3

\*\*,\* Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente pelo teste F.

<sup>(1)</sup>LFC, comprimento do limbo foliar (cm); LFLM, largura máxima do limbo foliar (cm); PC, comprimento do pecíolo (cm); FLCB, comprimento da bráctea (cm); FLCS, comprimento da sépala (cm); FLLS, largura da sépala (cm); FLDEC, diâmetro das extremidades da corona (cm); FLLAFC, largura dos anéis coloridos nos filamentos da corona (cm); FRDL, diâmetro longitudinal do fruto (cm); FRDT, diâmetro transversal do fruto (cm); FRRDLT, relação diâmetro longitudinal/diâmetro transversal do fruto; FRMM, massa média do fruto (g); FREC, espessura da casca do fruto (cm); FRSS, teor de sólidos solúveis totais (°Brix); FRNS, número de sementes por fruto maduro.

**Tabela 4.** Médias dos 15 descritores quantitativos avaliados em três híbridos de maracujazeiro azedo<sup>(1)</sup>. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

Híbrido	Descritores quantitativos <sup>(2)</sup>														
	LFC	LFLM	PC	FLCB	FLCS	FLLS	FLDEC	FLLAFC	FRDL	FRDT	FRRDLT	FRMM	FREC	FRSS	FRNS
BRS GA1	11,39b	14,06b	3,63b	3,11a	3,98a	1,49 a	8,81a	2,02 a	11,39a	8,74a	1,31a	276,17a	0,56a	12,38ab	400,25a
BRS GA1 (Estufa)	13,99 a	18,17a	5,03a	2,59b	3,50b	1,45 a	8,34a	1,50b	10,79a	9,07a	1,19b	293,09a	0,66a	11,13b	446,5a
BRS RC	11,36b	13,98b	3,81b	3,06 a	4,04a	1,42 a	8,42a	1,72ab	11,03a	8,53a	1,30a	279,71a	0,66a	11,7b	391,5a
BRS SC1	11,07b	13,05b	2,91b	2,98ab	3,78ab	1,37 a	8,45a	1,63ab	8,91b	8,06a	1,11b	182,22a	0,66a	13,71a	197,75b

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey 1% de probabilidade. <sup>(2)</sup>LFC, comprimento do limbo foliar (cm); LFLM, largura máxima do limbo foliar (cm); PC, comprimento do pecíolo (cm); FLCB, comprimento da bráctea (cm); FLCS, comprimento da sépala (cm); FLLS, largura da sépala (cm); FLDEC, diâmetro das extremidades da corona (cm); FLLAFC, largura dos anéis coloridos nos filamentos da corona (cm); FRDL, diâmetro longitudinal do fruto (cm); FRDT, diâmetro transversal do fruto (cm); FRRDLT, relação diâmetro longitudinal/diâmetro transversal do fruto; FRMM, massa média do fruto (g); FREC, espessura da casca do fruto (cm); FRSS, teor de sólidos solúveis totais (°Brix); FRNS, número de sementes por fruto maduro.

Machado et al. (2015), em um estudo de divergência genética de acessos de maracujá utilizando descritores quantitativos e qualitativos, relataram maior valor médio semelhante para largura de folha (17,71 cm) e menor para comprimento do pecíolo (3,94 cm). Além disso, obtiveram um valor médio de 136,8g para massa de fruto de *Passiflora edulis* 'amarelo', valor inferior ao de 257,8g observado no presente trabalho.

A massa média dos frutos em todos os híbridos foi superior a 180 g, o qual é considerado o valor comercial para frutos (FREITAS et al., 2011), evidenciando a importância dessas cultivares geneticamente melhoradas. O valor de massa do fruto acima de 200g para BRS GA1 (convencional e estufa) corrobora com os resultados obtidos para o mesmo genótipo, com 203g (polinização natural) e 234,7g (polinização artificial) apresentados por Freitas et al. (2011) e Krause et al. (2012), respectivamente. A massa média para BRS SC1 (182,2 g) foi superior à obtida por Krause et al. (2012), com polinização natural (148,9g). A média da massa dos frutos (257,8 g) foi semelhante à obtida por Neves et al. (2013), de 236,4 g e superior às relatadas por Farias et al. (2007), de 177,28 g e Machado et al. (2015), de 136,8g.

Os menores valores para diâmetro longitudinal (8,91 cm) e transversal (8,06 cm) dos frutos foram verificados no híbrido BRS SC1, similares aos relatados por Krause et al. (2012) para o mesmo genótipo (9,3 cm e 8,36 cm, respectivamente com polinização artificial e 7,75 cm e 7,01 cm, respectivamente com polinização natural). A menor relação diâmetro longitudinal/transversal também foi verificada no BRS SC1 (1,11). Essa relação é importante na verificação do formato do fruto, valores próximos a 1 indicam frutos arredondados (MEDEIROS et al., 2009).

O descritor espessura da casca do fruto variou de 0,56 cm a 0,66 cm entre os genótipos, e não diferiu estatisticamente, resultados similares foram relatados por Hafle et al. (2009) e Krause et al. (2012).

O teor de sólidos solúveis totais variou de 11,13 °Brix a 13,71 °Brix. Segundo Nascimento et al. (2003), o alto teor de sólidos solúveis totais é uma característica desejável para o mercado de frutas *in natura* e indústria, portanto, com base nas médias (Tabela 4) e classificação categórica de maior frequência (Tabela 2), apenas o híbrido BRS SC1 apresentou alto teor. Para maracujazeiro azedo, alguns autores verificaram amplitudes semelhantes, entretanto, observaram teor de sólidos solúveis totais maiores. Neves et al. (2013) relataram médias entre 10,01 °Brix a 15,16 °Brix e Freitas et al. (2011) observaram médias entre 11,15 °Brix a 15,4 °Brix. Krause et al. (2012) relatou resultado semelhante para BRS Sol do Cerrado (13,4°Brix) e maior média para BRS Gigante Amarelo (13,9 °Brix).

O número de sementes por fruto apresentou médias entre 197,75 a 446,5, e apresentou diferenças significativas. Médias semelhantes (162 a 430 sementes) foram apresentadas por Nascimento et al. (2003). Medeiros et al. (2009) observaram médias menores (148,75 e 217,75 sementes), já Abreu et al. (2009) não observaram diferenças significativas para essa característica, cujas médias variaram de 114,5 a 172,46 sementes por fruto.

Verificou-se que a contribuição relativa dos descritores quantitativos para a divergência genética entre as cultivares variou de 0,44% a 22,77% (Tabela 5). O descritor que mais contribuiu na diferenciação das três cultivares foi o número de sementes por fruto maduro (22,77%), seguido da massa média do fruto e comprimento do pecíolo (19,51% e 17,46%, respectivamente). Resultado diferente foi relatado por Sousa et al. (2012), cujo número de sementes por frutos apresentou baixa contribuição (2,52%) para a divergência total. A espessura da casca foi a característica que menos contribuiu para a divergência genética dos genótipos de maracujazeiro azedo (0,44%).

**Tabela 5.** Contribuição relativa dos descritores quantitativos analisados, em ordem decrescente de importância. Embrapa Cerrados/UnB, Brasília, DF, 2017.

<b>Descritor</b>	<b>Valor (%)</b>
Número de sementes por fruto maduro (FRNS)	22,77
Massa média do fruto (FRMM)	19,51
Comprimento do pecíolo (PC)	17,46
Largura máxima do limbo foliar (LFLM)	7,77
Diâmetro transversal do fruto (FRDT)	6,62
Teor de sólidos solúveis totais do fruto (FRSS)	6,14
Diâmetro longitudinal do fruto (FRDL)	5,49
Largura dos anéis coloridos nos filamentos da corona (FLLAFC)	4,56
Comprimento da bráctea (FLCB)	4,02
Relação diâmetro longitudinal/transversal do fruto (FRRDLT)	1,33
Diâmetro das extremidades da corona (FLDEC)	1,26
Comprimento do limbo foliar (LFC)	1,11
Largura da sépala (FLLS)	1,05
Comprimento da sépala (FLCS)	0,46
Espessura da casca do fruto (FREC)	0,44

As taxas de validação dos descritores variaram de 48% a 76% (Tabela 6). Estas taxas são muito baixas, mesmo considerando que as cultivares foram avaliadas em diferentes propriedades rurais e em diferentes sistemas de produção. A obtenção dos descritores em ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade é feita em condições ótimas para o

desenvolvimento da planta, o que não ocorreu nas propriedades rurais onde os descritores foram obtidos. Além desta diferença nas condições experimentais, a presença de variabilidade fenotípica dos descritores na mesma cultivar e até na mesma planta pode explicar estas diferenças na obtenção dos descritores na ocasião do pedido de proteção das cultivares e nas condições experimentais desse trabalho. Algumas características como a massa média dos frutos e o número de sementes por fruto são muito influenciadas pelas condições ambientais, pela idade da planta e também pela eficiência do processo de polinização natural ou artificial. Tais características não deveriam ser utilizadas como descritores para processos de proteção de cultivares de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims).

A taxa de validação poderia ter sido maior se houvesse um manual ilustrado para aplicação dos descritores. Características como a coloração do ramo e coloração da polpa seriam mais facilmente avaliadas com padrões de referência. O número de estruturas a serem avaliadas e a maneira correta de obter as estimativas de características quantitativas também poderiam aumentar a taxa de validação dos descritores.

A inclusão do termo ‘predominante’ em descritores qualitativos que apresentam variações fenotípicas (coloração do ramo, profundidade do sinus, coloração dos anéis da corona, forma do fruto e coloração da casca) e inclusão dos termos mais usuais como ‘fimbrias’ no descritor diâmetro da corona, ‘comprimento’ no descritor diâmetro longitudinal e ‘largura’ no diâmetro transversal facilitariam as avaliações por diferentes avaliadores e padronizaria com avaliações de outros trabalhos.

Inclusão de mais classes em alguns descritores quantitativos (comprimento do limbo foliar, largura máxima do limbo foliar, comprimento do pecíolo, diâmetro da corona, diâmetro longitudinal e transversal do fruto e teor de sólidos solúveis totais) e descritores qualitativos (coloração da casca do fruto e coloração da polpa), a substituição da coloração rosa dos anéis coloridos da corona por intensidade da coloração roxa e a inclusão de alguns descritores (bulado, diâmetro da flor, comprimento do androginóforo e antocianina no androginóforo, filete e estilete) poderiam proporcionar uma melhor diferenciação das cultivares.

A exclusão do descritor lenticelas (número 20 da Tabela 1) também auxiliaria na maior taxa de validação, pois esse descritor gera dúvidas no momento de avaliação, podendo ocorrer equívocos.

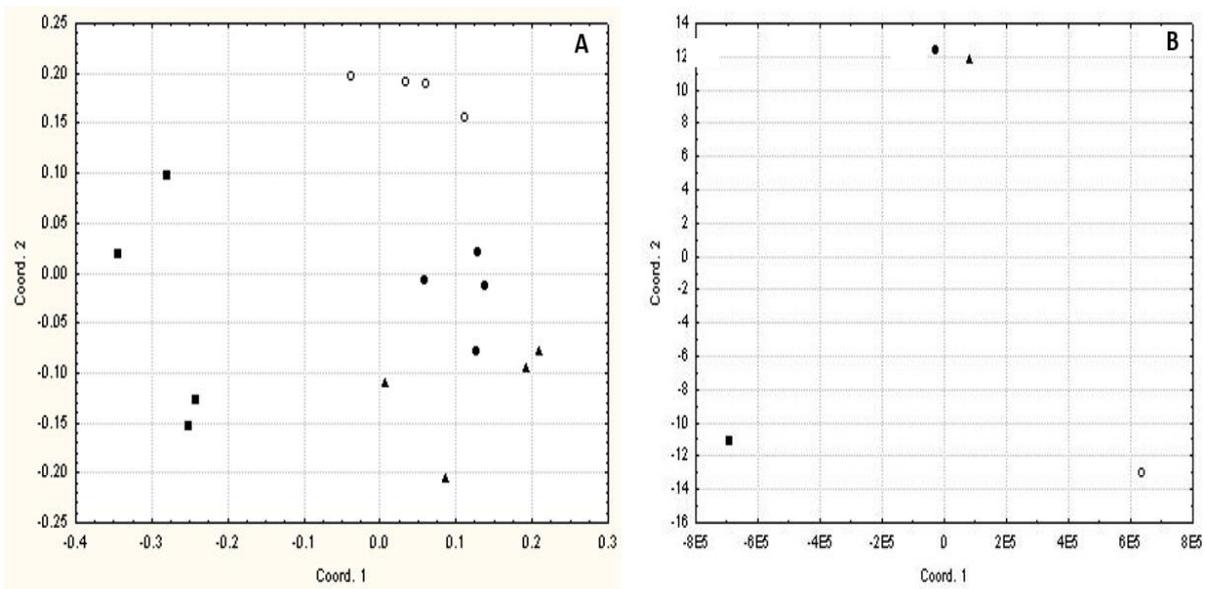
**Tabela 6.** Validação das cultivares de maracujazeiro azedo (BRS GA1, BRS RC e BRS SC1). Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

DESCRITOR <sup>1</sup>	BRS GA1*	BRS GA1	BRS GA1 (Estufa)	BRS RC*	BRS RC	BRS SC1*	BRS SC1
1	1	3	3	3	3	1	3
2	3	3	5	3	3	5	3
3	5	5	7	7	5	5	5
4	7	7	7	7	7	7	7
5	7	7	7	7	7	5	3
6	1	1	1	1	1	1	1
7	3	7	5	5	7	2	5
8	5	5	3	5	5	3	5
9	3	5	3	3	3	3	3
10	7	7	7	7	7	5	7
11	1	1	1	1	1	1	1
12	2	2	2	2	2	2	2
13	7	7	5	7	7	5	7
14	1	2	2	2	2	1	2
15	5	5	5	5	5	5	3
16	5	5	5	5	5	5	5
17	5	5	3	5	5	3	3
18	2	5	5	5	5	3	3
19	1	1	1	1 e 2	2	1	1
20	1	1	1	2	2	2	2
21	7	7	7	7	7	7	5
22	5	3	5	3	5	3	5
23	2	3	3	3	4	2	3
24	7	5	5	7	5	7	7
25	7	7	7	5	7	7	3
<b>Total Validação</b>		<b>(68%)</b>	<b>(56%)</b>		<b>(76%)</b>		<b>(48%)</b>

<sup>1</sup>Descritores 1 a 25 e respectivos códigos de classes fenotípicas – ver Tabela 2. \*Descritores obtidos para proteção do material.

Observou-se pela dispersão gráfica, uma diferenciação das três cultivares por meio dos 25 descritores categóricos (Figura 2A) e 15 descritores quantitativos (Figura 2B), evidenciando a importância de tais descritores para o processo de caracterização das cultivares para os processos de proteção. Entretanto, foi possível observar uma tendência de agrupamento das cultivares avaliadas na mesma propriedade rural (BRS GA1 convencional e BRS RC), evidenciando ainda mais a influência ambiental ou do sistema de produção na obtenção e validação dos descritores. Esta influência ambiental é ainda mais clara quando observamos as diferentes posições gráficas da cultivar BRS GA1 avaliada no sistema convencional e em estufa. A influência ambiental no fenótipo é considerada uma limitação na caracterização de espécies por meio de descritores morfológicos, apesar desses descritores serem confiáveis e apresentarem custo relativamente baixo de obtenção (FERREIRA, 2008). Essas observações demonstram a importância do uso de cultivares exemplo nos ensaios de DHE, principalmente para balizar a obtenção de descritores quantitativos mais influenciados pelas condições experimentais.

Fica evidente que são necessários alguns ajustes na lista de 25 descritores utilizados no processo de proteção de cultivares de maracujazeiro azedo, entretanto fica também evidente que os atuais descritores foram úteis e eficientes no processo de diferenciação das cultivares. Freitas et al. (2011) ao estudar 38 acessos de maracujazeiro azedo, Crochemore et al. (2003), ao caracterizar 55 acessos de maracujazeiro por meio de 22 descritores, Machado et al. (2015) ao caracterizar 22 acessos de maracujá por meio de 36 descritores morfoagronômicos e Santos et al. (2011) ao avaliar 14 descritores morfológicos de espécies do gênero *Passiflora* com potencial ornamental também observaram a importância dos descritores para caracterização dos acessos e para quantificação da variabilidade genética.



**Figura 2.** Dispersão gráfica das cultivares de maracujazeiro azedo (●: BRS GA1 convencional; ○: BRS GA1 estufa; ▲: BRS RC; ■: BRS SC1) com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 25 descritores categóricos (A) e 15 descritores quantitativos (B), em quatro repetições.

## 2.4 CONCLUSÕES

Verificou-se a utilidade dos atuais descritores morfoagronômicos utilizados no processo de proteção de cultivares de maracujazeiro azedo, embora tenham sido verificadas diferenças na codificação devido à influência ambiental.

As taxas de validação dos descritores foram baixas, evidenciando a necessidade de realização de ajustes na lista de 25 descritores no sentido de aumentar a precisão e acurácia da obtenção dos descritores. Tais ajustes estão relacionados à retirada de descritores muito influenciados pelas condições experimentais e à elaboração de um manual ilustrado para aplicação dos descritores com definição clara das classes fenotípicas e com orientações precisas da metodologia para obtenção dos descritores.

## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABF, **ANÚARIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA**, Michelle Treichel ... [et al.]. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016. 88 p.: il.

ABREU, S.P.M.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SOUSA, M.A.F. Características físico-químicas de cinco genótipos de maracujazeiro-azedo cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.31, n.2, p.487-491, 2009.

BORGES, R.S., SCARANARI, C.; NICOLI, A.M.; COELHO, R.R. Novas variedades: validação e transferência de tecnologia In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (ed.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, pp. 618-640, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Formulário 3 - Espécies em regime de proteção: instruções de DHE e tabela de Descritores Mínimos**. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/protecaocultivares/formularios-protecao-cultivares/MARACUJA\\_EDULIS\\_FORMULARIO\\_16DEZ2008\\_P.doc](http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/protecaocultivares/formularios-protecao-cultivares/MARACUJA_EDULIS_FORMULARIO_16DEZ2008_P.doc)>. Acesso em: 03 jan. 2017.

CROCHEMORE, M.L.; MOLINARI, H.B.; STENZEL, N.M.C. Caracterização agromorfológica do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v.25, n.1, p.5-10, 2003.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Maracujá - BRS Gigante Amarelo (BRS GA1)**. Disponível em<<https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/1035/maracuja---brs-gigante-amarelo-brs-gal>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2017a.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Maracujá - BRS Rubi do Cerrado (BRS RC)**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/1040/maracuja---brs-rubi-do-cerrado-brs-rc>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2017b.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Maracujá - BRS Sol do Cerrado (BRS SC1)**. Disponível em< <https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/1038/maracuja---brs-sol-do-cerrado-brs-sc1>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2017c.

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.; FÁVERO, A.P.; LOPES, M.A. Pré-melhoramento de Plantas: experiências de sucesso. In: FALEIRO, F.G.; FARIAS NETO, A.L.; RIBEIRO

JÚNIOR, W.Q. **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento:** estratégias e desafios. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2008. p. 43-62.

FARIAS, J.F.; SILVA, L.J.B.; ARAÚJO NETO, S.E.; MENDONÇA, V. Qualidade do maracujá-amarelo comercializado em Rio Branco, Acre. **Revista Caatinga**, Mossoró, Brasil, v.20, n.3, p.196-202. 2007.

FERREIRA, M.E. Genotipagem de coleções de germoplasma vegetal. In: FALEIRO, F.G.; FARIAS NETO, A.L.; RIBEIRO JÚNIOR, W.Q. **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento:** estratégias e desafios. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2008. p. 75-89.

FREITAS, J.P.X; OLIVEIRA, E.J.; CRUZ NETO, A.J.; SANTOS, L.R. Avaliação de recursos genéticos de maracujazeiro-amarelo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.9, p.1013-1020, 2011.

HAFLE, O.M.; RAMOS, J.D.; LIMA, L.C.O.; FERREIRA, E.A.; MELO, P.C. Produtividade e qualidade de frutos do maracujazeiro-amarelo submetido à poda de ramos produtivos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.31, n.3, p.763-770, 2009.

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. (Eds.) **Maracujá:** germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81-108.

KRAUSE, W.; NEVES, L.G.; PIO VIANA, A.; ARAÚJO, C.A.T.; FALEIRO, F.G. Produtividade e qualidade de frutos de cultivares de maracujazeiro-amarelo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.12, p.1737-1742, 2012.

MACHADO, C.F.; JESUS, F.N.; LEDO, C.A.S. Divergência genética de acessos de maracujá utilizando descritores quantitativos e qualitativos. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal-SP, v.37, n.2, p.442-449, 2015.

MEDEIROS, S.A.F.; YAMANISHI, O.K.; PEIXOTO, J.R.; PIRES, M.C.; JUNQUEIRA, N.T.V.; RIBEIRO, J.G.B.L. Caracterização físico-química de progênies de maracujá-roxo e maracujá-azedo cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal-SP, v.31, n.2, p.492-499, 2009.

MELETTI, L.M.M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, Volume especial, E.083-091, 2011.

NASCIMENTO, W.M.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**. Jaboticabal-SP, v.25, n.1, p.186-188, 2003.

NEVES, C.G.; JESUS, O.N.; LEDO, C.A.; OLIVEIRA, E.J. Avaliação agrônômica de parentais e híbridos de maracujazeiro-amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal-SP, v.35, n.1, p.191-198, 2013.

SANTOS, F.S. Analisando a homogeneidade. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de Cultivares no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, Brasília: Mapa/ACS, 2011. p.177-182.

SANTOS, E.A.; SOUZA, M.M.; VIANA, A.P.; ALMEIDA, A.A.F.; FREITAS, J.C.O.; LAWINSCKY, P.R. Multivariate analysis of morphological characteristics of two species of passion flower with ornamental potential and of hybrids between them. **Genetics and Molecular Research** 10 (4): 2457-2471, 2011.

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

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, New Delhi, v.41, p.237-245, 1981.

SOUSA, L.B.; SILVA, E.M.; GOMES, R.L.F.; LOPES, A.C.A.; SILVA, I.C.V. Caracterização e divergência genética de acessos de *Passiflora edulis* e *P. cincinnata* com base em características físicas e químicas de frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 34, n. 3, p. 832-839, 2012.

UPOV. INTERNATIONAL UNION FOR THE PROTECTION OF NEW VARIETIES OF PLANTS. **Document TGP/10 "Examining Uniformity"**, October 30, 2008. Disponível em: < [http://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp\\_10.pdf](http://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp_10.pdf) > Acesso em: 13 dez. 2016.

**OBTENÇÃO E VALIDAÇÃO DE DESCRITORES PARA A CULTIVAR DE  
MARACUJAZEIRO SILVESTRE BRS PÉROLA DO CERRADO (BRS PC) EM  
DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO**

**OBTAINING AND VALIDATING DESCRIPTORS FOR THE WILD PASSION  
FRUIT BRS PÉROLA DO CERRADO (BRS PC) VARIETY IN DIFFERENT YIELD  
SYSTEMS**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi obter e validar os 33 descritores utilizados no processo de proteção da cultivar de *Passiflora setacea* DC. 'BRS Pérola do Cerrado' (BRS PC), considerando o cultivo comercial em diferentes sistemas de produção. Os descritores foram obtidos utilizando 24 estruturas (ramos, folhas, flores e frutos) das plantas cultivadas em latada (convencional, orgânico e alta tecnologia) e em espaldeira (convencional e alta tecnologia). Foram realizadas análises de distribuição de frequência e análises multivariadas para os descritores qualitativos. Para os descritores quantitativos foram realizadas análises de variância e comparação de médias dos descritores em cada sistema de produção. Observou-se alta taxa de validação dos descritores nos diferentes sistemas de produção. Entretanto, análises de variância mostraram diferenças significativas entre 10 descritores quantitativos nos diferentes sistemas de produção. Maiores discrepâncias foram verificadas para os descritores obtidos em plantas cultivadas no sistema orgânico. Verificou-se a utilidade dos descritores na caracterização da cultivar, entretanto, foi observado que podem ocorrer mudanças na codificação dos descritores devido à interação genótipo x ambiente.

**Palavras-chave:** *Passiflora setacea*, multivariada, proteção de cultivares, interação genótipo x ambiente.

## ABSTRACT

The purpose of the present study was to obtain and to validate the 33 descriptors used in the protecting process of the *Passiflora setacea* 'BRS Pérola do Cerrado' (BRS PC) variety taking into consideration the commercial growth in different productions systems. Descriptors were obtained using 24 structures (branches, leaves, flowers and fruits) of plants conducted in trellis (conventional, organic and high technology) and in espalier systems (conventional and high technology). Analysis of frequency distribution and the multivariate analysis for the qualitative descriptors were carried out. The quantitative descriptors were evaluated through the analysis of variance and average comparison in each yield system. A high validation rate was found for descriptors from different systems. However, the variance analysis shows significant differences among 10 quantitative descriptors in different yield systems. Higher discrepancies were found for descriptors obtained in plants grown in an organic system. It was also found that the descriptors are useful in the cultivar characterization but changes in the descriptors codification might occur due to the genotype x environment interaction.

**Keywords:** *Passiflora setacea*, multivariate, variety protection, genotype x environment interaction.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O maracujá pertence à família Passifloraceae e está largamente distribuído pelos trópicos (BERNACCI, 2003). Vários autores, entre eles Ferreira (2005), relatam a ampla variabilidade genética do maracujazeiro. Espécies de maracujazeiro silvestre (*Passiflora* ssp.) são importantes alternativas para diversificar os sistemas de produção, apresentam grande potencial de uso no mercado de frutas especiais ácidas-doces e podem ser utilizadas como plantas ornamentais e algumas, ainda, apresentam características interessantes que podem ser úteis em programas de melhoramento genético (JUNQUEIRA et al., 2005; FALEIRO et al., 2011).

A *Passiflora setacea* DC. é conhecida popularmente como maracujá-do-sono, maracujá-sururuca, maracujá-de-boi e maracujá-do-cerrado. É uma espécie rústica, resistente a doenças como a antracnose, verrugose e septoriose, e apresenta tolerância à virose do endurecimento do fruto. A colheita de frutos dessa espécie, no Distrito Federal, ocorre praticamente o ano todo, inclusive durante o período de entressafra do maracujá-azedo comercial, fato que a torna importante para os programas de melhoramento e também para diversificar os sistemas de produção do maracujá. A *P. setacea* é uma espécie trepadeira, de antese noturna, geralmente polinizada por morcegos (quiropterofilia) ou mariposas (falenofilia), vigorosa e tolerante à seca (BRAGA et al., 2006).

De acordo com a descrição botânica, a espécie apresenta caule cilíndrico tomentoso com tricomas suaves e macios. Pecíolos de 3 cm, próximos à base foliar, com um par de glândulas sésseis, medindo cerca de 1 mm de largura. Folhas de 5 a 8 de comprimento e 6 a 10 cm de largura, trilobadas, serreadas ou subinteiras nos bordos, cordatas na base, trinervadas, membranáceas a subcoriáceas, normalmente pilosas em ambas as superfícies; tricomas suaves e macios ao tato; raramente glabras em uma das superfícies. Flores com cerca de 10 cm de diâmetro. Tubo do cálice cilíndrico campanulado, de 1,5 cm. Sépalas oblongas, de 3,5 a 4 cm de comprimento e 5 a 7 mm de largura, obtusas no ápice, margem verde e centro branco, carenadas (dorsalmente existe uma arista setácea de 1 a 1,5 cm de comprimento), na face abaxial numerosas glândulas sésseis. Pétalas linear-oblongas, de 2 a 2,5 cm de comprimento e 5 a 6 mm de largura, alvas. Corona de filamentos em uma única série, de 1 cm de comprimento; filamentos subulados, bandeados de branco e azul. Fruto ovoide, aveludado, com cerca de 4 cm de comprimento e 3 cm de largura. Sementes obovadas, com cerca de 5 x 3 mm, faveoladas (CERVI, 1997).

As sementes são de tamanho reduzido em relação a outras passifloráceas e perdem rapidamente a capacidade de germinação. No início do desenvolvimento, as plântulas são delicadas com caule delgado. Em cultivo, apresentam crescimento inicial lento e posteriormente vigoroso. Algumas plantas chegam a viver nove anos ou mais (OLIVEIRA; RUGGIERO, 2005).

Considerando toda potencialidade da espécie, a Embrapa iniciou um trabalho de melhoramento genético na década de 1990, que resultou na cultivar BRS Pérola do Cerrado (BRS PC) obtida por meio de seleção massal de populações utilizando vários acessos da espécie e lançada pela Embrapa e parceiros em 2013 (EMBRAPA, 2017a). Esta cultivar tem conquistado produtores e consumidores em diferentes regiões do Brasil e há boas perspectivas para o fortalecimento da cadeia produtiva (EMBRAPA, 2017b). O melhoramento genético teve como objetivo o aumento de produtividade e tamanho do fruto, além de resistência às principais doenças. Além dessas características é também uma alternativa para o mercado de frutas especiais destinadas a indústrias de sucos, sorvetes, doces, e para o consumo *in natura*, apresenta, ainda, potencial ornamental para paisagismos de grandes áreas evidenciado por sua ramificação densa e suas belas flores brancas (EMBRAPA, 2017a).

Para o lançamento de novas cultivares, é importante e necessário o registro e proteção do material genético e como requisito para a proteção o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), órgão vinculado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabeleceu e publicou um conjunto de instruções oficiais, incluindo a obtenção de um conjunto de descritores. A aplicação segura e eficaz desses descritores requer a validação experimental dos mesmos em diversas cultivares conhecidas (BRASIL, 2016). Neste trabalho, objetivou-se obter e validar os descritores utilizados no processo de proteção da cultivar BRS Pérola do Cerrado (BRS PC) da espécie *P. setacea*, considerando o cultivo comercial em diferentes sistemas de produção.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cinco tratamentos para a obtenção e validação dos descritores da cultivar BRS Pérola do Cerrado (BRS PC) propostos pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), órgão vinculado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2016), considerando diferentes locais de avaliação, sistemas de produção e condução (Tabela 1).

**Tabela 1.** Procedência, sistema de produção e tipo de condução de cada tratamento da cultivar BRS PC analisado. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

TRATAMENTO	PROCEDÊNCIA	SISTEMA DE PRODUÇÃO	CONDUÇÃO
1	Embrapa Cerrados (Planaltina - DF)	Convencional	Latada
2	Propriedade rural (Planaltina de Goiás - GO)	Alta Tecnologia	Latada
3	Propriedade Rural (Sobradinho - DF)	Orgânico	Latada
4	Embrapa Cerrados (Planaltina - DF)	Convencional	Espaldeira
5	Propriedade rural (Planaltina de Goiás - GO)	Alta Tecnologia	Espaldeira

No sistema convencional, foram utilizadas as recomendações técnicas estabelecidas para a cultivar BRS Pérola do Cerrado (GUIMARÃES et al., 2013), sendo que no sistema de alta tecnologia foi utilizada a fertirrigação (12,5 g de Uréia + 12,5g de Cloreto de Potássio branco moído + 5 g de Ácido Fosfórico por semana por planta) e no sistema orgânico utilizou-se um composto orgânico (Bokashi) e um biofertilizante (Supermagro) à base de materiais orgânicos, minerais, esterco e água.

As avaliações foram feitas em 2014, e, para cada tratamento, foram obtidas 24 medidas/classificação de ramos, folhas, flores ou frutos de pelo menos 12 plantas.

Utilizou-se uma lista de 33 descritores conforme as instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de *Passiflora* spp. (ANEXO B), publicada em 2008 (BRASIL, 2016). Do total de descritores, 19 são qualitativos/pseudoqualitativos e 14 quantitativos, sendo que 11 estão relacionados ao ramo, limbo foliar e pecíolo, 12 são referentes às flores e dez são características dos frutos.

As características qualitativas e pseudoqualitativas avaliadas foram: coloração do ramo; forma do limbo foliar; divisão do limbo foliar; sinus; profundidade do sinus; bulado; pilosidade; posição das glândulas no pecíolo; forma do hipanto; coloração predominante no perianto; período predominante de antese das flores; coloração predominante da corona; bandeamento nos filamentos mais longos da corona; número de anéis coloridos nos filamentos mais longos da corona; filamentos mais longos da corona; forma do fruto; coloração predominante da casca

do fruto; lenticelas distribuídas em padrão de estrias e coloração da polpa. As avaliações dessas características foram realizadas visualmente e foram atribuídos códigos sequenciais numéricos de acordo com a classe fenotípica de cada descritor para *Passiflora* spp. (BRASIL, 2016).

Os caracteres quantitativos incluem: comprimento do limbo foliar (LFC); largura máxima do limbo foliar (LFLM); comprimento do pecíolo (PC); comprimento da bráctea (FLCB); comprimento da sépala (FLCS); largura da sépala (FLLS); comprimento da pétala (FLCP); diâmetro da corona (FLDC); diâmetro longitudinal do fruto (FRDL); diâmetro transversal do fruto (FRDT); espessura da casca do fruto (FREC); tamanho da semente (FRTS); teor de sólidos solúveis totais (FRSS) e número de sementes (FRNS). A mensuração dessas características foi realizada com a utilização de um paquímetro digital e refratômetro digital, conforme a necessidade do descritor. As análises dos frutos foram conduzidas no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Embrapa Cerrados. Após as mensurações, também foram atribuídos códigos sequencias numéricos de acordo com a classe fenotípica dos descritores para *Passiflora* spp. (BRASIL, 2016). Para o descritor “espessura da casca”, os frutos foram cortados ao meio (transversalmente) e foram realizadas três medições em diferentes posições, adotando-se a média delas para a definição da classe fenotípica e respectivo código numérico.

A partir do código numérico da classe fenotípica atribuído para cada uma das 24 estruturas (ramos, folhas, flores e frutos), foi analisada a distribuição de frequência de cada código, sendo que o mais frequente foi definido para caracterizar cada descritor de cada um dos tratamentos analisados. No caso de empate foi utilizado como critério o código obtido na ocasião do pedido de proteção das cultivares.

Outra análise realizada a partir dos 33 descritores categóricos (qualitativos/pseudoqualitativos e quantitativos) foi a multivariada, com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2013), utilizada para estimar a distância genética entre os acessos utilizando análise de correspondência simples que permite explorar um conjunto de dados multivariados de “n” indivíduos avaliados em “p” variáveis categóricas. A matriz de dissimilaridade entre os cinco sistemas de produção da cultivar BRS PC foi calculada com base nos 32 descritores morfoagronômicos obtidos para a cultivar em cada ambiente. A matriz foi utilizada para realizar as análises de agrupamento por meio de dendrogramas, utilizando-se como critério de agrupamento o método do UPGMA (*Unweighted pair-group method arithmetic average*).

Os 14 descritores quantitativos também foram analisados separadamente. Foram realizadas análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 1% de

significância, realizadas também com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2013).

Para a realização das análises dos dados referentes aos 33 descritores categóricos (multivariada) e 14 descritores quantitativos, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições, sendo cada repetição a média de seis medidas/classificação de estruturas de planta (ramos, folhas, flores e frutos).

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 32 dos 33 descritores, pois a cultivar BRS Pérola do Cerrado (BRS PC) não apresenta anéis coloridos nos filamentos mais longos da corona (Tabela 2).

A partir da codificação das características qualitativas foi possível obter a frequência de cada classe fenotípica dos descritores nos diferentes tratamentos. Considerando a maior frequência para a definição do fenótipo de cada descritor, foi possível verificar que cinco (coloração do ramo, comprimento do pecíolo, diâmetro transversal do fruto, coloração de polpa e teor de sólidos solúveis totais) dos 33 descritores foram diferentes entre os sistemas de produção, evidenciando a influência ambiental na obtenção dos descritores.

A maioria dos descritores foi igual nos sistemas de produção. As plantas apresentaram folhas fendidas, trilobadas, sinus de profundidade média, sem bulado, mas com pilosidade (Figura 1A), o hipanto apresentou forma cilíndrica, a coloração predominante do perianto foi branca, assim como a da corona (Figura 1B), a antese das flores ocorreu durante a noite, a corona não apresentou bandeamento nos filamentos mais longos e esses eram lisos, os frutos eram ovalados de coloração predominante verde (Figura 1C).

Folhas pilosas, trilobadas, tubo do cálice cilíndrico-campanulado e fruto ovóide são características semelhantes às relatadas na descrição botânica por Cervi (1997) para *Passiflora setacea*. Além desse autor, Ataíde et al. (2012) e Oliveira e Ruggiero (2005) também relataram frutos ovalados. A antese noturna também foi mencionada nos estudos realizados com *P. setacea* por Santos et al. (2014), Paiva et al. (2014) e Junqueira et al. (2005). Paiva et al. (2014) evidenciaram flores brancas e filamentos longos da corona lisos, porém a forma do hipanto campanulada foi divergente. A cor da corona branca e frutos com casca de coloração verde quando maduros foram obtidos também por Santos et al. (2014), entretanto, os autores relataram maior porcentagem de frutos de formato elipsoide.

**Tabela 2.** Características (descritores) e frequência das classes fenotípicas baseadas em 24 estruturas da cultivar BRS PC sob cinco sistemas de produção: latada/convencional (LC), latada/alta tecnologia (LAT), latada/orgânico (LO), espaldeira/convencional (EC) e espaldeira/alta tecnologia (EAT). Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

Característica	Identificação da característica	LC	LAT	LO	EC	EAT
1.Ramo: coloração	verde-clara (1), verde-escura (2), verde-arroxeadada (3), roxa (4)	1 (58%) 2 (21%) 3 (21%)	1 (42%) 3(58%)	1(21%) 2(33%) 3(42%) 4 (4%)	1(50%) 2(12%) 3(38%)	1(71%) 2 (29%)
2.Limbo foliar: forma	lanceolada(1), ovada (2), cordata (3), oblonga (4), elíptica (5), fendida (6), partida (7), seccionada(8)	6(100%)	6(100%)	6(100%)	6(100%)	6(100%)
3.Limbo foliar: divisão	simples (1), bilobada (2), trilobada (3), pentaloabada (4),heptaloabada (5)	3(100%)	3(100%)	3(100%)	3(100%)	3(100%)
4. Limbo foliar: comprimento	curto (3), médio (5), longo (7)	3(8%) 5(92%)	3(17%) 5(83%)	3(29%) 5(71%)	5(100%)	5(100%)
5. Limbo foliar: largura máxima	estreita (3), média (5),larga (7)	3(4%) 5(96%)	3(4%) 5(96%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
6. Limbo foliar: sinus	ausente (1), presente (2)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
7. Limbo foliar: profundidade do sinus	rasa (3), média (5), profunda (7)	5(100%)	3 (4%) 5(96%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
8. Limbo foliar: bulado	ausente (1), presente (2)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
9. Limbo foliar: pilosidade	ausente (1), presente (2)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
10. Pecíolo:comprimento	curto (3), médio (5),longo (7)	5(33%) 7(67%)	5(29%) 7 (71%)	5 (79%) 7 (21%)	5 (8%) 7 (92%)	5 (4%) 7(96%)
11. Pecíolo: posição das glândulas (nectários)	adjacente ao limbo foliar (1), próximo ao meio do pecíolo (2), adjacente à inserção da folha no ramo (3), distribuídos ao longo do pecíolo (4)	4(100%)	2(17%) 3(17%) 4(67%)	2(4%) 3(4%) 4(92%)	4(100%)	3(17%) 4(83%)
12. Flor: forma do hipanto	aplanada (1), campanulada (2), cilíndrica (3)	3(100%)	3(100%)	3(100%)	3(100%)	3(100%)
13. Flor: coloração predominante no perianto (sépalas e pétalas, internamente)	branca (1), rosada (2), vermelha (3), vermelha-arroxeadada (4), roxa (5), azul-arroxeadada (6), azul (7)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
14. Flor: Período predominante de antese das flores	matutino (1), vespertino (2), noturno (3)	3(100%)	3(100%)	3(100%)	3(100%)	3(100%)
15. Flor: comprimento da bráctea	curto (3), médio (5), longo (7)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
16. Flor: comprimento da sépala	curto (3), médio (5), longo (7)	3(17%) 5(83%)	5(100%)	5(100%)	3 (4%) 5(96%)	5(100%)
17. Flor: largura da sépala	estreita (3), média (5), larga (7)	3(92%) 5 (8%)	3(58%) 5(42%)	3(96%) 5 (4%)	3(100%)	3(83%) 5(17%)
18.Flor: comprimento da pétala	curto (3), médio (5), longo (7)	3 (17%) 5(83%)	5(100%)	5(100%)	3 (4%) 5(96%)	5(100%)
19. Flor: diâmetro da coroa	pequeno (3), médio (5), grande (7)	3(100%)	3(100%)	3(100%)	3(100%)	3(100%)
20. Flor: coloração predominante da coroa	branca (1), rosada (2), vermelha (3), vermelha-arroxeadada (4), roxa (5), azul-arroxeadada (6), azul (7)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
21. Flor: bandeamento (anéis de cores diferentes entre si, inclusive brancos) nos filamentos mais longos da coroa	ausente (1), presente (2)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
22. Flor: número de anéis coloridos (excluídos os brancos) nos filamentos mais longos da coroa	um (1), mais de um (2)	-	-	-	-	-
23. Flor: filamentos mais longos da coroa	lisos (1), ondulados (2)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
24. Fruto: forma	ovalada (1), oblonga (2), arredondada (3), oblata (4), elipsoide (5), fusiforme (6),	1(96%) 3(4%)	1(79%) 3(21%)	1(100%)	1(96%) 3(4%)	1(92%) 3(8%)

	oboval (7)					
25. Fruto: diâmetro longitudinal	pequeno (3), médio (5), grande (7)	5(100%)	3(42%) 5(58%)	3 (12%) 5(88%)	3 (4%) 5(96%)	3(37%) 5(63%)
26. Fruto: diâmetro transversal	pequeno (3), médio (5), grande (7)	3 (46%) 5(54%)	3(63%) 5(37%)	3(37%) 5(63%)	3(67%) 5(33%)	3(83%) 5(17%)
27. Fruto: coloração predominante da casca (epiderme)	verde (1), amarela (2), laranja (3), rosada (4), vermelha (5), roxa (6)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
28. Fruto: lenticelas distribuídas em padrão de estria	ausente (1), presente (2)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)
29. Fruto: espessura da casca	muito fina (1), fina (2), média (3), espessa (4), muito espessa (5)	2(88%) 3(13%)	1(8%) 2(92%)	2(63%) 3(37%)	2(96%) 3 (4%)	2(92%) 3 (8%)
30. Fruto: tamanho da semente	pequeno (3), médio (5), grande (7)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
31. Fruto: coloração da polpa	esbranquiçada (1), amarelo-esverdeada (2), amarela (3), amarelo-alaranjada (4), alaranjada (5), alaranjada-escura (6), vermelha (7)	2(4%) 3(8%) 4(50%) 5(38%)	3(75%) 4(25%)	4(50%) 5(50%)	2(21%) 3(12%) 4(29%) 5(38%)	2(4%) 3(50%) 4(29%) 5(17%)
32. Fruto: teor de sólidos solúveis totais	muito baixo (1), baixo (3), médio (5) alto (7), muito alto (9)	5(42%) 7(58%)	3(13%) 5(54%) 7(33%)	3 (4%) 5(38%) 7(58%)	5 (46%) 7(54%)	3(29%) 5(58%) 7(13%)
33. Fruto: número de sementes	muito pequeno (1), pequeno (3), médio (5), grande (7), muito grande (9)	3 (4%) 5(67%) 7(29%)	3 (8%) 5(79%) 7(13%)	3 (8%) 5(67%) 7 (25%)	3 (8%) 5 (71%) 7(21%)	3 (8%) 5(67%) 7 (25%)

- não apresenta a característica



**Figura 1.** Descritores morfoagronômicos avaliados para a cultivar BRS Pérola do Cerrado (BRS PC): folha fendida, trilobada, com sinus de profundidade média (A), flor com perianto e coroa de coloração branca (B), fruto ovalado de coloração verde (C).

A característica coloração do ramo apresentou quatro categorias no sistema orgânico (verde-clara, verde-escura, verde-arroxeadada e roxa), três categorias no sistema convencional (verde-clara, verde-escura e verde-arroxeadada) e duas categorias no sistema de produção alta tecnologia (Tabela 2). Entretanto, as maiores porcentagens classificaram os ramos em verde-claro no sistema convencional e alta tecnologia (espaldeira) e verde-arroxeadado no sistema orgânico e alta tecnologia conduzido em latada.

Em relação à característica “posição dos nectários”, a classificação obtida foi glândulas

distribuídas ao longo do pecíolo em todos os sistemas de produção, entretanto, apenas o sistema convencional (latada e espaldeira) apresentou 100% dessa característica (Tabela 2). Santos et al. (2014), estudando *P. setacea* proveniente da Bahia, relataram resultado divergente com glândulas peciulares situadas próximas à inserção do ramo.

Nas avaliações, os frutos apresentaram forma ovalada, entretanto, com exceção do sistema orgânico, nos outros sistemas, as plantas apresentaram uma pequena porcentagem de frutos arredondados (Tabela 2).

A coloração da polpa foi a característica qualitativa mais heterogênea, apresentando quatro classes (amarelo-esverdeada, amarela, amarelo-alaranjada e alaranjada) nos sistemas convencional (latada e espaldeira) e alta tecnologia (espaldeira) e duas classes no sistema alta tecnologia (latada) e no orgânico (Tabela 2). A maioria dos frutos apresentou coloração de polpa amarela no sistema alta tecnologia (latada e espaldeira), amarelo-alaranjada nos sistemas convencional (latada) e orgânico; e alaranjada no sistema de produção convencional conduzido em espaldeira. A obtenção de mais de uma categoria na coloração da polpa foi semelhante à descrita por Santos et al. (2014) para *P. setacea*, entretanto, os autores obtiveram maior parte dos frutos com coloração da polpa amarelo-esverdeada (50%), seguida pelas cores amarelo-clara (30%) e amarelo-alaranjada (20%).

As análises de variância mostraram que houve efeito significativo dos sistemas de produção em dez das 14 características quantitativas avaliadas. Somente os descritores comprimento da bráctea, diâmetro transversal do fruto, tamanho e número de sementes foram os mesmos nos diferentes tratamentos pelo teste F a 1% de probabilidade (Tabela 3). Os coeficientes de variação foram baixos, o que evidencia a precisão dos dados experimentais. O coeficiente de determinação apresentou altos valores nas características que apresentaram diferenças significativas, o que mostra a acurácia e confiabilidade dos dados experimentais (CRUZ et al., 2004).

A comparação entre as médias das características quantitativas é apresentada na Tabela 4. Com relação ao comprimento e largura do limbo foliar, as maiores médias foram obtidas no sistema de produção alta tecnologia conduzido em espaldeira, com 10,64 cm e 11,59 cm, respectivamente. Essas médias são maiores que as relatadas por Cervi (1997) na descrição botânica de *Passiflora setacea*, sugerindo que as folhas têm de 5 cm a 8 cm x 6 cm a 10 cm. Santos et al. (2014), avaliando características de *P. setacea* provenientes da Bahia, obtiveram maior média do comprimento foliar (11,85 cm) e largura do limbo foliar menor (11,49 cm).

**Tabela 3.** Significância (Probabilidade em % pelo teste F) dos dados relativos às características quantitativas da cultivar BRS Pérola do Cerrado (BRS PC) avaliados em cinco sistemas de produção. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

FONTE DE VARIACÃO	Descritores quantitativos <sup>(1)</sup>														
	GL	LFC (cm)	LFLM (cm)	PC (cm)	FLCB (cm)	FLCS (cm)	FLLS (cm)	FLCP (cm)	FLDC (cm)	FRDL (cm)	FRDT (cm)	FREC (cm)	FRTS (cm)	FRSS (°Brix)	FRNS (cm)
Probabilidade	4	0**	0**	0**	0,1 <sup>ns</sup>	0**	0**	0**	0**	0**	0,7 <sup>ns</sup>	0**	100 <sup>ns</sup>	0**	100 <sup>ns</sup>
Média		9,68	10,60	4,59	2,59	3,67	0,90	3,53	4,03	5,53	4,93	0,50	0,59	12,58	162,80
CV (%)		6,02	4,55	10,53	5,85	4,16	2,60	3,48	3,21	4,18	4,23	7,53	1,80	6,50	12,87
Coefficiente de determinação (%)		85,93	90,34	81,11	60,12	91,03	93,34	93,06	97,46	91,87	63,54	82,12	-	82,65	-

\*\*,\* Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente pelo teste F.

- não foi possível estimar devido à ausência de variância para o efeito dos tratamentos., <sup>(1)</sup>comprimento do limbo foliar (LFC), largura máxima do limbo foliar (LFLM), comprimento do pecíolo (PC), comprimento da bráctea (FLCB), comprimento da sépala (FLCS), largura da sépala (FLLS), comprimento da pétala (FLCP), diâmetro da coroa (FLDC), diâmetro longitudinal do fruto (FRDL), diâmetro transversal do fruto (FRDT), espessura da casca do fruto (FREC), tamanho da semente (FRTS), teor de sólidos solúveis totais (FRSS), número de sementes (FRNS),

**Tabela 4.** Médias das características quantitativas da cultivar BRS Pérola do Cerrado (BRS PC), avaliados em cinco sistemas de produção (SP): latata/convencional (LC); latada/alta tecnologia (LAT); latada/orgânico (LO); espaladeira/convencional (EC); espaladeira/ alta tecnologia (EAT). Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

SP	Descritores quantitativos <sup>(1)</sup>													
	LFC (cm)	FLLM (cm)	PC (cm)	FLCB (cm)	FLCS (cm)	FLLS (cm)	FLCP (cm)	FLDC (cm)	FRDL (cm)	FRDT (cm)	FREC (cm)	FRTS (cm)	FRSS (°Brix)	FRNS (cm)
LC	9,10 ab	9,57 b	4,63 ab	2,61 a	3,34 c	0,88 b	3,24 c	3,82 b	5,94 a	5,00 a	0,54 a	0,59 a	13,33 a	169,25 a
LAT	9,22 ab	10,98 ab	4,75ab	2,71 a	3,82 ab	0,98 a	3,62 ab	4,21 a	5,14 b	4,93 a	0,43 b	0,60 a	12,18 ab	164,00 a
LO	8,99 b	9,98 b	3,64 b	2,55 a	3,89 a	0,87 b	3,71 a	4,38 a	5,39 ab	5,14 a	0,54 a	0,59 a	13,20 ab	164,75 a
EC	10,35ab	10,78 ab	4,83 ab	2,41 a	3,46 bc	0,88 b	3,32 bc	3,42 c	5,98 a	4,89 a	0,50 ab	0,59 a	13,15 ab	161,50 a
EAT	10,64 a	11,59 a	5,08 a	2,69 a	3,86 ab	0,93 ab	3,75 a	4,32 a	5,19 b	4,67 a	0,50 ab	0,60 a	11,03 b	154,50 a

As médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. <sup>(1)</sup>comprimento do limbo foliar (LFC), largura do limbo foliar (LFLM), comprimento do pecíolo (PC), comprimento da bráctea (FLCB), comprimento da sépala (FLCS), largura da sépala (FLLS), comprimento da pétala (FLCP), diâmetro da coroa (FLDC), diâmetro longitudinal do fruto (FRDL), diâmetro transversal do fruto (FRDT), espessura da casca do fruto (FREC), tamanho da semente (FRTS), teor de sólidos solúveis totais (FRSS), número de sementes (FRNS) \*SP: sistemas de produção: latata/convencional (LC); latada/alta tecnologia (LAT); latada/orgânico (LO); espaladeira/convencional (EC); espaladeira/ alta tecnologia (EAT)

A maior média de comprimento do pecíolo também foi obtida no sistema de produção alta tecnologia conduzido em espaldeira (5,08 cm), valor maior que ao relatado por Santos et al. (2014) com 4,898 cm.

Para a característica comprimento da bráctea, as médias apresentadas nos diferentes sistemas de produção foram estatisticamente iguais, entretanto, plantas conduzidas em latada no sistema alta tecnologia apresentaram maior média (2,71cm). Esse comprimento foi maior do que os obtidos por Cervi (1997) e Santos et al. (2014), com 1,5 a 2 cm e 1,853 cm, respectivamente.

O descritor comprimento da sépala apresentou maior média no sistema orgânico com 3,89 cm, muito próxima à obtida por Santos et al. (2014), de 3,92 cm, e dentro dos padrões sugeridos na descrição de Cervi (1997), de 3,5 a 4 cm.

Em relação à largura da sépala, a maior média foi observada no sistema alta tecnologia conduzido em latada (0,98 cm), média maior se comparada às de Cervi (1997) de 0,5 a 0,7 cm e Santos et al. (2014) de 0,94 cm.

A característica comprimento da pétala, no sistema alta tecnologia conduzido em espaldeira, apresentou maior média (3,75 cm) em relação aos demais sistemas e também em relação à média de 3,26 cm relatada por Santos et al. (2014) e 2 a 2,5 cm evidenciada por Cervi (1997). Já a maior média de diâmetro da corona foi obtida no sistema orgânico, de 4,38 cm, média menor àquela verificada por Santos et al. (2014), de 5,225 cm.

Com relação aos descritores dos frutos, a maior média do diâmetro longitudinal foi observada no sistema convencional (espaldeira), seguido do sistema convencional (latada), com 5,98 cm e 5,94 cm, respectivamente. No sistema orgânico, os frutos apresentaram média de 5,39 cm de diâmetro longitudinal, sendo as menores médias observadas em sistema de alta tecnologia, com 5,19 cm e 5,14 cm em espaldeira e latada, respectivamente. As médias obtidas no sistema convencional foram maiores que a descrição de 4 cm realizada por Cervi (1997) e as médias de 5,07 cm observada por Santos et al. (2014) e de 5,47 cm obtida por Ataíde (2012) em estudo realizado em São Paulo.

O diâmetro transversal do fruto foi estatisticamente igual entre os tratamentos. Entretanto, o maior valor médio foi observado no sistema convencional conduzido em latada (5 cm), sendo superior às médias relatadas por Cervi (1997), Ataíde (2012) e Santos et al. (2014), com 3 cm, 3,79 cm e 4,04 cm, respectivamente. Fortaleza et al. (2005) ressaltam que os diâmetros longitudinal e transversal dos frutos são variáveis importantes pois determinam o formato do fruto.

As maiores médias de espessura da casca foram verificadas no sistema convencional (latada) e orgânico (latada), ambos com 0,54 cm, valor superior aos obtidos por Ataíde (2012) de 0,33 cm e Santos et al. (2014) de 0,278 cm.

A característica tamanho da semente apresentou média de 0,6 cm no sistema alta tecnologia (latada e espaladeira) e 0,59 cm nos demais sistemas de produção, o que não demonstrou efeito significativo do sistema de produção. Cervi (1997) e Santos et al. (2014) relataram valores inferiores de 0,5 cm e 0,429 cm, respectivamente.

Quanto ao teor de sólidos solúveis totais, obteve-se a maior média no sistema convencional conduzido em latada, com 13,33 °Brix. Valores maiores foram obtidos por Ataíde (2012) com 16,52 °Brix e Santos et al. (2014) com 17,84 °Brix. Segundo Nascimento et al. (2003), o elevado teor de sólidos solúveis totais (°Brix) é uma característica muito desejável para indústria e principalmente, para o mercado de frutas in natura.

O número de sementes por fruto foi estatisticamente igual nos diferentes sistemas de produção. Observou-se a maior média no sistema convencional (latada), com 169,25 sementes, valor médio similar ao obtido por Santos et al. (2014) para a espécie *Passiflora setacea*.

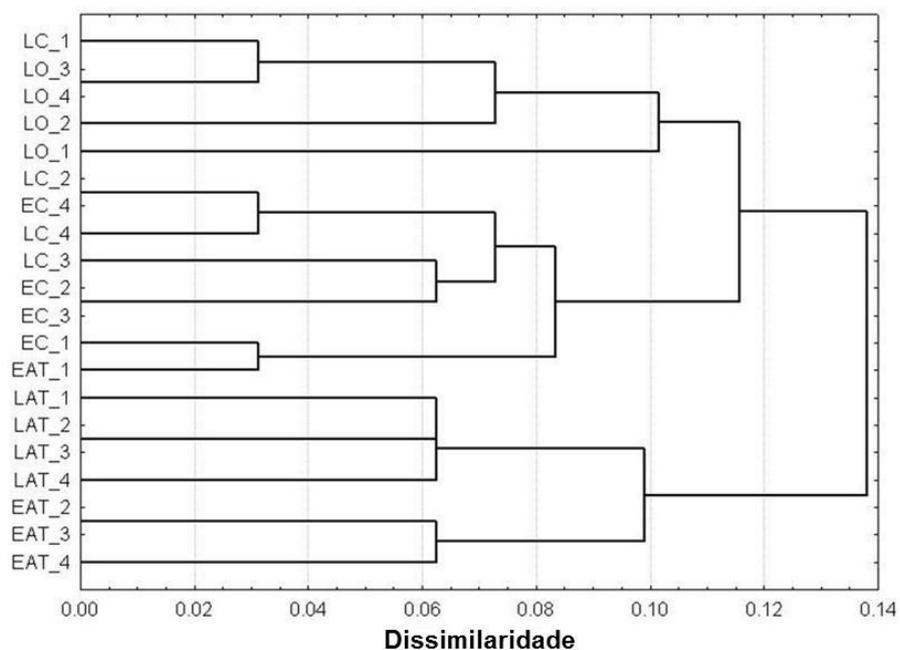
A taxa de validação dos descritores, ou seja, a taxa de coincidência dos descritores em relação aos descritores da cultivar BRS PC utilizados na proteção foi alta nos diferentes sistemas de produção (Tabela 5), sendo as maiores taxas observadas nos sistemas conduzidos em espaladeira (97%) e a menor taxa foi obtida no sistema orgânico (88%). Esta pequena diferença entre os descritores obtidos nos diferentes sistemas de produção também foi observada na análise de agrupamento e dispersão gráfica realizadas com base na análise multivariada dos descritores (Figura 2). A tendência de agrupamento dos diferentes sistemas de produção evidencia uma influência ambiental na obtenção e validação dos descritores.

**Tabela 5.** Taxa de validação (baseada na maior frequência) dos descritores da cultivar BRS Pérola do Cerrado (BRS PC) sob cinco sistemas de produção: latada/convencional (LC), latada/alta tecnologia (LAT), latada/orgânico (LO), espaldeira/convencional (EC) e espaldeira/alta tecnologia (EAT). Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

DESCRITOR <sup>1</sup>	PC*	LC	LAT	LO	EC	EAT
1	1	1	3	3	1	1
2	6	6	6	6	6	6
3	3	3	3	3	3	3
4	5	5	5	5	5	5
5	5	5	5	5	5	5
6	2	2	2	2	2	2
7	5	5	5	5	5	5
8	1	1	1	1	1	1
9	2	2	2	2	2	2
10	7	7	7	5	7	7
11	4	4	4	4	4	4
12	3	3	3	3	3	3
13	1	1	1	1	1	1
14	3	3	3	3	3	3
15	5	5	5	5	5	5
16	5	5	5	5	5	5
17	3	3	3	3	3	3
18	5	5	5	5	5	5
19	3	3	3	3	3	3
20	1	1	1	1	1	1
21	1	1	1	1	1	1
22	-	-	-	-	-	-
23	1	1	1	1	1	1
24	1	1	1	1	1	1
25	5	5	5	5	5	5
26	3	5	3	5	3	3
27	1	1	1	1	1	1
28	1	1	1	1	1	1
29	2	2	2	2	2	2
30	5	5	5	5	5	5
31	3	4	3	4	5	3
32	7	7	5	7	7	5
33	5	5	5	5	5	5
<b>Total de Validação</b>		<b>94%</b>	<b>94%</b>	<b>88%</b>	<b>97%</b>	<b>97%</b>

<sup>1</sup>Descritores 1 a 33 e respectivos códigos de classes fenotípicas – ver Tabela 2. \*Descritores obtidos na ocasião da proteção.

- não apresenta a característica.



**Figura 2.** Análise de agrupamento da cultivar BRS Pérola do Cerrado (BRS PC) em cinco sistemas de produção: latada/convencional (LC), latada/alta tecnologia (LAT), latada/orgânico (LO), espaladeira/convencional (EC) e espaladeira/alta tecnologia (EAT) em quatro repetições, com base na matriz de dissimilaridade, calculada utilizando 32 descritores.

### 3.4 CONCLUSÕES

Os descritores estabelecidos no SNPC-MAPA foram úteis na caracterização da cultivar.

Mudanças na codificação dos descritores da cultivar BRS PC podem ocorrer devido à interação genótipo x ambiente, quantificada pela influência dos diferentes sistemas de produção.

### 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATAÍDE, E.M, OLIVEIRA, J.C, & RUGGIERO, C. Florescimento e frutificação do maracujazeiro silvestre *Passiflora setacea* D.C. cultivado em Jaboticabal, SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v.34, n.2, p.337-381, 2012.

BERNACCI, L.C. (Coord.) Passifloraceae. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHEERD, 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.

BRAGA, M.F., JUNQUEIRA, N.T.V., FALEIRO, F.G., AGOSTINI-COSTA, T.S., & BERNACCI, L.C. Maracujá-do-cerrado. In: VIEIRA, R.F., COSTA, T.S.A., SILVA, D.B. da, FERREIRA, F.R., & SANO, S.M. (Ed.). **Frutas nativas da região Centro-Oeste**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, p.216-233, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Formulário 3 - Espécies em regime de proteção: instruções de DHE e tabela de Descritores Mínimos**. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/protecaocultivares/formularios-protecao-cultivares/MARACUJA\\_OUTRAS\\_SPP\\_FORMULARIO\\_16DEZ2008\\_P.doc](http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/protecaocultivares/formularios-protecao-cultivares/MARACUJA_OUTRAS_SPP_FORMULARIO_16DEZ2008_P.doc)>. Acesso em: 29 dez. 2016.

CERVI, A.C. **Passifloraceae do Brasil**. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. Madrid, p.34-35, 1997.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

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

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **BRS Pérola do Cerrado - Cultivar de maracujazeiro silvestre com quádrupla aptidão: consumo in natura, processamento industrial, ornamental e funcional**. Disponível em:<<http://www.cpac.embrapa.br/publico/usuarios/uploads/lancamentoperola/foldertecnico.pdf>>. Acesso em: 05 jan. 2017a.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Maracujazeiro silvestre faz sucesso em assentamentos de reforma agrária. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cerrados/busca-de-noticias/-/noticia/19714316/maracujazeiro-silvestre-faz-sucesso-em-assentamentos-de-reforma-agraria>. Acesso em: 05 jan. 2017b.

FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V., BRAGA, M.F., & PEIXOTO, J.R. Pré-melhoramento do maracujá. In: LOPES, M.A., FAVERO, A.P., FERREIRA, M.A.J.F., FALEIRO, F.G., FOLLE, S.M., & GUIMARÃES, E.P. (Eds.) **Pré-melhoramento de plantas: estado da arte e experiências de sucesso**. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, DF, p.550-570, 2011.

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, p.41-51, 2005.

FORTALEZA, J.M., PEIXOTO, J.R., JUNQUEIRA, N.T.V., Oliveira, A.T., & RANGEL, L.E.P. Características físicas e químicas de nove genótipos de maracujá-azedo cultivada sob três níveis de adubação potássica. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.27, n.1, p.124-127, 2005.

GUIMARÃES, T.G., DIANESE, A.C., OLIVEIRA, C.M., MADALENA, J.O.M., FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V., LIMA, H.C., & CAMPOS, G.A. **Recomendações técnicas para o cultivo de *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, (Comunicado Técnico, N°174). 6p. ISSN 1517-1469, 2013.

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. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.81-108, 2005.

NASCIMENTO, W.M. do, TOMÉ, A.T., OLIVEIRA, M. do S.P. de, MÜLLER, C.H., & CARVALHO, J.E.U. de. 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.

OLIVEIRA, J.C. & RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônômico. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V., & BRAGA, M.F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.143-158, 2005.

PAIVA, C.L., VIANA, A.P, SANTOS, E.A., SILVA, R.N.O., & OLIVEIRA, E.J. Diversidade genética de espécies do gênero *Passiflora* com o uso da estratégia Ward-MLM. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 36, n. 2, p. 381 – 390, 2014.

SANTOS, E.A., VIANA, A.P., FREITAS, J.C.O., SOUZA, M.M., PAIVA, C.L., RODRIGUES, D.L., & TAVARES, R.F. Phenotyping of *Passiflora edulis*, *P. setacea*, and their hybrids by a multivariate approach. **Genetics and Molecular Research** 13 (4): 9828-9845, 2014.

---

**CAPÍTULO 4**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E MOLECULAR DE CULTIVARES  
DE MARACUJAZEIROS ORNAMENTAIS**

**MORPHOAGRONOMIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF  
ORNAMENTAL PASSION FRUIT VARIETIES**

## RESUMO

Neste trabalho, objetivou-se caracterizar por meio de descritores morfoagronômicos e moleculares as seis cultivares de maracujazeiro ornamental registradas pela Embrapa e parceiros (BRS Rubiflora, BRS Rosea Púrpura – BRS RP, BRS Céu do Cerrado - BRS CC, BRS Roseflora, BRS Estrela do Cerrado and BRS Pérola do Cerrado - BRS PC). Outro objetivo do trabalho foi validar os descritores utilizados nos processos de proteção de cultivares do SNPC-MAPA. Para obtenção dos descritores morfoagronômicos foram analisadas 24 estruturas de plantas de cada cultivar. Para os descritores morfoagronômicos categóricos, foram realizadas análises de distribuição de frequência e análises multivariadas. Para os descritores morfoagronômicos quantitativos, foram realizadas análises de variância e comparação de médias dos descritores. Para os marcadores moleculares foram utilizados marcadores RAPD e ISSR. Observou-se alta taxa de validação dos descritores morfoagronômicos utilizados na proteção de cultivares. As análises de variância mostraram diferenças significativas entre os descritores quantitativos e os marcadores moleculares confirmaram as diferenças genéticas entre as cultivares. Houve uma alta correlação entre as distâncias calculadas com base nos 33 descritores morfoagronômicos categóricos e marcadores moleculares. Verificou-se a utilidade dos descritores morfoagronômicos utilizados no processo de proteção e os marcadores moleculares mostraram-se como ferramentas úteis para a diferenciação precisa entre as cultivares de maracujazeiro ornamental.

**Palavras-chave:** *Passiflora* spp., análise multivariada, marcadores moleculares, correlação, proteção de cultivares.

## ABSTRACT

The purpose of this work was to perform a morphoagronomic and molecular characterization of six varieties of ornamental passion fruit recorded by Embrapa and partners (BRS Rubiflora, BRS Rosea Púrpura – BRS RP, BRS Céu do Cerrado - BRS CC, BRS Roseflora, BRS Estrela do Cerrado and BRS Pérola do Cerrado - BRS PC). Another objective of this work was validate the descriptors used in plant variety protection processes in Brazil. To obtain the morphoagronomic descriptors, 24 plant structures were evaluated in each cultivar. Categorical morphoagronomic descriptors were analyzed by frequency distribution and multivariate analysis. Variance analysis and means comparison were performed for quantitative morphoagronomic descriptors. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) markers were used for molecular analysis. A high validation rate was observed for morphoagronomic descriptors used in the protection of plant varieties. The variance analysis showed significant differences between quantitative descriptors of the cultivars and molecular markers confirmed genetic differences among them. There was a high correlation between the distances calculated based on 33 categorical morphoagronomic descriptors and molecular markers. The usefulness of the morphoagronomic descriptors used in variety protection processes were verified and molecular markers are useful tools for precise differentiation among ornamental passion fruit cultivar.

**Keywords:** *Passiflora* spp., multivariate analysis, molecular markers, correlation, plant variety protection.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais no Brasil, em 2014, apresentou um Produto Interno Bruto (PIB) de R\$ 4,5 bilhões (0,6% do PIB agrícola brasileiro). A produção de flores e plantas ornamentais no País tem como principal destino o mercado interno, sendo os principais consumidores *per capita* os Estados de São Paulo, Distrito Federal e Rio Grande do Sul, respectivamente (IBRAFLOR, 2015; NEVES; ALVES PINTO, 2015).

A utilização do maracujá como planta ornamental iniciou no século XVII, na Europa, com as *Passiflora caerulea* L. e *P. incarnata* L. O cultivo ficou restrito a essas espécies por quase 200 anos, mas em 1819 Thomas Milne, da Inglaterra, obteve o primeiro híbrido artificial, a *Passiflora* ‘Violacea’, resultado do cruzamento entre a *P. racemosa* com *P. caerulea* (PEIXOTO, 2005).

As flores de *Passiflora* despertam interesse pela sua beleza exótica com formatos e cores ímpares, número abundante de flores; florescimento mais de uma vez ao ano e variabilidade de formas foliares (ABREU et al., 2009; SOUZA; PEREIRA, 2003).

Algumas espécies se destacam pelo seu potencial ornamental, entre elas a *Passiflora alata*, *Passiflora nitida*, *P. gardneri*, *P. coccinea*, *P. cincinnata*, *P. glandulosa*, *P. setacea*, *P. amethystina* e vários híbridos naturais ou obtidos pelo melhoramento genético convencional. Estas espécies e híbridos apresentam flores com coloração variando de branca, rósea, lilás, azul e vermelha. Há também espécies com a folhagem exótica, como é o caso de *P. tricuspis*, *P. elegans* e *P. pohlii*. A propagação e cultivo destas espécies já vêm sendo estudados há alguns anos e há grande ênfase no potencial ornamental das passifloráceas (JUNQUEIRA et al., 2005, 2006; JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 2006).

Apesar da utilização do maracujazeiro como planta ornamental há mais de um século nos países do hemisfério norte (PEIXOTO, 2005), a utilização de maracujá com esta finalidade começou recentemente no Brasil, com a obtenção de alguns híbridos ornamentais pela Embrapa em parceria com outras instituições (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014). O lançamento dos primeiros híbridos ornamentais (BRS Estrela do Cerrado, BRS Roseflora e BRS Rubiflora) ocorreu em 2007 e em 2013 foi lançada a cultivar BRS Pérola do Cerrado (BRS PC), que além do potencial ornamental possui outras aptidões como consumo in natura, processamento industrial e propriedade funcional (EMBRAPA, 2015; EMBRAPA, 2016a, 2016b, 2016c).

Para que as cultivares desenvolvidas pelos programas de melhoramento genético cheguem aos produtores e beneficiem toda cadeia produtiva, é indispensável um sistema

organizado de produção e comercialização de sementes e mudas e para isso é necessário o registro das cultivares no Registro Nacional de Cultivares (RNC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Além do registro, as cultivares podem ser protegidas no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) do MAPA e como pré-requisito, as cultivares devem ser produto de melhoramento genético e devem atender aos critérios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE), os quais são verificados por meio dos descritores mínimos constantes das instruções para execução dos ensaios de DHE publicados pelo SNPC (JESUS et al., 2015; JESUS et al., 2016; BRASIL, 2016). Nesse sentido, o SNPC, publicou em 2008, um conjunto de instruções oficiais para realização de testes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) de cultivares de espécies silvestres e híbridos interespecíficos do gênero *Passiflora*, onde consta uma lista de 33 descritores morfoagronômicos. A aplicação segura e eficaz dessas instruções requer a validação experimental com diversos cultivares conhecidos, a fim de se estabelecer cultivares-exemplo, fundamentais para harmonizar a utilização das metodologias em diferentes regiões e por distintos avaliadores (BRASIL, 2016).

A caracterização das cultivares e a diversidade genética entre elas pode ser feita com base em descritores morfoagronômicos e também com base em marcadores moleculares. Estudos de caracterização e diversidade genética utilizando características morfológicas e agronômicas para evidenciar a variabilidade genética do gênero *Passiflora* tem sido relatados na literatura (ARAÚJO et al. 2008, MACHADO et al., 2015; SANTOS et al., 2011a) e também combinados com marcadores moleculares (VIANA et al., 2010).

Os objetivos deste trabalho foram: caracterizar por meio de descritores morfoagronômicos e marcadores moleculares as seis cultivares de maracujazeiro ornamental registradas pela Embrapa e parceiros (BRS Rubiflora, BRS Rósea Púrpura - BRS RP, BRS Céu do Cerrado - BRS CC, BRS Roseflora, BRS Estrela do Cerrado e BRS Pérola do Cerrado – BRS PC), e validar os descritores utilizados nos processos de proteção de cultivares do SNPC-MAPA.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Caracterização morfoagronômica

Foram caracterizadas seis cultivares de maracujazeiro ornamental (BRS Rubiflora, BRS Rosea Púrpura – BRS RP, BRS Roseflora, BRS Céu do Cerrado – BRS CC, BRS Estrela do Cerrado e BRS Pérola do Cerrado – BRS PC) conforme as instruções para ensaios de DHE (distinguilidade, homogeneidade e estabilidade), as quais consta uma lista com 33 descritores morfoagronômicos proposta pelo Serviço Nacional de Proteção de cultivares (SNPC-MAPA) para espécies silvestres e híbridos interespecíficos do gênero *Passiflora* (ANEXO B), publicada em 2008 (BRASIL, 2016). Tais descritores, que já tinham sido obtidos para o pedido de proteção, foram obtidos novamente para o processo de validação, considerando a realização da caracterização morfoagronômica em diferentes épocas ou locais. As avaliações foram realizadas em 2014 e 2015, em unidades demonstrativas e no Banco Ativo de Germoplasma “Flor da Paixão”, com exceção da cultivar BRS Pérola do Cerrado (BRS PC) que foi avaliada no campo experimental, ambos localizados na Embrapa Cerrados, Planaltina, DF.

As seis cultivares utilizadas são produtos de programas de melhoramento genético da Embrapa Cerrados e colaboradores. A BRS Estrela do Cerrado é um híbrido resultante do cruzamento entre duas espécies silvestres [*Passiflora coccinia* (flor vermelha) e *Passiflora setacea* (flor branca)] e os híbridos BRS Rubiflora e BRS Roseflora são retrocruzamentos entre BRS Estrela do Cerrado e *P. coccinia* e *P. setacea*, respectivamente (FALEIRO et al., 2009). A cultivar de maracujazeiro silvestre BRS Pérola do Cerrado (BRS PC) foi obtida por meio de seleção massal de populações obtidas utilizando vários acessos da espécie *Passiflora setacea* (EMBRAPA, 2015). Os cruzamentos para obtenção da BRS Rosea Púrpura (BRS RP) envolvem três espécies silvestres do gênero *Passiflora* (*P. quadrifaria*, *P. setacea* e *P. incarnata*) e, por fim, a cultivar BRS Céu do Cerrado (BRS CC) foi obtida com base no cruzamento entre as espécies *P. incarnata* e *P. edulis* que foi retrocruzado com *P. edulis*.

Dos 33 descritores morfoagronômicos (19 qualitativos/pseudoqualitativos e 14 quantitativos), 11 estão relacionados ao ramo, limbo foliar e pecíolo, 12 são referentes às flores e 10 são características dos frutos (Tabela 1). Os descritores qualitativos e pseudoqualitativos são: coloração do ramo; limbo foliar: forma, divisão, sinus, profundidade do sinus, bulado, pilosidade e posição dos nectários no pecíolo; flor: forma do hipanto, coloração predominante no perianto, período predominante de antese, coloração predominante da corona, bandeamento nos filamentos mais longos da corona, número de anéis coloridos nos filamentos mais longos

da corona e filamentos mais longos da corona; fruto: forma, coloração predominante da casca, lenticelas distribuídas em padrão de estria e coloração da polpa.

As características quantitativas são: comprimento do limbo foliar (LFC), largura máxima do limbo foliar (LFLM), comprimento do pecíolo (PC), comprimento da bráctea (FLCB), comprimento da sépala (FLCS), largura da sépala (FLLS), comprimento da pétala (FLCP); diâmetro da corona (FLDC), diâmetro longitudinal do fruto (FRDL), diâmetro transversal do fruto (FRDT), espessura da casca do fruto (FREC), tamanho da semente (FRTS) teor de sólidos solúveis totais (FRSS) e número de sementes por fruto maduro (FRNS).

Para a análise das características qualitativas foram atribuídos os códigos sequenciais numéricos de acordo com a classe fenotípica dos descritores para *Passiflora* spp. (BRASIL, 2016). Para definição da classe fenotípica de cada descritor em cada cultivar, foram analisados 24 ramos, folhas, flores ou frutos obtidos de pelo menos 12 plantas. No caso das características quantitativas, as 24 estruturas foram mensuradas com o auxílio de paquímetro digital e refratômetro digital, conforme a necessidade de avaliação do descritor e, para a característica espessura de casca, os frutos foram cortados ao meio (transversalmente) e foram realizadas três medições em diferentes posições do fruto, utilizando-se a média delas para definição da classe fenotípica. A partir do código da classe fenotípica atribuído para cada uma das 24 estruturas, foi analisada a distribuição de frequência de cada código, sendo que o mais frequente foi o definido para caracterizar cada descritor de cada uma das cultivares analisadas. No caso de empate foi utilizado como critério o código obtido na ocasião do pedido de proteção das cultivares.

A partir dos códigos definidos para os 33 descritores e seis cultivares, foram estimadas dissimilaridades genéticas entre as cultivares, utilizando-se os índices da coincidência simples das características categóricas, com o auxílio do Programa Genes (CRUZ, 2013). A partir da matriz de dissimilaridade genética obtida foram realizadas análises de agrupamento, utilizando-se como critério o método do UPGMA (*Unweighted pair-group method arithmetic average*) e dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS (SAS INSTITUTE INC., 1989). O ajuste da matriz de dissimilaridade com o respectivo dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenético ( $r$ ), utilizando-se o programa NTSYS pc 2.1 (ROHLF, 2000).

Os 14 descritores quantitativos também foram analisados separadamente. Oito descritores relacionados à folha e flor foram avaliados em todas as cultivares, entretanto, os seis descritores relacionados ao fruto foram avaliados apenas na cultivar BRS PC que produz frutos

em condições naturais e na cultivar BRS RP que produz frutos partenocárpicos (sem polpa e semente). Para tais análises quantitativas, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis tratamentos (BRS Rubiflora, BRS RP, BRS Roseflora, BRS CC, BRS Estrela do Cerrado e BRS PC) e quatro repetições, sendo cada repetição a média de seis medidas/classificações de estruturas (ramos, folhas, flores e frutos). Foram realizadas análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 1% de significância. Foram estimadas medidas de dissimilaridade genética entre as cultivares com base nos oito descritores quantitativos comuns às seis cultivares usando a distância de Mahalanobis, também com o auxílio do Programa Genes (CRUZ, 2013).

Análises de agrupamento e dispersão gráfica foram realizadas a partir da matriz de dissimilaridade genética como relatado para as características categóricas. A contribuição relativa dos descritores quantitativos para a divergência genética entre as cultivares foi estimada de acordo com o critério proposto por Singh (1981).

#### **4.2.2 Caracterização molecular**

A caracterização molecular das seis cultivares de maracujazeiro ornamental, utilizando marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), foi realizada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados, Planaltina-DF.

A partir do tecido foliar em estágio intermediário de maturação de cada material, foi extraído o DNA genômico, utilizando o método do CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio), com modificações (FALEIRO et al., 2003).

A quantidade de DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm ( $A_{260}$ ), e a relação  $A_{260}/A_{280}$  foi utilizada para avaliar a pureza e a qualidade do material (SAMBROOCK et al., 1989). As amostras de DNA de cada acesso foram diluídas para 10  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$  para RAPD e 5  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$  para ISSR.

Para obtenção dos marcadores RAPD, foram utilizados dez *primers* decâmeros (OPD-07, OPD-10, OPE-16, OPE-18, OPF-17, OPG-01, OPG-05, OPG-08, OPG-17 e OPH-04). As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13  $\mu\text{L}$ , contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 100  $\mu\text{M}$  de cada um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4  $\mu\text{M}$  de um primer (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 15  $\eta\text{g}$  de DNA. As amplificações

foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte sequência: 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.

Para marcadores ISSR, o DNA foi amplificado utilizando-se sete *primers* (ISSR-5, ISSR-6, ISSR-7, ISSR-8, ISSR-13, ISSR-14 e ISSR-15) e a seguinte reação: 20 ng de DNA genômico, 1 unidade de Taq DNA polimerase, 0,3 µM de primer em solução 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) água até completar um volume de 13 µl. As amplificações foram efetuadas em termociclador programado por 5 minutos a 94 °C, 35 ciclos cada um constituído pela seguinte sequência: 40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 48 °C e 1 minuto a 72°C. Após os 35 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de dois minutos a 72 °C, e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C.

Após as amplificações via RAPD e ISSR, adicionou-se 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 e ISSR gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre as cultivares, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, com o auxílio do Programa Genes (CRUZ, 2013). As matrizes de distâncias genéticas foram utilizadas para realizar análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando-se 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 (STATSOFT INC, 1999).

Também foram estimadas as correlações das distâncias genéticas entre as cultivares obtidas com base nos 33 descritores morfoagronômicos categóricos, oito descritores quantitativos e marcadores moleculares, com base no coeficiente de correlação de Pearson, com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2013).

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.1 Caracterização morfoagronômica

Foram obtidos diferentes números de descritores para as seis cultivares de maracujazeiro ornamental (Tabela 1): 32 descritores para BRS PC, 29 descritores para BRS RP, 23 descritores para BRS CC e 21 descritores para BRS Rubiflora, BRS Roseflora e BRS Estrela do Cerrado, devido à ausência de características. A cultivar BRS PC não apresenta anéis coloridos nos filamentos mais longos da corona. A BRS RP apresenta fruto partenocárpico, ou seja, não ocorre a fertilização e formação de sementes, logo não foi possível avaliar as quatro características referentes à polpa e sementes do fruto e a BRS CC não apresenta fruto em condições naturais, portanto, não se estimou as 10 características relacionadas ao fruto. As cultivares BRS Rubiflora, BRS Roseflora e BRS Estrela do Cerrado além de não formarem frutos também não apresentam sinus no limbo foliar e anéis coloridos nos filamentos mais longos da corona.

Do total de descritores morfoagronômicos obtidos e com base na maior frequência para definição da classe, apenas comprimento do limbo foliar e comprimento da pétala não foram eficientes na diferenciação das seis cultivares que apresentaram a mesma categoria fenotípica. Entretanto, as cultivares BRS Rubiflora, BRS Roseflora e BRS Estrela do Cerrado apresentaram a maioria das características similares (Tabela 1) como folhas simples, ovadas, pilosas, de comprimento médio e largura estreita, os nectários são adjacentes à inserção da folha no ramo, hipanto campanulado, perianto de coloração vermelha, antese matutina, sépala de largura média, pétala de comprimento médio e corona branca com filamentos lisos (Figuras 1A, 1C e 1E).

A coloração predominante do ramo da cultivar BRS Roseflora é verde-clara, diferentemente da BRS Estrela do Cerrado e BRS Rubiflora, que apresentaram maior porcentagem de ramos verde-escuros, além disso, a cultivar BRS Roseflora apresentou menor comprimento de bráctea e maior comprimento de sépala, já a cultivar BRS Rubiflora apresentou pecíolo de menor comprimento e a BRS Estrela do Cerrado apresentou maior comprimento da corona (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características (descritores) e distribuição de frequência baseada na porcentagem da classe fenotípica de cada descritor, considerando 24 folhas, flores e frutos avaliados para cada maracujazeiro ornamental (BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora, BRS Roseflora, BRS CC, BRS RP e BRS PC). Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

Característica	Identificação da característica	BRS Estrela do Cerrado	BRS Rubiflora	BRS Roseflora	BRS CC	BRS RP	BRS PC
1. Ramo: coloração	verde-clara (1), verde-escura (2), verde-arroxeadada (3), roxa (4)	1 (21%) 2 (79%)	1 (42%) 2 (58%)	1 (83%) 2 (17%)	3(100%)	1 (67%) 3 (33%)	1 (50%) 2 (12%) 3 (37%)
2. Limbo foliar: forma	lanceolada(1), ovada (2), cordata (3), oblonga (4), elíptica (5), fendida (6), partida (7), seccionada(8)	2(100%)	2 (92%) 4 (8%)	2(100%)	6(100%)	6(100%)	6(100%)
3. Limbo foliar: divisão	simples (1), bilobada (2), trilobada (3), pentalobada (4), heptalobada (5)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	3(100%)	3(100%)	3(100%)
4. Limbo foliar: comprimento	curto<8cm (3); médio 8-15cm (5); longo>15cm (7)	5(100%)	3 (4%) 5 (96%)	5(100%)	3 (46%) 5 (54%)	3 (4%) 5 (96%)	5(100%)
5. Limbo foliar: largura máxima	estreita< 8 cm (3); média 8-15 cm (5); larga> 15 cm (7)	3(100%)	3(100%)	3(100%)	3 (12%) 5 (88%)	5(100%)	5(100%)
6. Limbo foliar: sinus	ausente (1), presente (2)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)
7. Limbo foliar: profundidade do sinus	rasa (3), média (5), profunda (7)	-	-	-	5(100%)	5(100%)	5(100%)
8. Limbo foliar: bulado	ausente (1), presente (2)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	2(100%)	1(100%)	1(100%)
9. Limbo foliar: pilosidade	ausente (1), presente (2)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	1(100%)	2(100%)	2(100%)
10. Pecíolo: comprimento	curto<2cm (3);médio 2-4cm (5); longo> 4cm (7)	3 (4%) 5 (67%) 7 (29%)	3 (71%) 5 (29%)	5 (63%) 7 (37%)	3 (54%) 5 (46%)	3 (46%) 5 (54%)	5 (8%) 7 (92%)
11. Pecíolo: posição das glândulas (nectários)	adjacente ao limbo foliar (1), próximo ao meio do pecíolo (2), adjacente à inserção da folha no ramo (3), distribuídos ao longo do pecíolo (4)	3 (92%) 4 (8%)	3 (54%) 4 (46%)	3(71%) 4(29%)	1(100%)	2(100%)	4(100%)
12. Flor: forma do hipanto	aplanada (1), campanulada (2), cilíndrica (3)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	2(100%)	1(100%)	3(100%)
13. Flor: coloração predominante no perianto (sépalas e pétalas, internamente)	branca (1), rosada (2), vermelha (3), vermelha-arroxeadada (4), roxa (5), azul-arroxeadada (6), azul (7)	3(100%)	3(100%)	3(100%)	1(100%)	2(100%)	1(100%)
14. Flor: período predominante de antese das flores	matutino (1), vespertino (2), noturno (3)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	2(100%)	1(100%)	3(100%)
15. Flor: comprimento da bráctea	curto<2cm (3);médio 2-4cm (5); longo> 4cm (7)	5 (4%) 7 (96%)	7(100%)	5 (79%) 7 (21%)	3 (88%) 7 (12%)	3 (12%) 5 (88%)	5(100%)
16. Flor: comprimento da sépala	curto<3cm (3);médio 3-6cm (5); longo>6cm (7)	5(100%)	5(100%)	5 (29%) 7 (71%)	5(100%)	5(100%)	3 (4%) 5 (96%)
17. Flor: largura da sépala	estreita <1cm (3); média 1-2cm (5); larga >2cm (7)	5(100%)	5(100%)	3 (4%) 5 (96%)	5(100%)	5(100%)	3(100%)
18. Flor: comprimento da pétala	curto<3cm (3);médio 3-6cm (5); longo>6cm (7)	5(100%)	5(100%)	5 (88%) 7 (12%)	5(100%)	5(100%)	3 (4%) 5 (96%)
19. Flor: diâmetro da corona	pequeno<5cm (3); médio 5-10cm (5); grande>10cm (7)	3 (4%) 5 (96%)	3(100%)	3(100%)	5(100%)	5(100%)	3(100%)
20. Flor: coloração predominante da corona	branca (1), rosada (2), vermelha (3), vermelha-arroxeadada (4), roxa (5), azul-arroxeadada (6), azul (7)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	6(100%)	2(100%)	1(100%)
21. Flor: bandeamento (anéis de cores diferentes entre si, inclusive brancos) nos filamentos mais longos da corona	ausente (1), presente (2)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	2(100%)	2(100%)	1(100%)
22. Flor: número de anéis coloridos (excluídos os brancos) nos filamentos mais longos da corona	um (1), mais de um (2)	-	-	-	2(100%)	2(100%)	-

23. Flor: filamentos mais longos da coroa	lisos (1), ondulados (2)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	2(100%)	1(100%)	1(100%)
24. Fruto: forma	ovalada (1), oblonga (2), arredondada (3), oblata (4), elipsoide (5), fusiforme (6), oboval (7)	-	-	-	-	1(100%)	1(96%) 3(4%)
25. Fruto: diâmetro longitudinal	pequeno<5cm (3); médio 5-15cm (5); grande>15cm (7)	-	-	-	-	3(100%)	3 (4%) 5 (96%)
26. Fruto: diâmetro transversal	pequeno<5cm (3); médio 5-10cm (5); grande>10cm (7)	-	-	-	-	3(100%)	3 (67%) 5 (33%)
27. Fruto: coloração predominante da casca (epiderme)	verde (1), amarela (2), laranja (3), rosada(4), vermelha (5), roxa (6)	-	-	-	-	1(100%)	1(100%)
28. Fruto: lenticelas distribuídas em padrão de estrias	ausente (1), presente (2)	-	-	-	-	1(100%)	1(100%)
29. Fruto: espessura da casca	muito fina <0,3cm (1); Fina 0,3-0,6cm (2); média >0,6-1 cm (3); espessa >1-1,5cm (4); muito espessa >1,5cm (5)	-	-	-	-	2 (88%) 3 (12%)	2 (96%) 3 (4%)
30. Fruto: tamanho da semente	pequeno<0,3cm (3); médio 0,3-0,7cm (5);grande<0,7cm (7)	-	-	-	-	-	5(100%)
31. Fruto: coloração da polpa	esbranquiçada (1), amarelo-esverdeada (2), amarela (3), amarelo-alaranjada (4), alaranjada (5), alaranjada-escura (6), vermelha (7)	-	-	-	-	-	2(21%) 3(12%) 4(29%) 5(38%)
32. Fruto: teor de sólidos solúveis totais	muito baixo< 7o Brix (1); baixo 7-10o Brix (3); médio>10-13o Brix (5); alto>13-17o Brix (7); muito alto> 17o Brix (9)	-	-	-	-	-	5(46%) 7(54%)
33. Fruto: número de sementes, com polinização natural, por fruto maduro	muito pequeno< 50 (1); pequeno 50-100 (3); médio >100-200 (5); grande >200-400 (7); muito grande>400 (9)	-	-	-	-	-	3 (8%) 5 (71%) 7 (21%)

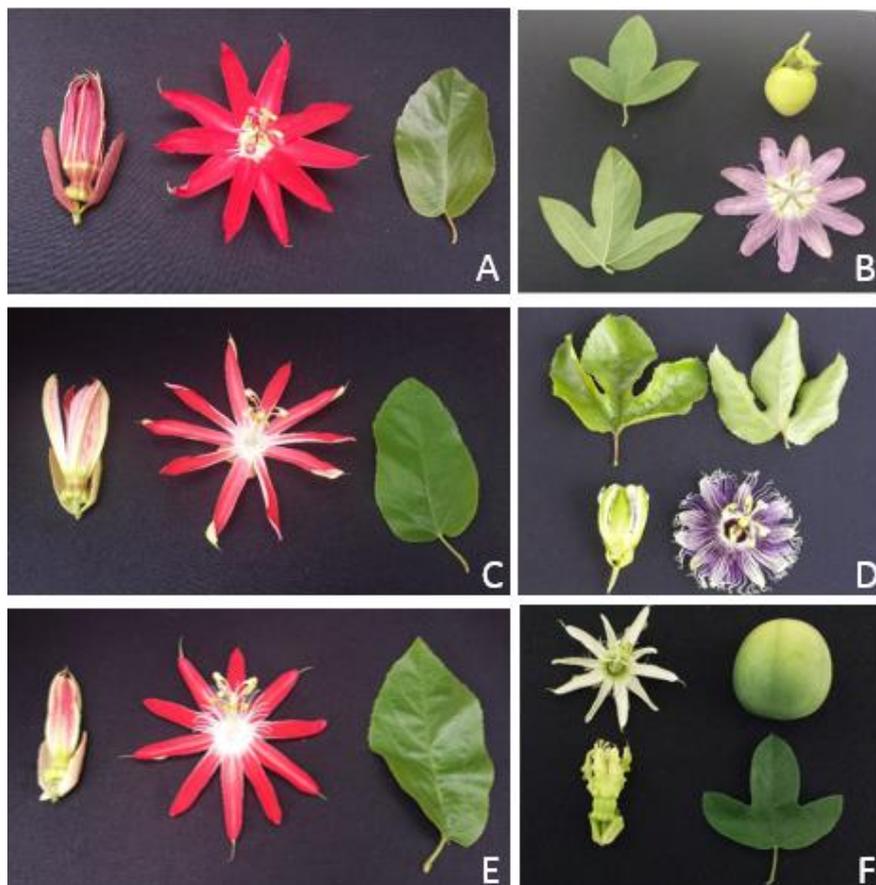
- não apresenta a característica

De acordo com a Tabela 1 e com base na maior frequência fenotípica, as cultivares BRS CC, BRS RP e BRS PC também apresentam alguns descritores morfoagronômicos em comum, como por exemplo folhas fendidas, trilobadas, de comprimento e largura médios, sinus de média profundidade e comprimento médio das sépalas e pétalas.

A cultivar BRS RP apresenta coloração do ramo predominante verde-clara, folhas pilosas, pecíolo de comprimento médio (2 a 4 cm), nectários localizados ao meio do pecíolo, hipanto aplanado, sépalas e pétalas rosadas, antese matutina, comprimento médio da bráctea (2 a 4cm), sépala com largura média (1 a 2 cm), coroa rosada com diâmetro médio (5 a 10 cm), a qual possui mais de um anel colorido nos filamentos mais longos, sendo estes lisos (Figura 1B).

A cultivar BRS CC possui ramos de coloração verde-arroxeadada, folhas buladas, pecíolo curto e nectários adjacentes ao limbo foliar, hipanto campanulado, perianto branco, antese vespertina, bráctea de comprimento curto (menor que 2 cm), sépala de médio comprimento (3 a 6 cm) e largura (1 a 2 cm), pétala de comprimento médio (3-6 cm), coroa com diâmetro médio (5 a 10 cm) de coloração azul-arroxeadada e com mais de um anel colorido nos filamentos

mais longos, sendo estes ondulados (Figura 1D).

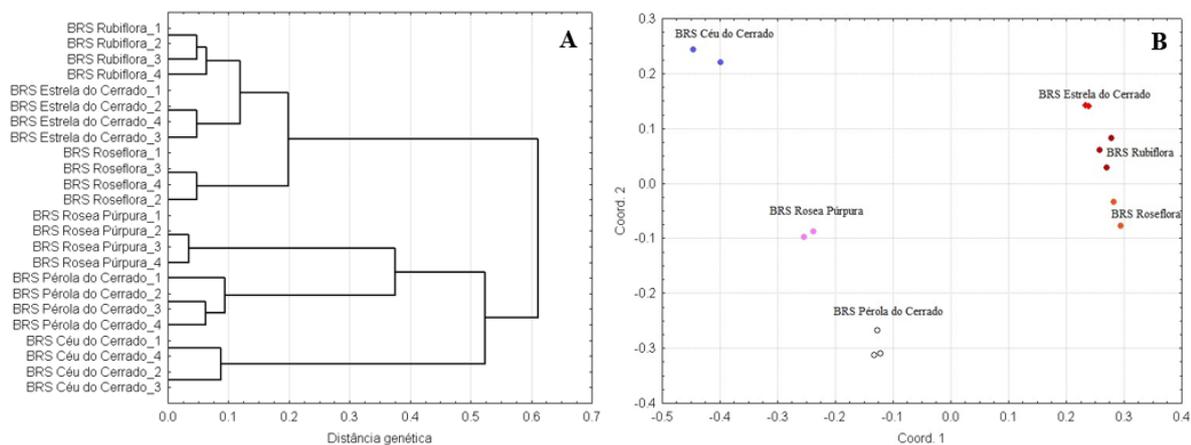


**Figura 1.** Estruturas (folhas, flores e frutos) utilizadas para obtenção dos descritores morfoagronômicos das cultivares BRS Rubiflora (A), BRS RP (B), BRS Roseflora (C), BRS CC (D), BRS Estrela do Cerrado (E) e BRS PC (F).

A cultivar BRS PC possui ramos predominantemente verde-claros, folhas pilosas, pecíolos longos (maior que 4 cm) com nectários distribuídos em seu comprimento, hipanto cilíndrico, pétalas e sépalas brancas, antese noturna, bráctea de comprimento médio (2 a 4cm), sépala estreita (menor que 1cm), coroa branca com diâmetro menor que 5 cm (pequeno) e com filamentos mais longos lisos (Figura 1F).

Quanto aos frutos avaliados das cultivares BRS RP e BRS PC, ambas apresentam frutos ovais com coloração verde, diâmetro transversal pequeno (menor que 5 cm) e espessura da casca fina (0,3 a 0,6 cm). O diâmetro longitudinal dos frutos foi classificado como médio (5 a 15 cm) para BRS PC e pequeno (menor que 5 cm) para BRS RP. Alguns descritores foram avaliados apenas em BRS PC: tamanho da semente médio (0,3 a 0,7 cm), polpa alaranjada, teor de sólidos solúveis totais alto (13 a 17°Brix) e médio número de sementes (100 a 200).

A análise de agrupamento (Figura 2A) e dispersão gráfica (Figura 2B) geradas pela análise multivariada com base na coincidência simples dos 33 descritores categóricos evidenciaram uma tendência de agrupamento entre as cultivares BRS Rubiflora, BRS Estrela do Cerrado e BRS Roseflora, que apresentam como principais características folhas simples e flores vermelhas. Essas cultivares apresentam em sua genealogia a mesma base genética (*Passiflora coccinea* e *Passiflora setacea*), motivo pelo qual apenas cinco dos 21 descritores obtidos apresentaram diferente codificação, permitindo a diferenciação entre elas (coloração do ramo, comprimento do pecíolo, bráctea e sépala e diâmetro da corona). Dentre essas cultivares as mais semelhantes morfoagronomicamente foram a BRS Estrela do Cerrado e BRS Rubiflora diferindo apenas para as características “comprimento do pecíolo” e “diâmetro da corona”.



**Figura 2.** Análise de agrupamento (A) e dispersão gráfica (B) de seis cultivares de maracujazeiro ornamental com base na matriz de distâncias genéticas calculadas, utilizando-se 33 descritores categóricos em quatro repetições. O método UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

A análise de variância pelo teste F (Tabela 2) mostrou que houve diferenças altamente significativas para os oito descritores quantitativos de folha e flor envolvendo as seis cultivares (LFC, LFLM, PC, FLCB, FLCS, FLLS, FLCP e FLDC), indicando a variabilidade genética entre as seis cultivares de maracujazeiro ornamental. Em relação aos descritores dos frutos avaliados em duas cultivares, apenas espessura da casca foi estatisticamente igual entre elas. Os coeficientes de variação foram baixos, evidenciando a qualidade dos dados experimentais e o coeficiente de determinação apresentou valores altos em todos os descritores quantitativos

avaliados, o que demonstra a acurácia e confiabilidade dos dados (CRUZ et al., 2004).

Observou-se, pela comparação de médias (Tabela 3), diferenças entre os 11 descritores quantitativos, com exceção do descritor espessura de casca do fruto, nas seis cultivares de maracujazeiros ornamentais. Em três dessas dez características, apesar de apresentarem diferenças significativas, as cultivares de maracujazeiro são codificadas na mesma classe fenotípica (Tabela 1): comprimento do limbo foliar (médio: 8 a 15 cm), comprimento da pétala (médio: 3 a 6 cm) e diâmetro transversal do fruto (pequeno: menor que 5 cm).

A cultivar BRS Rubiflora apresentou maior comprimento de bráctea (4,86 cm) e largura da sépala (1,52 cm), a BRS RP apresentou maior espessura da casca do fruto (0,55 cm), a BRS Roseflora apresentou maiores comprimentos de limbo foliar (12 cm), sépala (6,13 cm) e pétala (5,82 cm), a BRS CC apresentou maior diâmetro da corona (7,97 cm) e a BRS PC apresentou maior largura do limbo foliar (10,78 cm), comprimento do pecíolo (4,83 cm), diâmetro longitudinal (5,98 cm) e transversal do fruto (4,89 cm). Diferenças significativas entre espécies de *Passiflora* com potencial ornamental também foram observados por Santos et al. (2011a) ao avaliar 14 descritores quantitativos, indicando a variabilidade genética entre esses materiais.

**Tabela 2.** Significância (Probabilidade em % pelo teste F) e parâmetros genéticos dos dados relativos às características quantitativas das seis cultivares de maracujazeiro ornamental. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

FONTE DE VARIACÃO	Descritores quantitativos <sup>(1)</sup>											
	LFC (cm)	LFLM (cm)	PC (cm)	FLCB (cm)	FLCS (cm)	FLLS (cm)	FLCP (cm)	FLDC (cm)	FRDL (cm)	FRDT (cm)	FREC (cm)	
Tratamentos (significância)	0**	0**	0**	0**	0**	0**	0**	0**	0**	0**	0**	0,04*
Média	10,19	8,08	2,95	3,27	4,64	1,26	4,58	5,15	5,14	4,17	0,53	
CV (%)	5,77	4,05	9,03	4,89	3,36	3,57	1,95	6,07	3,13	3,62	5,55	
Coefficiente de determinação	96,05	99,54	98,77	99,62	99,50	99,02	99,81	99,39	99,54	99,45	85,95	

\*\*,\* Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

<sup>(1)</sup>comprimento do limbo foliar (LFC), largura máxima do limbo foliar (LFLM), comprimento do pecíolo (PC), comprimento da bráctea (FLCB), comprimento da sépala (FLCS), largura da sépala (FLLS), comprimento da pétala (FLCP), diâmetro da coroa (FLDC), diâmetro longitudinal do fruto (FRDL), diâmetro transversal do fruto (FRDT), espessura da casca do fruto (FREC).

**Tabela 3.** Médias das características quantitativas das seis cultivares de maracujazeiros ornamentais: comprimento do limbo foliar (LFC), largura máxima do limbo foliar (LFLM), comprimento do pecíolo (PC), comprimento da bráctea (FLCB), comprimento da sépala (FLCS), largura da sépala (FLLS), comprimento da pétala (FLCP), diâmetro da coroa (FLDC), diâmetro longitudinal do fruto (FRDL), diâmetro transversal do fruto (FRDT), espessura da casca do fruto (FREC). Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

CULTIVAR	LFC (cm)	LFLM (cm)	PC (cm)	FLCB (cm)	FLCS (cm)	FLLS (cm)	FLCP (cm)	FLDC (cm)	FRDL (cm)	FRDT (cm)	FREC (cm)
BRS Rubiflora	9,73 cd	5,40 d	1,93 c	4,86 a	5,32 b	1,52 a	5,35 b	4,07 c	-	-	-
BRS RP	9,23 cd	10,18 ab	2,04 c	2,42 c	4,09 c	1,39 b	4,08 c	6,53 b	4,30 b	3,45 b	0,55 a
BRS Roseflora	12,00 a	6,41 c	3,66 b	3,87 b	6,13 a	1,13 c	5,82 a	2,89 d	-	-	-
BRS CC	8,13 d	9,79 b	1,90 c	1,61 d	3,52 d	1,36 b	3,65 d	7,97 a	-	-	-
BRS Estrela do Cerrado	11,70 ab	5,94 cd	3,33 b	4,46 a	5,36 b	1,30 b	5,28 b	6,04 b	-	-	-
BRS PC	10,35 bc	10,78 a	4,83 a	2,41 c	3,46 d	0,88 d	3,32 e	3,42 cd	5,98 a	4,89 a	0,50 a

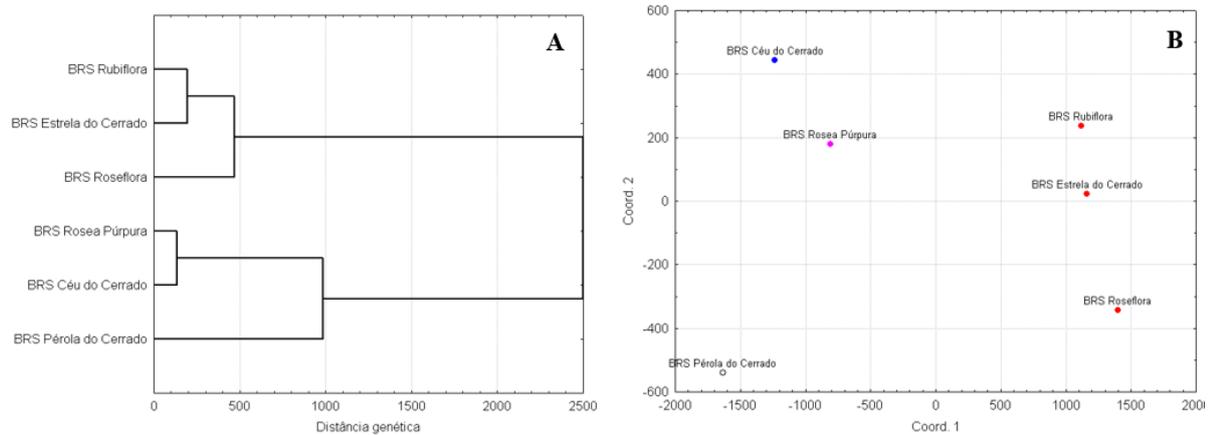
As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.  
 (-) as cultivares BRS Rubiflora, BRS Roseflora, BRS CC e BRS Estrela do Cerrado não produzem frutos.

Verificou-se que a contribuição relativa dos oito descritores quantitativos para a divergência genética envolvendo as seis cultivares variou de 3,48% a 33,92% (Tabela 4). O descritor que mais contribuiu na diferenciação foi a largura máxima do limbo foliar (aproximadamente 34%), seguido do comprimento da pétala (26,17%) e os descritores que menos contribuíram foram comprimento da sépala (3,48%) e diâmetro da coroa (3,81%), respectivamente. Santos et al. (2011a), verificaram maior contribuição relativa para os caracteres diâmetro da flor (26,27%) e comprimento do pedúnculo da flor (26,34%) para maracujazeiro com potencial ornamental, entretanto, esses descritores não constam na lista avaliada no presente trabalho.

**Tabela 4.** Contribuição relativa dos oito descritores quantitativos analisados para a divergência, em ordem decrescente de importância. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

<b>Descritor</b>	<b>Valor (%)</b>
Largura máxima do limbo foliar (LFLM)	33,92
Comprimento da pétala (FLCP)	26,17
Largura da sépala (FLLS)	10,28
Comprimento da bráctea (FLCB)	8,84
Comprimento do pecíolo (PC)	8,75
Comprimento limbo foliar (LFC)	4,75
Diâmetro da coroa (FLDC)	3,81
Comprimento da sépala (FLCS)	3,48

As análises de agrupamento (Figura 3A) e dispersão gráfica (Figura 3B) obtidas com base nos descritores quantitativos evidenciam a coerência desses dados com as mesmas análises obtidas com os descritores categóricos (Figura 2) e a importância da utilização de descritores morfoagronômicos para diferenciação de cultivares e quantificação da variabilidade genética. A importância da utilização de descritores na diferenciação também foi evidenciada por Paiva et al. (2014), Santos et al. (2011a), Santos et al. (2014) e Viana et al. (2010) ao estudarem o gênero *Passiflora*.



**Figura 3.** Análise de agrupamento (A) e dispersão gráfica (B) de seis cultivares de maracujazeiro ornamental com base na matriz de distâncias genéticas calculadas, utilizando-se 11 descritores quantitativos. O método UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

O coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ) foi de 0,95 para as análises dos 33 descritores categóricos e 0,90 para os oito descritores quantitativos, indicando um excelente ajuste entre a matriz e o gráfico.

A taxa de validação (Tabela 5), ou seja, a taxa de coincidência dos descritores obtidos em relação aos descritores das cultivares utilizados nos pedidos de proteção foi alta nos diferentes maracujazeiros ornamentais (100% para BRS RP, 97% para BRS PC, 96% para BRS CC, 90% para BRS Estrela do Cerrado, 81% para BRS Rubiflora e 71% para BRS Roseflora). Estas taxas de validação mostram a utilidade dos atuais descritores utilizados nos pedidos de proteção, entretanto evidencia a necessidade de alguns ajustes para melhorar a acurácia das avaliações fenotípicas.

A presença de variabilidade fenotípica dos descritores na mesma cultivar e até na mesma planta pode ter levado às diferenças na obtenção dos descritores na ocasião do pedido de proteção das cultivares e nas condições experimentais desse trabalho. O número de estruturas a serem avaliadas e a maneira correta de obter as estimativas de características quantitativas também poderiam aumentar a taxa de validação dos descritores.

Uma maior taxa de validação poderia ser obtida se houvesse um manual ilustrado para aplicação dos descritores, características como a coloração predominante do perianto, coloração de polpa e diâmetro da corona seriam mais facilmente avaliadas com padrões de referência.

A inclusão do termo ‘predominante’ em descritores qualitativos que apresentam variações fenotípicas (coloração do ramo, forma do limbo foliar, posição dos nectários), inclusão dos termos mais usuais como ‘fimbrias’ nos descritores relacionados à corona,

‘comprimento’ no descritor diâmetro longitudinal e ‘largura’ no diâmetro transversal facilitariam as avaliações por diferentes avaliadores e padronizaria com avaliações de outros trabalhos. A inclusão de mais classes em alguns descritores quantitativos (comprimento do limbo foliar, largura máxima do limbo foliar, diâmetro da corona, diâmetro longitudinal e transversal do fruto) e descritores qualitativos (divisão do limbo foliar, coloração predominante no perianto, coloração da casca do fruto e coloração da polpa), e a inclusão de alguns descritores (diâmetro da flor, comprimento do androginóforo e antocianina no androginóforo, filete e estilete) poderiam proporcionar uma melhor diferenciação entre as cultivares.

Considerando que a lista de descritores utilizada no trabalho foi específica para espécies silvestres e híbridos interespecíficos de *Passiflora*, seria interessante a adoção de descritores que possam auxiliar a utilização de características para programas de melhoramento genético como comprimento do androginóforo, que facilita a polinização natural (JUNQUEIRA et al., 2005). A exclusão do descritor lenticelas distribuídas em padrão de estria também auxiliaria na maior taxa de validação, pois esse descritor gera dúvidas no momento de avaliação, podendo ocorrer equívocos. Também sugere-se a exclusão do número de sementes e a fusão dos caracteres “bandeamentos nos filamentos da corona” (ausência e presença) e “número de anéis coloridos” (um e mais de um), para evitar a ausência dessa segunda característica no momento do preenchimento do formulário como ocorreu na Tabela 1 (descritor número 22), quando há ausência de bandeamento nos filamentos mais longos da corona (descritor número 21).

**Tabela 5.** Características (descritores) da cultivar BRS Estrela do Cerrado (EC), BRS Rubiflora (RB), BRS Roseflora (RS), BRS Céu do Cerrado (CC), BRS Rosea Púrpura (RP) e BRS Pérola do Cerrado (PC). Embrapa Cerrados/UnB, Brasília, DF, 2017.

DESCRITOR <sup>1</sup>	E C *	E C	R B *	R B	R S *	R S	C C *	C C	R P *	R P	P C *	P C
1	2	2	1	2	1	1	3	3	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	6	6	6	6	6	6
3	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3
4	5	5	5	5	7	5	5	5	5	5	5	5
5	3	3	3	3	5	3	5	5	5	5	5	5
6	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
7	-	-	-	-	-	-	5	5	5	5	5	5
8	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1
9	1	2	1	2	1	2	1	1	2	2	2	2
10	7	5	5	3	7	5	5	3	5	5	7	7
11	3	3	3	3	3	3	1	1	2	2	4	4
12	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	3	3
13	3	3	4	3	2	3	1	1	2	2	1	1
14	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	3	3
15	7	7	7	7	7	5	3	3	5	5	5	5
16	5	5	5	5	7	7	5	5	5	5	5	5
17	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	3
18	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
19	5	5	3	3	3	3	5	5	5	5	3	3
20	1	1	1	1	1	1	6	6	2	2	1	1
21	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1
22	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	-	-
23	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1
24	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1
25	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	5	5
26	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	3	3
27	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1
28	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1
29	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	5
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5
<b>% Validação</b>	<b>90%</b>		<b>81%</b>		<b>71%</b>		<b>96%</b>		<b>100%</b>		<b>97%</b>	

<sup>1</sup>Descritores 1 a 33 e respectivos códigos de classes fenotípicas – ver Tabela 1; \*descritores obtidos na ocasião da proteção - não apresenta a característica

### 4.3.2 Caracterização molecular

A caracterização das seis matrizes de maracujazeiro ornamental por meio de marcadores moleculares gerou 117 marcadores RAPD e 125 marcadores ISSR (Tabela 6), obtendo-se a média de 11,7 e 17,9 marcadores por *primer*, respectivamente. Do total de marcadores, 82% foram polimórficos em RAPD e 91,2% foram polimórficos em ISSR, o que evidencia alta variabilidade genética entre as seis cultivares. Elevado polimorfismo, indicando a alta variabilidade genética do gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD, já foi relatado por Bellon et al. (2009; 2014), Cerqueira-Silva et al. (2012), Viana et al. (2010) e Castro et al. (2011) e por meio de marcadores ISSR foi verificado por Sousa et al. (2015), Costa et al. (2012) e Santos et al. (2011b).

**Tabela 6.** Iniciadores utilizados para obtenção dos marcadores RAPD e ISSR para as seis cultivares de maracujazeiro ornamental e respectivos números de bandas polimórficas e monomórficas. Embrapa Cerrados/UnB, Brasília, DF, 2017.

Iniciador	Sequência 5'→3'	Nº de bandas Polimórficas	Nº de bandas Monomórficas
RAPD OPD-07	TTGGCACGGG	6	0
RAPD OPD-10	GGTCTACACC	12	1
RAPD OPE-16	GGTGACTIONGTG	8	3
RAPD OPE-18	GGACTIONGCAGA	14	4
RAPD OPF-17	AACCCGGGAA	11	3
RAPD OPG-01	CTACGGAGGA	4	3
RAPD OPG-05	CTGAGACGGA	11	2
RAPD OPG-08	GGCTCATGTG	11	2
RAPD OPG-17	ACGACCGACA	9	1
RAPD OPH-04	GGAAGTGCCC	10	2
Total		96	21
ISSR-5	AGCAGCAGCAGCAGC	15	1
ISSR-6	AGGAGGAGGAGGAGG	20	0
ISSR-7	CAGCAGCAGCAGCAG	15	3
ISSR-8	CGAGAGAGAGAGAGAGA	15	1
ISSR-13	GAGAGAGAGAGAGAGAC	10	2
ISSR-14	CYGAGAGAGAGAGAGAGA	20	1
ISSR-15	CYGTGTGTGTGTGTGTGT	19	3
Total		114	11

As distâncias genéticas entre as seis cultivares de maracujazeiro ornamental variaram entre 0,128 e 0,614 nos marcadores RAPD e de 0,19 e 0,75 para marcadores ISSR (Tabela 7).

A menor distância genética (0,128) foi verificada entre as cultivares BRS Roseflora e BRS Estrela do Cerrado utilizando RAPD e entre cultivares BRS Rubiflora e BRS Roseflora (0,19) para ISSR. A maior distância foi observada entre as cultivares BRS CC e BRS PC (0,614 e 0,75 para RAPD e ISSR, respectivamente), por terem genealogias completamente diferentes.

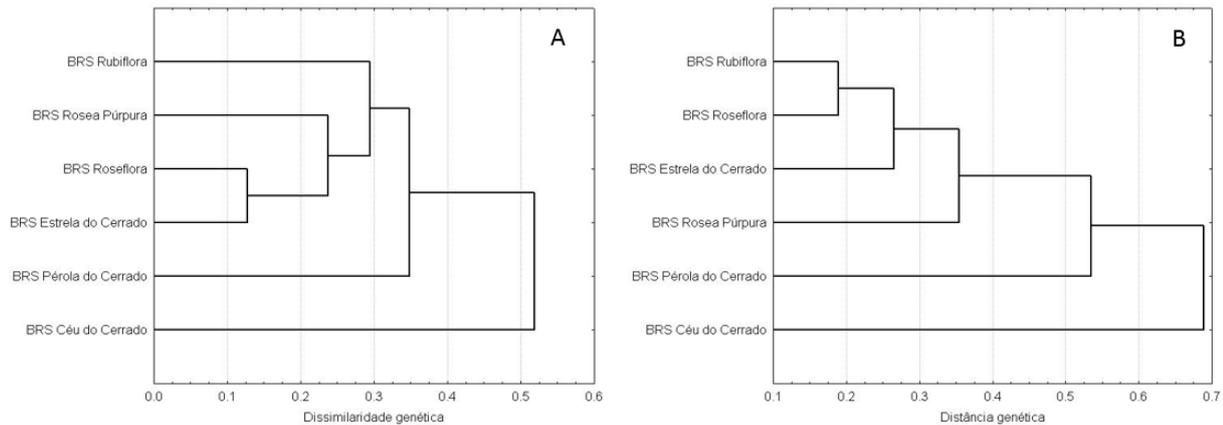
**Tabela 7.** Matriz de dissimilaridade genética entre seis matrizes de maracujazeiro ornamental (1: BRS Rubiflora, 2: BRS RP, 3: BRS Roseflora, 4: BRS CC, 5: BRS Estrela do Cerrado e 6: BRS PC), calculada com base no complemento do coeficiente de Nei e Li, utilizando 117 marcadores RAPD (abaixo da diagonal) e utilizando 125 marcadores ISSR (acima da diagonal). Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

Nº	1	2	3	4	5	6
1	0	0,374	0,190	0,642	0,304	0,613
2	0,353	0	0,328	0,685	0,362	0,558
3	0,235	0,232	0	0,694	0,227	0,567
4	0,475	0,541	0,492	0	0,673	0,750
5	0,296	0,244	0,128	0,474	0	0,402
6	0,426	0,378	0,298	0,614	0,291	0

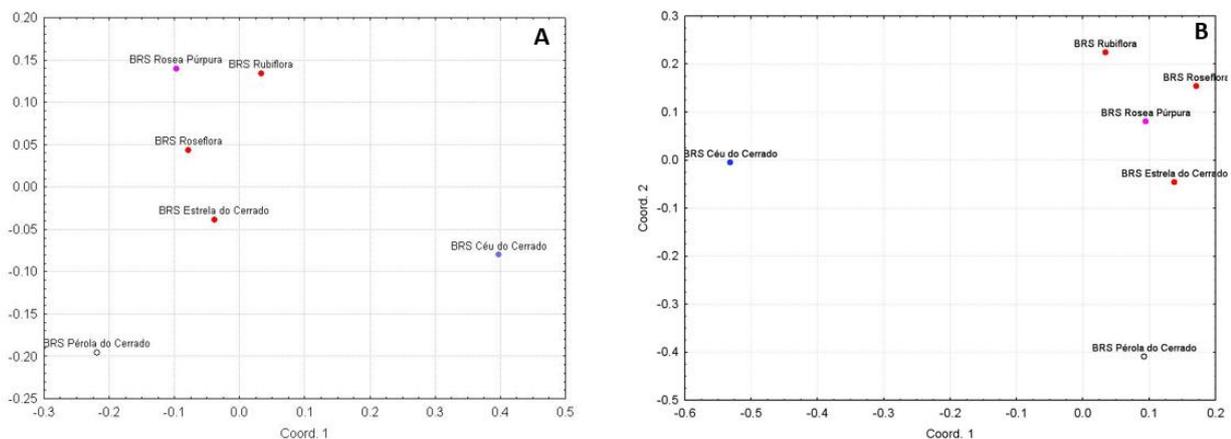
As menores distâncias genéticas implicaram numa tendência de agrupamento (Figuras 4 e 5) entre as três cultivares com a mesma base genética em sua genealogia, assim como ocorreu na caracterização morfoagronômica. Entretanto, verificou-se uma tendência de agrupamento delas com a cultivar BRS RP. A dissimilaridade genética entre as cultivares BRS CC e BRS PC obtida com base nos dois marcadores moleculares é respaldada pela origem genética dessas duas cultivares. A cultivar BRS PC foi obtida a partir do melhoramento genético da espécie *P. setacea*, e das seis cultivares em estudo, o híbrido BRS CC (*Passiflora edulis* X *P. incarnata*) é o único que não tem a espécie *P. setacea* em sua genealogia.

Nas análises moleculares é possível observar que há uma menor distância genética entre a cultivar BRS RP e as cultivares de flores vermelhas, quando comparada às distâncias genéticas obtidas entre estas cultivares com base nos descritores categóricos e nos descritores quantitativos. Esta menor distância com base nos marcadores moleculares é respaldada pela presença da espécie *P. setacea* na genealogia de todas estas cultivares. No caso dos descritores categóricos e quantitativos, nota-se diferenças significativas entre essas cultivares. Nos descritores morfoagronômicos, a morfologia da folha da BRS RP se aproxima mais das cultivares BRS CC e BRS PC (Tabela 1). Nos descritores quantitativos, o comprimento do pecíolo e largura da sépala da BRS RP são iguais estatisticamente aos apresentados pela cultivar BRS CC (Tabela 3).

O coeficiente de correlação cofenético ( $r$ ) foi alto para os marcadores RAPD (0,94) e ISSR (0,96), evidenciando consistência no ajuste entre a matriz de similaridade genética e sua representação gráfica.



**Figura 4.** Análise de agrupamento de seis cultivares de maracujazeiro ornamental com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 117 marcadores RAPD (A) e 125 marcadores ISSR (B). O método UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.



**Figura 5.** Dispersão gráfica de seis cultivares de maracujazeiro ornamental com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 117 marcadores RAPD (A) e 125 marcadores ISSR (B).

De um modo geral, houve uma coerência entre as distâncias genéticas e análises de agrupamento e dispersão gráfica das seis cultivares de maracujazeiro ornamental com base nos descritores morfoagronômicos categóricos e nos marcadores RAPD e ISSR. Esta coerência é explicada pela correlação alta e significativa entre as distâncias calculadas com base nestes diferentes grupos de características (Tabela 8). A maior correlação (0,92) foi obtida entre as

distâncias genéticas calculadas com base nos dois marcadores moleculares do DNA.

**Tabela 8.** Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson entre as distâncias genéticas calculadas com base nos 33 descritores morfoagronômicos categóricos, oito descritores morfoagronômicos quantitativos, marcadores RAPD e ISSR. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

VARIÁVEIS	33 Descritores	Descritores Quantitativos	RAPD	ISSR
33 Descritores	-	0,78**	0,55*	0,66**
Descritores Quantitativos		-	0,15 <sup>ns</sup>	0,36 <sup>ns</sup>
RAPD			-	0,92**
ISSR				-

\*\* , \* : Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t

A correlação não foi significativa entre as distâncias genéticas calculadas com base nos descritores quantitativos e nos marcadores moleculares, demonstrando que nem sempre as características morfoagronômicas quantitativas representam fielmente a distância genética real, obtida pela caracterização molecular baseada no DNA. Quando pensamos na caracterização de recursos genéticos ou cultivares, podemos dizer que as análises com base nos descritores morfoagronômicos qualitativos e quantitativos e com base nos marcadores moleculares apresentam funções complementares.

A utilização da lista de descritores mínimos recomendada pelo SNPC, composta por caracteres morfoagronômicos, é uma maneira de comprovar a distinguibilidade da nova cultivar em relação à outras protegidas e marcadores moleculares do DNA, como o RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) e o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), apesar de não serem uma metodologia oficial para proteção de cultivares, têm se mostrado eficientes na caracterização e na quantificação da variabilidade genética de várias espécies de plantas, motivo pelo qual vêm sendo utilizados como ferramenta auxiliar (FALEIRO, 2011; BRASIL, 2016).

#### 4.4 CONCLUSÕES

Descritores morfoagronômicos categóricos, quantitativos e marcadores moleculares RAPD e ISSR foram úteis e permitiram uma adequada e complementar caracterização das cultivares de maracujazeiro ornamental BRS Rubiflora, BRS RP, BRS CC, BRS Roseflora, BRS Estrela do Cerrado e BRS PC.

Foi possível a diferenciação das cultivares de maracujazeiro ornamental com base em pelo menos cinco descritores categóricos e houve uma tendência de agrupamento das cultivares que apresentam a com a mesma base genética em sua genealogia.

A validação dos descritores utilizados no processo de proteção de cultivares de Passifloras evidenciaram a necessidade de ajustes para aumentar sua eficiência na diferenciação precisa e acurada das cultivares de maracujazeiro ornamental.

#### 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, P.P.; SOUSA, M.M.; SANTOS, E.A.; PIRES M.V.; PIRES M.M.; ALMEIDA A.A.F. Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brasil, **Euphytica**, 166: 307–315, 2009.

ARAÚJO, F.P.; SILVA, N.; QUEIROZ, M.A. Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* Mast com base em descritores morfoagronômicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 3, p. 723-730, 2008.

BELLON, G.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; FUHRMANN, E. Variabilidade genética de genótipos elite de maracujazeiro, obtidos em programas de retrocruzamento envolvendo espécies silvestres e comerciais com base em marcadores RAPD. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 6, p. 1692-1697, 2014.

BELLON, G.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, K.P.; JUNQUEIRA, N.T.V.; FONSECA, K.G.; BRAGA, M.F. Variabilidade genética de acessos obtidos de populações cultivadas e silvestres de maracujazeiro-doce com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal-SP, v.31, n.1, p. 197-202. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Formulário 3 - Espécies em regime de proteção: instruções de DHE e tabela de Descritores Mínimos**. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/protecaocultivares/formularios-protecao-cultivares/MARACUJA\\_OUTRAS\\_SPP\\_FORMULARIO\\_16DEZ2008\\_P.doc](http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/protecaocultivares/formularios-protecao-cultivares/MARACUJA_OUTRAS_SPP_FORMULARIO_16DEZ2008_P.doc)>. Acesso em: 29 dez. 2016.

CASTRO, A.P.G.; FALEIRO, F.G.; CARVALHO, D.D.C.; FONSECA, K.G.; VILELA, M.F.; JUNQUEIRA, N.T.V.; CARES, J.E. Genetic variability of *Passiflora* spp. from commercial fields in the Federal District, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.6, p.996-1002, jun, 2011.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; JESUS, O.N.; SANTOS, E.S.L.; CORRÊA, R.X.; SOUZA, A.P. Genetic Breeding and Diversity of the Genus *Passiflora*: Progress and Perspectives in Molecular and Genetic Studies. **International Journal of Molecular Sciences** 15: 14122-14152; 2014.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; SANTOS, E.S.L.; CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S. CARDOSO-SILVA, C.B.; PEREIRA, A.S.; OLIVEIRA, A.C.; CORRÊA, R.X. Genetic variation in a wild population of the ‘sleep’ passion fruit (*Passiflora setacea*) based on molecular markers. **Genetics and Molecular Research** 11 (1): 731-738, 2012.

COSTA, J.N; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, G.A.F.; OLIVEIRA, E.J. Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 12: 253-260, 2012.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao**

**melhoramento genético.** 3. ed. Viçosa: UFV, 2004. 480p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **BRS Estrela do Cerrado: Primeiro híbrido de maracujazeiro ornamental do Brasil.** Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/publico/usuarios/uploads/lancamentoornamentais/BRS%20Estrela%20do%20Cerrado.pdf>>. Acesso em: 27 de dez. 2016a.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **BRS Pérola do Cerrado: Cultivar de maracujazeiro silvestre com quádrupla aptidão: consumo in natura, processamento industrial, ornamental e funcional.** Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/publico/usuarios/uploads/lancamentoperola/foldertecnico.pdf>>. Acesso em: 05 jan. 2015.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **BRS Roseflora: Híbrido de passiflora para uso como planta ornamental.** Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/publico/usuarios/uploads/lancamentoornamentais/BRS%20Roseflora.pdf>>. Acesso em: 27 dez. 2016c.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **BRS Rubiflora: Híbrido de passiflora para ornamentação de muros e pérgulas.** Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/publico/usuarios/uploads/lancamentoornamentais/BRS%20Rubiflora.pdf>>. Acesso em: 27 dez. 2016b.

FALEIRO, F.G. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento vegetal. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M (Ed.). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011, p.55-118.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R.; BORGES, R. S.; ARAÚJO, S. B.; ANDRADE, S. R. M.; COSTA, A. M.; CASTELLEN, M. S.; VAZ, A. P. A.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; ANDRADE, G. A. BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora, BRS Roseflora: híbridos de maracujazeiro para uso como plantas ornamentais. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q. (Ed.). **Livros e cultivares apresentados no II Encontro da Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas – Regional DF.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. p. 44-45.

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. 6p. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 92).

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA - IBRAFLOR. **Mercado Interno 12.2014.** Holambra, SP: IBRAFLOR, 2015. Disponível em: <[http://www.ibraflor.com/ns\\_mer\\_interno.php](http://www.ibraflor.com/ns_mer_interno.php)>. Acesso em: 28 de dezembro de 2016.

JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J.; FALEIRO, F.G. SOARES, T.L.; GIRARDI, E.A. **Descritores morfoagronômicos ilustrados para *Passiflora* spp.** Brasília, DF: Embrapa, 2016. 122p.

JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J.; SOARES, T.L.; FALEIRO, F.G. **Aplicação de descritores morfoagronômicos utilizados em ensaios de DHE de cultivares de maracujazeiro-doce,**

**ornamental, medicinal (*Passiflora* spp.) incluindo espécies silvestres e híbridos interespecíficos: manual prático.** Brasília, DF: Embrapa, 2015. 45p.

JUNQUEIRA, K.P.; JUNQUEIRA, N.T.V. **Espécies nativas do Cerrado com potencial ornamental.** In: Simpósio Internacional de Paisagismo, 3, Lavras, MG. Palestras. Lavras: UFLA. 2006. p.49-54.

JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. Uso de espécies silvestres de *Passiflora* no pré-melhoramento do maracujá. In: Curso Internacional de Pré-Melhoramento de Plantas: **Anais/Org.** LOPES, M.A.; FÁVERO, A.P.; FERREIRA, M.A.J.F.; FALEIRO, F.G. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p.133-137. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / Documentos n 185).

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. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2005. p. 81-108.

MACHADO, C.F.; JESUS, F.N.; LEDO, C.A.S. Divergência genética de acessos de maracujá utilizando descritores quantitativos e qualitativos. **Revista Brasileira de Fruticultura.** Jaboticabal-SP, v.37, n.2, p.442-449, 2015.

NEVES, M.F.; ALVES PINTO, M.J. **Mapeamento e quantificação da cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais do Brasil.** São Paulo: OCESP, 2015. 122p.

PAIVA, C.L.; PIO VIANA, A.; SANTOS, E.A., SILVA, R.N.O.; OLIVEIRA, E.J. Diversidade genética de espécies do gênero *Passiflora* com o uso da estratégia WARD-MLM. **Revista Brasileira de Fruticultura,** Jaboticabal - SP, v.36, n. 2, p. 381 - 390, 2014.

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

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system,** version 2.1. New York: Exeter Software, 2000. 98 p.

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

SANTOS, E.A.; SOUZA, M.M.; VIANA, A.P.; ALMEIDA, A.A.F.; FREITAS, J.C.O.; LAWINSCKY, P.R. Multivariate analysis of morphological characteristics of two species of passion flower with ornamental potential and of hybrids between them. **Genetics and Molecular Research** 10 (4): 2457-2471, 2011a.

SANTOS, E.A.; VIANA, A.P.; FREITAS, J.C.O.; SOUZA, M.M.; PAIVA, C.L.; RODRIGUES, D.L.; TAVARES, R.F. Phenotyping of *Passiflora edulis*, *P. setacea*, and their hybrids by a multivariate approach. **Genetics and Molecular Research** 13 (4): 9828-9845, 2014.

SANTOS, L.F.; OLIVEIRA, E.J.; SILVA, A.S.; CARVALHO, F.M.; COSTA, J.L.; PÁDUA, J.G. ISSR Markers as a Tool for the Assessment of Genetic Diversity in *Passiflora*. **Biochem Genet** 49: 540-554, 2011b.

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

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, New Delhi, v. 41, n. 2, p. 237-245, 1981.

SOUSA, A.G.R.; SOUZA, M.M.; MELO, C.A.F.; SODRÉ, G.A. ISSR markers in wild species of *Passiflora* L. (Passifloraceae) as a tool for taxon selection in ornamental breeding. **Genetics and Molecular Research** 14 (4): 18534-18545. 2015.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S. Passiflora como plantas ornamentais. In: Congresso brasileiro de floricultura e plantas ornamentais e congresso brasileiro de cultura de tecidos de plantas, 15, 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. p 24.

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

VIANA, A.J.C.; SOUZA, M.M.; ARAÚJO, I.S.; CORRÊA, R.X. ; AHNERT, D. Genetic diversity in *Passiflora* species determined by morphological and molecular characteristics. **Biologia Plantarum** 54 (3): 535-538, 2010.

**UTILIZAÇÃO DE DESCRITORES MORFOAGRONÔMICOS E MARCADORES  
RAPD PARA GARANTIR A QUALIDADE DE MATRIZES DE MARACUJAZEIRO  
AZEDO**

**USE OF MORPHOAGRONOMIC DESCRIPTORS AND RAPD MARKERS TO  
ENSURE THE QUALITY OF SOUR PASSION FRUIT MOTHER PLANT**

## RESUMO

Nesse trabalho, objetivou-se caracterizar cinco matrizes (CPMSC1, CPGA1, CPMGA2, BRSMR1, CPACMJM08) de maracujazeiro azedo, utilizadas na produção de sementes híbridas, por meio 25 descritores morfoagronômicos aplicados nos processos de proteção de cultivares de *Passiflora edulis* Sims e marcadores moleculares RAPD, para garantir a qualidade das matrizes. Para a caracterização morfoagronômica, foram avaliadas 24 estruturas (ramo, folhas, flores e frutos) de pelo menos 12 plantas para cada matriz e cada descritor. Utilizou-se uma lista com 25 descritores morfoagronômicos e adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições de seis estruturas cada. Para os descritores morfoagronômicos categóricos foram realizadas análises de distribuição de frequência e análise multivariada, a partir da qual se estimou as distâncias genéticas entre as matrizes, utilizando-se o índice de coincidência simples. Para os 15 descritores quantitativos, foram realizadas análises de variância e teste de comparação de médias. Foi também estimada a porcentagem de validação dos descritores das matrizes. O DNA genômico das cinco matrizes foi extraído e amplificado via Reação em Cadeia da Polimerase, utilizando-se quatro *primers* decâmeros. Os descritores morfoagronômicos não foram eficientes para a diferenciação das cinco matrizes e a taxa de validação foi baixa devido à incidência de virose nas plantas avaliadas. Com base nos marcadores moleculares, foram obtidos 75 marcadores RAPD e os coeficientes de dissimilaridade genética entre as plantas dentro dos grupos foram próximos de zero. Foi confirmada uma mistura genética envolvendo plantas das matrizes CPMGA2 e BRSMR1 com base em marcadores RAPD.

**Palavras-chave:** *Passiflora edulis* Sims, caracterização, multivariada, marcadores moleculares.

## ABSTRACT

The purpose of this work was to characterize five mother plant of passion fruit (CPMSC1, CPGA1, CPMGA2, BRSMR1, CPACMJM08) used in the production of hybrid seeds by using 25 morphoagronomic descriptors applied in the protection processes of *Passiflora edulis* Sims varieties and RAPD molecular markers to ensure the quality of the passion fruit mother plants. For the morphoagronomic characterization, 24 plant structures (branch, leaves, flowers and fruits) at least 12 plants were evaluated for each mother plant and each descriptor. A list of 25 morphoagronomic descriptors was used and a completely randomized experimental design was utilized with five treatments and four replicates that included six structures each. For the categorical morphoagronomic descriptors, frequency distribution and multivariate analysis were performed from which the genetic distances between the mother plants were estimated using the simple coincidence index. For the 15 quantitative descriptors, variance analysis and comparison of means were performed. The validation percentage of the matrices was also estimated. The genomic DNA of five mother plants were extracted and amplified via Polymerase Chain Reaction, using four decamer primers. The morphoagronomic descriptors were not efficient for the differentiation of five mother plants and the validation rate was low due to the incidence of virus in the evaluated plants. Based on molecular markers, 75 RAPD markers were obtained and the coefficients of genetic dissimilarity among the plants within the groups were close to zero. A genetic mix involving plants of CPMGA2 and BRSMR1 was confirmed using RAPD markers.

**Keywords:** *Passiflora edulis* Sims, characterization, multivariate, molecular markers.

## 5.1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como maior produtor e consumidor mundial de maracujá e, atualmente, apresenta uma produção de 823.284 toneladas (ABF, 2016). Pelas suas propriedades medicinais foi considerado uma fruta de pomar doméstico, entretanto, o suco é o produto mais consumido e que tem alavancado a expressão comercial do maracujá (MELETTI, 2011).

No Brasil, o melhoramento desta cultura está diretamente associado ao fruto, visando ao aumento da produtividade, qualidade do fruto e resistência a doenças (VIANA et al., 2005; MELETTI, 2011). Alguns híbridos lançados pela Embrapa e parceiros (BRS Gigante amarelo - BRS GA1, BRS Sol do Cerrado - BRS SC1 e BRS Rubi do Cerrado - BRS RC) apresentam essas características e tem sido utilizados em vários pomares comerciais (EMBRAPA, 2017a, 2017b, 2017c).

As sementes desses híbridos apresentam garantia de origem e identidade (“conjunto de caracteres genotípicos e fenotípicos da cultivar que a diferencia de outras”), exigida pela Lei de Sementes e Mudas, Lei brasileira 10.711, de 5 de agosto de 2003 (BRASIL, 2016), por serem obtidas por meio de cruzamentos controlados, protegidos de contaminação por pólen externo (MELETTI, 2011). No caso dos híbridos BRS Gigante Amarelo (BRS GA1), BRS Sol do Cerrado (BRS SC1), BRS Ouro Vermelho (BRS OV1) e BRS Rubi do Cerrado (BRS RC), as sementes são produzidas por meio do cruzamento entre plantas matrizes multiplicadas por propagação vegetativa.

De acordo com a Lei de Sementes (BRASIL, 2003), o registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é condição para comercialização de sementes e mudas de uma cultivar, qualquer que seja a espécie e a inserção no Registro Nacional de Cultivares (RNC) é muito importante para toda cadeia produtiva (MELETTI et al., 2005). Além do registro, cultivares e matrizes de maracujazeiro azedo podem ser protegidas no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) desde 2008, quando foi publicada a primeira lista de descritores e as orientações para realização dos ensaios de distinguibilidade, estabilidade e homogeneidade (DHE).

A caracterização das cultivares e matrizes de maracujazeiro azedo pode ser realizada por meio de descritores morfoagronômicos, características agronômicas e marcadores moleculares (FERREIRA, 2008). Os marcadores moleculares, apesar de não serem uma metodologia oficial para proteção de cultivares, têm se mostrado eficientes na caracterização e

na quantificação da variabilidade genética de várias espécies de plantas, motivo pelo qual vêm sendo utilizados como ferramenta auxiliar (FALEIRO, 2011; AVIANI; SANTOS, 2011). Neste trabalho, objetivou-se realizar a caracterização morfoagronômica e molecular de matrizes de maracujazeiro-azedo utilizadas na produção de sementes híbridas.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Caracterização morfoagronômica

Foram caracterizadas cinco matrizes de maracujazeiro azedo (Tabela 1) conforme as instruções para ensaios de DHE (distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade), em que consta uma lista com 25 descritores morfoagronômicos (publicada em 2008) propostos pelo Serviço Nacional de Proteção de cultivares (SNPC-MAPA) para *Passiflora edulis* Sims (ANEXO A) (BRASIL, 2017).

**Tabela 1.** Matrizes utilizadas na produção de sementes dos híbridos de maracujazeiro azedo BRS Gigante Amarelo (BRS GA1), BRS Sol do Cerrado (BRS SC1) e BRS Rubi do Cerrado (BRS RC). Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

Nº	MATRIZ	CÓDIGO	DESCRIÇÃO
1	MSC	CPMSC1	Genitor feminino do híbrido BRS Gigante Amarelo (BRS GA1)
2	GA	CPGA1	Genitor masculino do híbrido BRS Gigante Amarelo (BRS GA1)
3	GA2	CPMGA2	Genitor feminino do híbrido BRS Sol do Cerrado (BRS SC1)
4	MA	BRSMR1	Genitor masculino do híbrido BRS Sol do Cerrado (BRS SC1)
5	Matriz Rubi	CPACMJM08	Genitor feminino do híbrido BRS Rubi do Cerrado (BRS RC)

Dos 25 descritores morfoagronômicos, dez são classificados como qualitativos/pseudoqualitativos e 15 quantitativos. Seis estão relacionados ao ramo, limbo foliar e pecíolo, oito são referentes às flores e 11 são características dos frutos.

Os descritores qualitativos e pseudoqualitativos avaliados foram: coloração do ramo, profundidade do sinus, posição dos nectários, bandeamento nos filamentos da corona, coloração dos anéis (exceto brancos) da corona, filamentos da corona, forma do fruto, coloração da casca do fruto, lenticelas e coloração da polpa.

As características quantitativas avaliadas para as cinco matrizes foram: comprimento do limbo foliar (LFC), largura do limbo foliar (LFLM), comprimento do pecíolo (PC), comprimento da bráctea (FLCB), comprimento da sépala (FLCS), largura da sépala (FLLS),

diâmetro da corona (FLDEC), largura dos anéis coloridos nos filamentos da corona (FLLAFC), diâmetro longitudinal do fruto (FRDL), diâmetro transversal do fruto (FRDT), relação diâmetro longitudinal/diâmetro transversal (FRRDLT), massa média do fruto (FRMM), espessura da casca do fruto (FREC), teor de sólidos solúveis totais (FRSS) e número de sementes por fruto maduro (FRNS).

Os ramos, folhas, flores e frutos das matrizes de maracujazeiro azedo foram avaliados em dois parceiros licenciados pela Embrapa para produção de sementes, ambos localizados em Planaltina-DF. A avaliação começou em um viveiro em 2014, entretanto, devido à problemas fitossanitários (virose) e à indisponibilidade de flores nas matrizes CPMSC1, CPMGA2 e BRSMR1 e de frutos na matriz CPMGA2, as avaliações prosseguiram em um segundo produtor em 2015 e 2016.

Para análise das características qualitativas e pseudoqualitativas, foram atribuídos os códigos sequenciais numéricos de acordo com a classe fenotípica dos descritores para *Passiflora edulis* Sims (BRASIL, 2017) e a mensuração das características quantitativas foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital, refratômetro digital e balança de precisão e, posteriormente, foram também atribuídos códigos sequenciais numéricos de acordo com a classe fenotípica dos descritores para *Passiflora edulis* Sims (ANEXO A) (BRASIL, 2017). As análises dos frutos foram conduzidas no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Embrapa Cerrados. Para a característica espessura de casca, os frutos foram cortados ao meio (transversalmente) e foram realizadas três medições em diferentes posições do fruto, utilizando-se a média delas para definição da classe fenotípica e respectivo código numérico. Para cada cultivar e descritor, foram realizadas 24 medições/classificações de estruturas (ramos, folhas, flores e frutos) de pelo menos 12 plantas.

Para os 25 descritores morfoagronômicos (qualitativos/pseudoqualitativos e quantitativos) categóricos foram realizadas análises de distribuição de frequência e análise multivariada, a qual foi utilizada para estimar a distância genética entre as matrizes utilizando análise de correspondência simples, com o auxílio do Programa Genes (CRUZ, 2013). A partir da matriz de distância genética, foi realizada a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS (SAS INSTITUTE INC.,1989).

Foi estimada a % de validação dos descritores obtidos com base na % da coincidência desses descritores com os descritores obtidos na ocasião do pedido de proteção de cada matriz. Para definição da classe fenotípica de cada descritor para cada cultivar, utilizou-se como

referência a maior frequência baseada nas 24 estruturas. No caso de empate, foi utilizado como critério o código obtido na ocasião do pedido de proteção das cultivares.

Para a análise multivariada dos 25 descritores (qualitativos/pseudoqualitativos e quantitativos) categóricos e análise dos dados dos 15 descritores quantitativos, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (CPMSC1, CPGA1, CPMGA2, BRSMR1, CPACMJM08) e quatro repetições, sendo cada repetição a média de seis medidas/classificações de estruturas (ramos, folhas, flores e frutos).

Para os 15 descritores morfoagronômicos quantitativos foram realizadas análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 1% de significância.

### 5.2.2 Caracterização molecular

A caracterização molecular das cinco matrizes foi realizada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados, Planaltina-DF.

Folhas em estágio intermediário de maturação das mudas de cada matriz foram coletadas no primeiro viveiro e o DNA genômico foi extraído utilizando o método do CTAB, com modificações (FALEIRO et al., 2003). As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13  $\mu$ L, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 100  $\mu$ M de cada um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4  $\mu$ M de um primer (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Foram utilizados quatro *primers* decâmeros (OPD-04, OPH-04, OPH-12 e OPH-16) para obtenção dos marcadores RAPD.

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

Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a

partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre as matrizes de maracujazeiro-azedo, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, utilizando-se o Programa Genes (CRUZ, 2013).

A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando-se 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 (STATSOFT Inc, 1999).

### **5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.3.1 Caracterização morfoagronômica**

Foram obtidos os 25 descritores morfoagronômicos para as matrizes CPMSC1, CPMGA2 e CPACMJM08, genitoras femininas dos híbridos BRS GA1, BRS SC1 e BRS RC, respectivamente (Tabela 2). Para as matrizes CPGA1 e BRSMR1 foram obtidos apenas 14 descritores, correspondentes aos caracteres de folha e flor, pois por serem genitores masculinos dos híbridos BRS GA1 e BRS SC1, respectivamente e pelo fato dos cruzamentos serem controlados para a produção dos híbridos, não havia produção de frutos nessas matrizes.

Ainda em relação à Tabela 2, é possível observar que houve variações nas classes fenotípicas, de acordo com as 24 estruturas avaliadas (ramos, folhas, flores e frutos) em cada matriz, o que influenciou na diferenciação dos respectivos materiais estudados (Figuras 1 e 2). Variações de classes fenotípicas na mesma cultivar e na mesma planta são comuns para o maracujazeiro segundo Faleiro et al. (2005) e geralmente são resultantes das combinações dos componentes genéticos e ambientais, sendo que o segundo componente apresenta variações mais elevadas em características quantitativas (UPOV, 2008; SANTOS, 2011). Certamente, incidências de viroses nas plantas avaliadas influenciaram diretamente nessas variações.

A partir das avaliações realizadas e com base na maior frequência das classes fenotípicas (considerando as 24 estruturas analisadas) dos descritores qualitativos, as matrizes apresentaram ramos de coloração verde-arroxeadada, com exceção da matriz CPACMJM08, cuja coloração foi verde-escura; posição dos nectários adjacente ao limbo foliar; flores com anéis da corona de coloração roxa, ondulados e sem bandeamentos nos filamentos da corona; a forma do fruto e a coloração de polpa variaram entre as matrizes, apresentando diversas classes fenotípicas, sendo a forma elipsoide e coloração de polpa alaranjada escura as mais frequentes

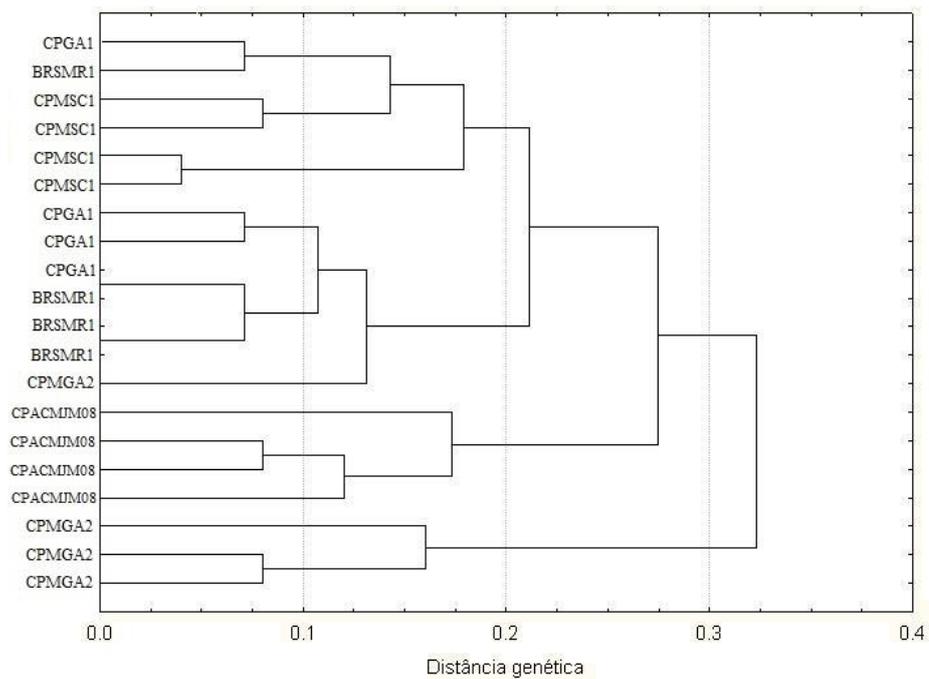
nas matrizes CPMSC1 e CPACMJM08 e fruto arredondado de coloração alaranjada mais frequente na matriz CPMGA2.

**Tabela 2.** Características (descritores) das matrizes de maracujazeiro azedo (CPMSC1, CPGA1, CPMGA2, BRSMR1 e CPACMJM08). Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

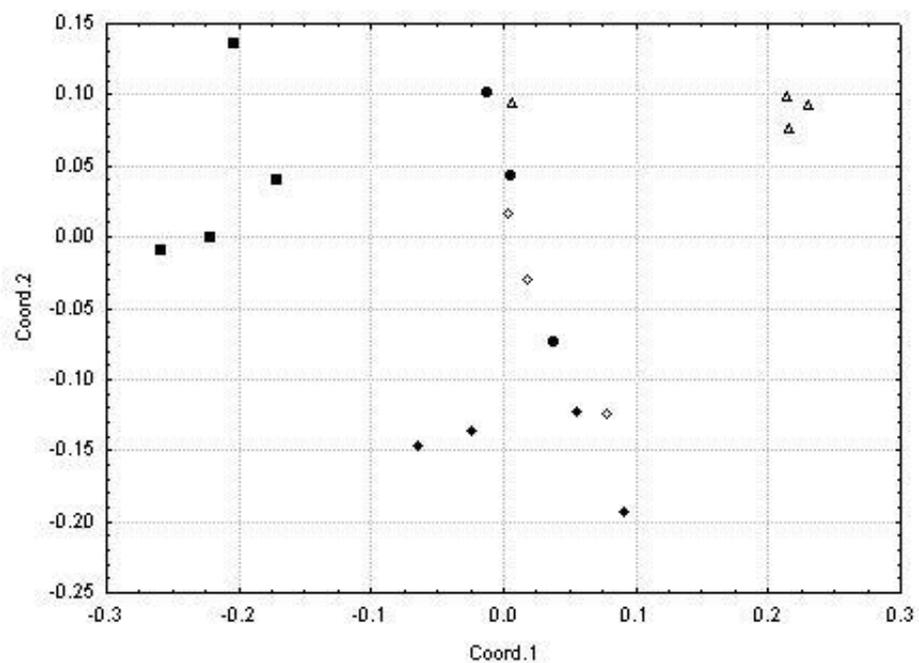
Característica	Identificação da característica	CPMSC1	CPGA1	CPMGA2	BRSMR1	CPACMJM08
1. Ramo: coloração	verde-clara (1);verde-escura (2);verde-arroxeadada (3);roxa (4)	2 (38%) 3 (63%)	2 (17%) 3 (83%)	2 (4%) 3 (96%)	2 (25%) 3 (75%)	1 (4%) 2 (67%) 3 (29%)
2. Limbo foliar: comprimento	curto<12cm (3); médio 12-15cm (5); longo>15cm (7)	3 (63%) 5 (38%)	3 (33%) 5 (67%)	3 (63%) 5 (33%) 7 (4%)	3 (33%) 5 (67%)	3 (54%) 5 (46%)
3. Limbo foliar: largura máxima	estreita< 12 cm (3); média 12-15 cm (5); larga> 15 cm (7)	3 (29%) 5 (50%) 7 (21%)	5 (38%) 7 (63%)	3 (8%) 5 (67%) 7 (25%)	3 (8%) 5 (54%) 7 (38%)	3 (13%) 5 (63%) 7 (25%)
4. Limbo foliar: profundidade do sinus	rasa(3); média (5); profunda (7)	7 (100%)	7 (100%)	7 (100%)	7 (100%)	7 (100%)
5. Pecíolo: comprimento	curto<3cm (3);médio 3-3,5cm (5); longo> 3,5cm (7)	3 (17%) 5 (42%) 7 (42%)	3 (8%) 5 (8%) 7 (83%)	3 (33%) 5 (8%) 7 (58%)	3 (4%) 5 (17%) 7 (79%)	5 (13%) 7 (88%)
6. Pecíolo: posição dos nectários	adjacente ao limbo foliar (1); distantes do limbo foliar (2)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
7. Flor: comprimento da bráctea	curto<2cm (3);médio 2-3cm (5); longo> 3cm (7)	5 (96%) 7 (4%)	3 (17%) 5 (67%) 7 (17%)	3 (4%) 5 (67%) 7 (29%)	5 (75%) 7 (25%)	3 (50%) 5 (50%)
8. Flor: comprimento da sépala	curto<3,5cm (3);médio 3,5-4cm (5); longo>4cm (7)	3 (4%) 5 (25%) 7 (71%)	5 (38%) 7 (63%)	5 (13%) 7 (88%)	5 (29%) 7 (71%)	7 (100%)
9. Flor: largura da sépala	estreita <1,5cm (3); média 1,5-2cm (5); larga >2cm (7)	3 (88%) 5 (13%)	3 (63%) 5 (38%)	3 (21%) 5 (79%)	3 (33%) 5 (67%)	3 (29%) 5 (71%)
10. Flor: diâmetro da coroa	pequeno<7cm (3); médio 7-8cm (5); grande>8cm (7)	5 (17%) 7 (83%)	5 (8%) 7 (92%)	7 (100%)	7 (100%)	5 (21%) 7 (79%)
11. Flor: bandeamento nos filamentos da coroa	ausente (1); presente (2)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
12. Flor: coloração dos anéis (exceto brancos) da coroa	rosa (1); roxa (2)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)
13. Flor: largura dos anéis coloridos nos filamentos da coroa	estreita<1cm (3); média 1-1,5cm (5); larga>1,5cm (7)	5 (13%) 7 (88%)	5 (29%) 7 (71%)	5 (92%) 7 (8%)	7 (100%)	5 (21%) 7 (79%)
14. Flor: filamentos da coroa	reto (1); ondulado (2)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)
15. Fruto: diâmetro longitudinal	pequeno<10cm (3); médio 10-13cm (5); grande>13cm (7)	3 (42%) 5 (58%)	-	3 (75%) 5 (25%)	-	3 (63%) 5 (38%)
16. Fruto: diâmetro transversal	pequeno<8cm (3); médio 8-10cm (5); grande>10cm (7)	3 (63%) 5 (38%)	-	3 (42%) 5 (58%)	-	3 (100%)
17. Fruto: relação diâmetro longitud/diâmetro transversal	muito pequena<0,9(1); pequena 0,9-1,2(3); média 1,2-1,5 (5); grande 1,5-1,8 (7); muito grande>1,8 (9)	3 (33%) 5 (67%)	-	3 (67%) 5 (33%)	-	3 (4%) 5 (92%) 7 (4%)
18. Fruto: forma	oval (1); oblonga (2); arredondada (3); oblata (4); elipsóide (5); oboval	1 (4%) 2 (4%)	-	2 (17%) 3 (38%)	-	1 (8%) 5 (88%)

	(6)	3 (21%) 5 (50%) 6 (21%)		5 (17%) 6 (29%)		6 (4%)
19. Fruto: coloração da casca	amarela (1); vermelha (2); roxa (3)	1 (100%)	-	1 (100%)	-	2 (100%)
20. Fruto: lenticelas	inconspícuas – não visíveis ou pouco visíveis (1); conspícuas - visíveis (2)	2 (100%)	-	1 (100%)	-	2 (100%)
21. Fruto: massa média (c/polinização manual)	baixo<150g (3); médio 150-250g (5); alto>250g (7)	3 (13%) 5 (50%) 7 (38%)	-	3 (13%) 5 (33%) 7 (54%)	-	3 (42%) 5 (58%)
22. Fruto: espessura da casca	fina <0,6cm (3); média >0,6-1cm (5); espessa >1,0cm (7)	3 (33%) 5 (67%)	-	3 (4%) 5 (83%) 7 (13%)	-	3 (63%) 5 (38%)
23. Fruto: coloração da polpa	amarelo-esverdeada (1); amarela (2); alaranjada (3); alaranjada-escura (4)	2 (4%) 3 (17%) 4 (79%)	-	3 (67%) 4 (33%)	-	2 (4%) 3 (13%) 4 (83%)
24. Fruto: teor de sólidos solúveis totais	baixo<10° Brix (3); médio 10-13° Brix (5); alto>13° Brix (7)	3 (42%) 5 (58%)	-	3 (17%) 5 (33%) 7 (50%)	-	3 (13%) 5 (67%) 7 (21%)
25. Fruto: número de sementes por fruto maduro (c/ com polinização natural)	pequeno<200 (3); médio 200-400 (5); grande >400 (7)	3 (8%) 5 (58%) 7 (33%)	-	3 (13%) 5 (54%) 7 (33%)	-	3 (46%) 5 (54%)

Observou-se pela análise de agrupamento (Figura 1) e dispersão gráfica (Figura 2) uma inconsistência no agrupamento das matrizes, onde algumas repetições (que foi baseada na média de seis estruturas) das matrizes apresentaram menor dissimilaridade genética com repetições de outras matrizes. Os descritores morfoagronômicos foram capazes de diferenciar apenas as matrizes CPACMJM08 e CPMSC1, com suas respectivas repetições. Uma repetição da matriz CPGA1 e uma de BSMR1 se aproxima das repetições da matriz CPMSC1, e uma repetição da matriz CPMGA2 se distancia das demais repetições e se aproxima de repetições da matriz BRSMR1. Isso ocorreu porque houve variações nas classes fenotípicas e pelo fato dessas características terem sido muito semelhantes entre as matrizes. Um exemplo disso, pode ser verificado na característica ‘comprimento do limbo foliar’ (Tabela 2), que apresentou variações entre as classes (curto e médio) com frequências parecidas para ambas, portanto, há repetições dentro de cada matriz com comprimento curto e comprimento médio. Essa particularidade ocorreu também em outros descritores quantitativos: largura máxima do limbo foliar, comprimento da bráctea, largura da sépala, diâmetro transversal do fruto, massa média do fruto, espessura da casca e número de sementes.



**Figura 1.** Análise de agrupamento de cinco matrizes de maracujazeiro azedo com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 25 descritores categóricos em quatro repetições.



**Figura 2.** Dispersão gráfica de cinco matrizes de maracujazeiro azedo (◆: CPMSC1; ◇: CPGA1; △: CPMGA2; ●: BRSMR1; ■: CPACMJM08) com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 25 descritores categóricos em quatro repetições.

As análises de variância (Tabela 3) mostraram que houve diferenças significativas entre as matrizes para seis dos oito descritores analisados, envolvendo folhas e flores: comprimento do pecíolo (PC), comprimento da bráctea (FLCB), comprimento da sépala (FLCS), largura da sépala (FLLS), diâmetro das extremidades da corona (FLDEC) e largura dos anéis coloridos nos filamentos da corona (FLLAFC), sendo iguais estatisticamente apenas para comprimento do limbo foliar (LFC) e largura máxima do limbo foliar (LFLM).

Os valores do coeficiente de variação (CV) mostraram uma boa precisão experimental para esses descritores quantitativos, sendo o menor valor de 3,24% para diâmetro das extremidades da corona (FLDEC) e o maior valor para largura máxima do limbo foliar (6,93%).

**Tabela 3.** Significância (Probabilidade em % pelo teste F) e parâmetros genéticos dos dados relativos às oito características quantitativas de folhas e flores de cinco matrizes (CPMSC1, CPGA1, CPMGA2, BRSMR1 e CPACMJM08) de maracujazeiro azedo. Embrapa Cerrados/UnB, Brasília, DF, 2017.

FONTE DE VARIACÃO	Descritores quantitativos <sup>(1)</sup>							
	LFC	LFLM	PC	FLCB	FLCS	FLLS	FLDEC	FLLAFC
Tratamentos (significância)	0,25 <sup>ns</sup>	0,11 <sup>ns</sup>	0**	0**	0**	0**	0**	0**
Média	12,02	14,29	3,89	2,51	4,23	1,51	8,98	1,65
CV (%)	3,74	6,93	5,64	6,58	3,50	3,77	3,24	3,51
Coeficiente de determinação	32,99	79,11	93,14	92,67	79,76	91,04	93,75	98,51

\*\*,\*Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

<sup>(1)</sup>LFC, comprimento do limbo foliar (cm); LFLM, largura máxima do limbo foliar (cm); PC, comprimento do pecíolo (cm); FLCB, comprimento da bráctea (cm); FLCS, comprimento da sépala (cm); FLLS, largura da sépala (cm); FLDEC, diâmetro das extremidades da corona (cm); FLLAFC, largura dos anéis coloridos nos filamentos da corona (cm).

Apesar de não haver diferença significava para as estruturas foliares (comprimento e largura), as maiores médias foram observadas nas matrizes masculinas CPGA1 e BRSMR1 (Tabela 4). A maior média do comprimento do limbo foliar foi verificada na matriz BRSMR1 (12,32 cm) e a maior média da largura da folha foi observada na matriz CPGA1 (15,88 cm).

A matriz CPGA1 apresentou o maior comprimento do pecíolo (4,32 cm) e a matriz BRSMR1 apresentou o maior comprimento de bráctea (2,77 cm) e largura dos anéis coloridos nos filamentos da corona (2,03 cm), o genitor CPACMJM08 apresentou o maior comprimento de sépala (4,51 cm) e verificou-se maior largura da sépala (1,61 cm) e diâmetro das extremidades da corona (9,61 cm) na matriz CPMGA2. Os descritores comprimento da bráctea (FLCB), comprimento da sépala (FLCS), diâmetro das extremidades da corona (FLDEC) embora apresentem diferenças significativas, pertencem à mesma classe fenotípica apresentada

na Tabela 2 (médio, longo e grande, respectivamente).

**Tabela 4.** Médias dos oito descritores quantitativos de folhas e flores avaliados em cinco matrizes de maracujazeiro azedo<sup>(1)</sup>. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

Matriz	Descritores quantitativos <sup>(2)</sup>							
	LFC	LFLM	PC	FLCB	FLCS	FLLS	FLDEC	FLLAFC
CPMSC1	11,72 a	13,15a	3,41b	2,52 a	4,08b	1,37b	8,32b	1,66b
CPGA1	12,28 a	15,88a	4,32 a	2,52 a	4,18ab	1,47ab	8,97ab	1,54bc
CPMGA2	11,79 a	13,67a	3,53b	2,74 a	4,24ab	1,61 a	9,61a	1,39c
BRSMR1	12,32 a	14,85a	3,97ab	2,77 a	4,17ab	1,55 a	9,50 a	2,03a
CPACMJM08	11,98 a	13,89a	4,28 a	2,01b	4,51a	1,57 a	8,49b	1,63b

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey 1% de probabilidade. <sup>(2)</sup>LFC, comprimento do limbo foliar (cm); LFLM, largura máxima do limbo foliar (cm); PC, comprimento do pecíolo (cm); FLCB, comprimento da bráctea (cm); FLCS, comprimento da sépala (cm); FLLS, largura da sépala (cm); FLDEC, diâmetro das extremidades da coroa (cm); FLLAFC, largura dos anéis coloridos nos filamentos da coroa (cm).

Quanto aos sete descritores quantitativos de frutos obtidos para três matrizes (CPMSC1, CPMGA2 e CPACMJM08), verificou-se pelas análises de variância (Tabela 5) que apenas dois (relação diâmetro longitudinal/diâmetro transversal e espessura da casca) apresentaram diferenças significativas.

Os maiores valores do coeficiente de variação (CV) foram obtidos para massa média do fruto e número de sementes por fruto (22,03% e 21,7%, respectivamente). Resultado semelhante de maior valor do CV para massa média do fruto (32,76%) foi relatado por Sousa et al. (2012), no estudo de caracterização e diversidade genética de *Passiflora*, indicando a natureza complexa dessa característica, que sofre grande influência ambiental, que não é interessante para descritores utilizados na caracterização e diferenciação das cultivares. De um modo geral, os valores do coeficiente de determinação foram altos para a maioria dos descritores, o que demonstra uma boa acurácia experimental.

**Tabela 5.** Significância (Probabilidade em % pelo teste F) e parâmetros genéticos dos dados relativos às características quantitativas dos frutos de três matrizes maracujazeiro azedo. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

FONTE DE VARIACÃO	Descritores quantitativos <sup>(1)</sup>						
	FRDL	FRDT	FRRDLT	FRMM	FREC	FRSS	FRNS
Tratamentos (significância)	0,37 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>*</sup>	0 <sup>**</sup>	0,06 <sup>ns</sup>	0 <sup>**</sup>	0,08 <sup>ns</sup>	0,04 <sup>*</sup>
Média	9,63	7,66	1,26	218,19	0,68	11,59	310,74
CV (%)	6,53	5,91	3,84	22,03	11,50	9,33	21,70
Coefficiente de determinação	9,34	87,73	92,34	74,26	91,51	69,46	79,41

\*\*,\*Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

<sup>(1)</sup>FRDL, diâmetro longitudinal do fruto (cm); FRDT, diâmetro transversal do fruto (cm); FRRDLT, relação diâmetro longitudinal/diâmetro transversal do fruto; FRMM, massa média do fruto (g); FREC, espessura da casca do fruto (cm); FRSS, teor de sólidos solúveis totais (°Brix); FRNS, número de sementes por fruto maduro.

Em relação aos frutos, as médias do diâmetro longitudinal e transversal variaram de 9,39 a 10 cm, sendo a maior verificada na matriz CPMSC1 e 6,92 a 8,10 cm, com a maior média para a matriz CPGA2, respectivamente (Tabela 6). A maior média para relação diâmetro longitudinal/diâmetro transversal do fruto foi observada na matriz CPACMJM08 (1,36) e a menor na matriz CPMGA2 (1,18).

A matriz CPMGA2 apresentou maiores médias de massa média do fruto e espessura da casca. Neves et al. (2013) e Gonçalves et al. (2008) em estudos com maracujá azedo verificaram correlação positiva entre essas duas características, sendo assim, o aumento da massa do fruto implica em ganhos na espessura de casca. Além disso, essa matriz apresentou maior teor de sólidos solúveis totais e número de sementes.

**Tabela 6.** Médias de sete descritores quantitativos de frutos avaliados em três matrizes de maracujazeiro azedo <sup>(1)</sup>. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

FONTE DE VARIACÃO	Descritores quantitativos <sup>(1)</sup>						
	FRDL	FRDT	FRRDLT	FRMM	FREC	FRSS	FRNS
CPMSC1	10,00a	7,97a	1,26ab	235,80a	0,66ab	10,48a	344,83a
CPMGA2	9,48 a	8,10a	1,18b	254,24a	0,82a	12,32a	361,88a
CPACMJM08	9,39 a	6,92a	1,36 a	164,53a	0,56b	11,96a	225,50a

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey 1% de probabilidade. <sup>(2)</sup>FRDL, diâmetro longitudinal do fruto (cm); FRDT, diâmetro transversal do fruto (cm); FRRDLT, relação diâmetro longitudinal/diâmetro transversal do fruto; FRMM, massa média do fruto (g); FREC, espessura da casca do fruto (cm); FRSS, teor de sólidos solúveis totais (°Brix); FRNS, número de sementes por fruto maduro.

Observou-se uma baixa taxa de validação dos descritores, variando de 43% a 56% (Tabela 7). A presença de variabilidade fenotípica dos descritores na mesma matriz e até na

mesma planta pode ter levado a diferenças na obtenção dos descritores na ocasião do pedido de proteção das cultivares e nas condições experimentais desse trabalho. Algumas características como a massa média dos frutos e o número de sementes por fruto são muito influenciadas pelas condições ambientais, pela idade da planta e também pela eficiência do processo de polinização natural ou artificial, sendo assim, tais características não deveriam ser utilizadas para diferenciação para processos de proteção de cultivares.

Além disso, as altas incidências de virose nas plantas avaliadas podem ter contribuído com essas taxas. É possível perceber na Tabela 7 um evidente exemplo disso, a matriz CPMSC1 apresentou classes menores de alguns descritores quantitativos (comprimento do limbo foliar, comprimento do pecíolo, largura da sépala, diâmetro transversal do fruto, massa média do fruto, teor de sólidos solúveis totais e número de sementes por fruto) quando comparada aos mesmos obtidos no pedido da proteção. Essas são características fortemente influenciadas pela doença.

**Tabela 7.** Validação das matrizes de maracujazeiro azedo. Embrapa Cerrados/UnB, Brasília, DF, 2017.

DESCRITOR <sup>(1)</sup>	CP MSC1*	CP MSC1	CP GA1*	CP GA1	CPM GA2*	CPM GA2	BRS MR1*	BRS MR1	CPAC MJM08
1	1	3	1	3	1	3	1	3	2
2	5	3	5	5	3	3	3	5	3
3	5	5	5	7	5	5	5	5	5
4	7	7	7	7	7	7	7	7	7
5	7	5	3	7	7	7	5	7	7
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	3	5	5	5	3	5	5	5	5
8	5	7	5	7	5	7	3	7	7
9	5	3	3	3	3	5	3	5	5
10	7	7	5	7	7	7	5	7	7
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	2	2	2	2	2	2	2	2	2
13	7	7	3	7	7	5	5	7	7
14	1	2	1	2	1	2	1	2	2
15	5	5	5	-	5	3	5	-	3
16	5	3	7	-	5	5	7	-	3
17	5	5	5	-	5	3	3	-	5
18	2	5	2	-	2	3	3	-	5
19	1	1	1	-	1	1	1	-	2
20	2	2	2	-	1	1	2	-	
21	7	5	5	-	7	7	7	-	5
22	5	5	5	-	5	5	3	-	3
23	2	4	3	-	2	3	2	-	4
24	7	5	7	-	7	7	7	-	5
25	7	5	7	-	7	5	7	-	5
% Validação	(48%)		(50%)		(56%)		(43%)		

<sup>(1)</sup>Descritores 1 a 25 e respectivos códigos de classes fenotípicas – ver Tabela 2. \*Descritores obtidos para proteção do material.

### 5.3.2 Caracterização molecular

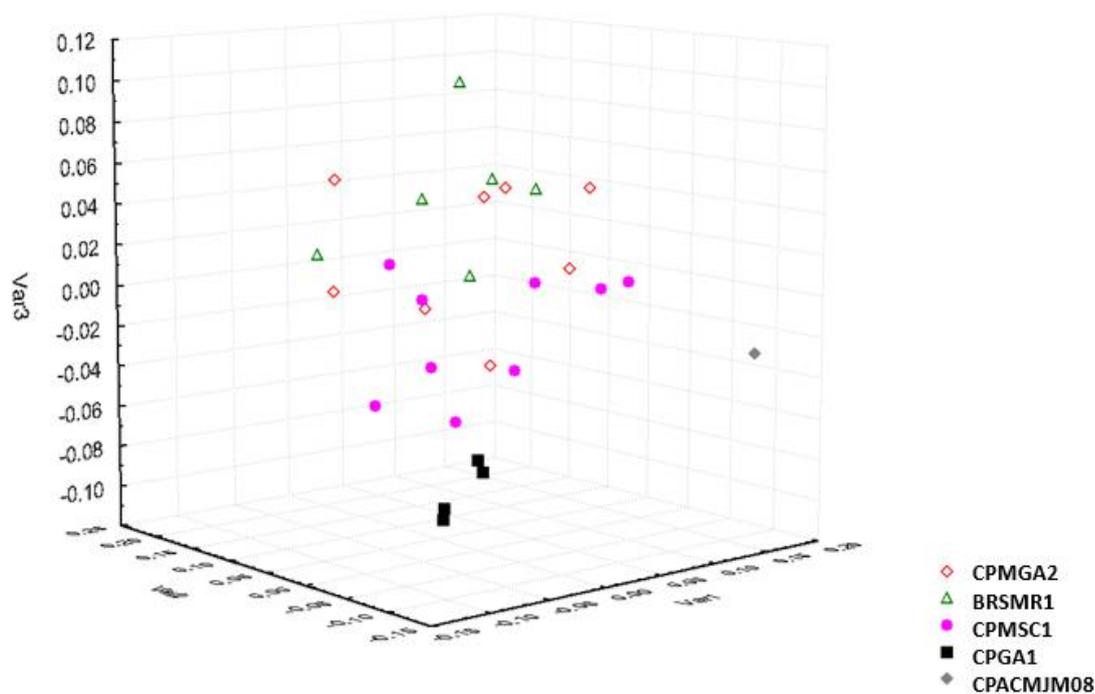
Os quatro *primers* utilizados geraram 75 marcadores RAPD (Tabelas 8), obtendo-se a média de 18,75 marcadores por *primer*. Do total de marcadores, 72% foram polimórficos. Análises utilizando marcadores RAPD têm se demonstrado úteis em estudos de caracterização e variabilidade genética de acessos, cultivares e espécies do gênero *Passiflora* (BELLON et al., 2007, 2009; JUNQUEIRA et al. 2007; CASTRO et al., 2011).

Os coeficientes de dissimilaridade genética entre as plantas da mesma matriz foram próximos e não iguais a zero, possivelmente devido a ocorrência de um ou dois marcadores não reprodutíveis, típicos da técnica de RAPD.

**Tabela 8.** Iniciadores utilizados para obtenção dos marcadores RAPD para as cinco matrizes de maracujazeiro azedo e respectivos números de bandas polimórficas e monomórficas. Embrapa Cerrados/UnB, Brasília, DF, 2017.

Iniciador	Sequência 5'→3'	Nº de bandas Polimórficas	Nº de bandas Monomórficas
OPD-16	AGGGCGTAAG	13	2
OPH-04	GGAAGTCGCC	16	6
OPH-12	ACGCGCATGT	8	10
OPH-16	TCTCAGCTGG	17	3
Total		54	21

A dispersão gráfica em três dimensões (Figura 3), realizada com base na matriz de distâncias genéticas confirmou uma possível mistura genética envolvendo plantas das matrizes CPMGA2 e BRSMR1. Este diagnóstico foi importante para a substituição das mudas das matrizes, garantindo a origem genética das sementes das cultivares híbridas a serem produzidas.



**Figura 3.** Dispersão gráfica três dimensões de cinco matrizes de maracujazeiro azedo utilizadas na produção de sementes híbridas, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 75 marcadores RAPD.

## 5.4 CONCLUSÕES

Os descritores morfoagronômicos permitiram uma diferenciação das cinco matrizes de maracujazeiro azedo avaliadas, entretanto as taxas de validação dos descritores foram baixas. A avaliação das matrizes em dois locais diferentes e plantas com incidência de virose contribuíram para a baixa taxa de validação dos descritores.

A caracterização molecular das matrizes de maracujazeiro azedo também foi realizada com sucesso e marcadores moleculares RAPD permitiram verificar uma possível mistura genética entre duas matrizes, as quais foram substituídas, garantindo a origem genética das sementes híbridas a serem produzidas.

## 5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABF, **ANÚARIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA**, Michelle Treichel ... [et al.]. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016. 88 p.: il.

AVIANI, D.M.; SANTOS, F.S. Uso de marcadores moleculares em proteção de cultivares. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de Cultivares no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, Brasília: Mapa/ACS, 2011. p.155-158.

BELLON, G.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, K.P.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SANTOS, E.C.; 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**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 1, p. 124-127, 2007.

BELLON, G.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, K.P.; JUNQUEIRA, N.T.V.; FONSECA, K.G.; BRAGA, M.F. Variabilidade genética de acessos obtidos de populações cultivadas e silvestres de maracujazeiro-doce com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 1, p. 197-202, 2009.

BRASIL. **Lei Nº 10.711, de 5 de agosto de 2003**. Dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças e dá outras providências. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/2003/L10.711.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/L10.711.htm)>. Acesso em: 30 nov.2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Formulário 3 - Espécies em regime de proteção: instruções de DHE e tabela de Descritores Mínimos**. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/protecaocultivares/formularios-protecao-cultivares/MARACUJA\\_EDULIS\\_FORMULARIO\\_16DEZ2008\\_P.doc](http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/protecaocultivares/formularios-protecao-cultivares/MARACUJA_EDULIS_FORMULARIO_16DEZ2008_P.doc)>. Acesso em: 03 jan. 2017.

CASTRO, A.P.G.; FALEIRO, F.G.; CARVALHO, D.D.C.; FONSECA, K.G.; VILELA, M.F.; JUNQUEIRA, N.T.V.; CARES, J.E. Genetic variability of *Passiflora* spp. from commercial fields in the Federal District, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.6, p.996-1002, 2011.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Maracujá - BRS Gigante Amarelo (BRS GA1)**. Disponível em<<https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/1035/maracuja---brs-gigante-amarelo-brs-ga1>>. Acesso em: 20 jan. 2017a.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Maracujá - BRS Rubi do Cerrado (BRS RC)**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/1040/maracuja---brs-rubi-do-cerrado-brs-rc>>. Acesso em: 20 jan. 2017b.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Maracujá - BRS Sol do Cerrado (BRS SC1)**. Disponível em< <https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e>

servicos/-/produto-servico/1038/maracuja---brs-sol-do-cerrado-brs-scl>. Acesso em: 20 jan. 2017c.

FALEIRO, F.G. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento vegetal. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M (Ed.). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011, p.55-118.

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. 6p. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 92).

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.

FERREIRA, M.E. Genotipagem de coleções de germoplasma vegetal. In: FALEIRO, F.G.; FARIAS NETO, A.L.; RIBEIRO JÚNIOR, W.Q. **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2008. p. 75-89.

GONÇALVES, G.M.; VIANA, A.P.; REIS, L.S.; NETO, F.V.B.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; REIS, L.S. Correlações fenotípicas e genético-aditivas em maracujá-amarelo pelo delineamento I. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p. 1413-1418. 2008.

JUNQUEIRA, K.P.; FALEIRO, F.G.; RAMOS, J.D.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 3, p. 571-575, 2007.

MELETTI, L.M.M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, Volume Especial, E. 083-091, 2011.

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

NEVES, C.G.; JESUS, O.N.; LEDO, C.A.S.; OLIVEIRA, E.J. Avaliação agronômica de parentais e híbridos de maracujazeiro-amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal-SP, v.35, n.1, p. 191-198, 2013.

SANTOS, F.S. Analisando a homogeneidade. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de Cultivares no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, Brasília: Mapa/ACS, 2011. p.177-182.

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

SOUSA, L.B.; SILVA, E.M.; GOMES, R.L.F.; LOPES, A.C.A.; SILVA, I.C.V. Caracterização e divergência genética de acessos de *Passiflora edulis* e *P. cincinnata* com base em características físicas e químicas de frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 34, n. 3, p. 832-839, 2012.

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

UPOV. INTERNATIONAL UNION FOR THE PROTECTION OF NEW VARIETIES OF PLANTS. **Document TGP/10 “Examining Uniformity”**, October 30, 2008. Disponível em: < [http://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp\\_10.pdf](http://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp_10.pdf) > Acesso em: 13 dez. 2016.

VIANA, A.P., GONÇALVES, G.M. Genética quantitativa aplicada ao melhoramento genético do maracujazeiro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. 1 ed. Brasília: EMBRAPA, 2005. p.277-294.

**CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE GENÉTICA DE MATRIZES DE  
MARACUJAZEIRO AZEDO E ORNAMENTAL UTILIZANDO MARCADORES  
MICROSSATÉLITES**

**CHARACTERIZATION AND GENETIC DIVERSITY OF SOUR AND  
ORNAMENTAL PASSION FRUIT MOTHER PLANTS USING MICROSSATELLITE  
MARKERS**

## RESUMO

Marcadores SSR tem sido utilizados em estudos de caracterização e diversidade genética por serem codominantes e apresentarem elevado conteúdo de informação polimórfica. O objetivo desse trabalho foi caracterizar e estimar a variabilidade genética de seis matrizes de maracujazeiro ornamental e cinco matrizes de maracujazeiro azedo por meio de marcadores microssatélites (SSR). O DNA genômico de cada material foi extraído e 18 pares de *primers* utilizados para a obtenção dos marcadores SSR, a partir dos quais foi feita a caracterização das matrizes e estimadas as distâncias genéticas entre elas. Foram também realizadas análises de dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais por meio das coordenadas principais. A partir dos 16 pares de *primers*, foram obtidos 74 alelos, variando de 2 a 9 alelos por loco, perfazendo uma média de 4,6 alelos por loco. Foram estimadas a porcentagem de heterozigose, sendo a maior (64%) verificada na matriz CPACMJM08. As distâncias genéticas entre as matrizes variaram de 0,297 a 0,962. Foi possível observar uma tendência de agrupamento das matrizes da mesma espécie (*P. edulis* Sims) e de matrizes obtidas a partir de cruzamentos interespecíficos envolvendo esta espécie, como o híbrido ornamental BRS Céu do Cerrado (BRS CC). Os marcadores SSR permitiram a caracterização de cada uma das matrizes analisadas e evidenciaram uma diversidade genética correlacionada com as diferentes genealogias dessas matrizes.

**Palavras-chave:** *Passiflora* spp., marcadores SSR, identidade genética, polimorfismo.

## ABSTRACT

SSR markers have been used in the characterization and genetic diversity studies and have shown advantages because they are codominant and present high content of polymorphic information. The purpose of this work was to characterize and estimate the genetic variability of six ornamental passion fruit and five sour passion fruit mother plants using microsatellite markers (SSR). The genomic DNA of each material was extracted and 18 pairs of primers were used to obtain SSR markers, from which the characterization of the matrices was made and the genetic distances among them were estimated. Graphical dispersion analysis was also performed based on multidimensional scales by means of the main coordinates. From the 16 pairs of primers, 74 alleles were obtained, varying from 2 to 9 alleles per loco resulting in a mean of 4.6 alleles per loco. The heterozygosis percentage was estimated, being the largest (64%) one found in CPACMJM08 mother plant. Genetic distances between the mother plants ranged from 0.279 to 0.962. It was possible to observe a cluster trend in mother plants of the same species (*P. edulis* Sims) and mother plants obtained from interspecific crosses involving this species as BRS Céu do Cerrado (BRS CC) ornamental hybrid. SSR markers allowed the characterization of each mother plant analyzed and showed a genetic diversity correlated with the different genealogies of these mother plants.

**Keywords:** *Passiflora* spp., SSR markers, genetic identity, polymorphism.

## 6.1 INTRODUÇÃO

Muitas espécies de maracujá (*Passiflora* spp.) são alógamas (BRUCKNER et al., 2005) e apresentam uma ampla variabilidade genética (FERREIRA, 2005). O gênero *Passiflora* apresenta mais de 500 espécies (OLIVEIRA; RUGGIERO, 2005), entretanto, a espécie *Passiflora edulis* Sims (maracujazeiro azedo) é a mais cultivada e comercializada em função da qualidade dos seus frutos e rendimento industrial (FALEIRO et al., 2005).

Espécies de maracujazeiro silvestre têm sido utilizadas para diversificar os sistemas de produção, pois algumas delas apresentam potencial para o mercado de frutas especiais, outras possuem aptidão ornamental e algumas, ainda, apresentam características interessantes que podem ser úteis em programas de melhoramento genético (FALEIRO et al., 2011; JUNQUEIRA et al., 2005).

Nesse sentido, por meio do programa de melhoramento genético de maracujazeiro azedo, a Embrapa e parceiros lançaram, em 2008, os híbridos BRS Gigante amarelo (BRS GA1) e BRS Sol do Cerrado (BRS SC1) e em 2012, lançaram o híbrido BRS Rubi do Cerrado (BRS RC), que apresentam diversas vantagens quando comparadas a outras cultivares comerciais como produtividade, qualidade física e química de frutos e maior tolerância a doenças. (EMBRAPA, 2017a; 2017b, 2017c)

Outro avanço nessa cultura foi o lançamento de cultivares de maracujazeiro ornamental BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora e BRS Roseflora em 2007 e da cultivar BRS Pérola do Cerrado (BRS PC) em 2013, que além do potencial ornamental, possui outras aptidões como consumo *in natura*, processamento industrial e propriedade funcional (EMBRAPA, 2017d; 2017e, 2017f, 2017g).

Os materiais propagativos dessas cultivares são sementes obtidas a partir de cruzamentos controlados de matrizes selecionadas (maracujazeiro azedo) e mudas obtidas a partir da propagação vegetativa de matrizes selecionadas (maracujazeiro ornamental), que exigem certos cuidados na manutenção em condições de telado e protegidas de contaminação por pólen externo, segundo Meletti et al. (2005) e Meletti (2011), a fim de garantir a origem e identidade genética (“conjunto de caracteres genotípicos e fenotípicos da cultivar que a diferencia de outras”), exigida pela Lei de Sementes e Mudas (BRASIL, 2003).

De acordo com Faleiro et al. (2005), a caracterização do gênero *Passiflora*, sua diversidade genética e a exploração da variabilidade genética são necessários e úteis em programas de melhoramento genético. A caracterização de germoplasma, segundo Ferreira

(2008), pode ser realizada de diversas maneiras, por meio de descritores morfológicos, características agronômicas e marcadores moleculares. Diante dos vários tipos de marcadores moleculares, os microssatélites também conhecidos por sequências simples repetidas (*Simple Sequence Repeats - SSR*) se destacam por serem altamente polimórficos, codominantes e apresentarem elevado conteúdo de informação polimórfica (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; FALEIRO, 2007). São adequados para a caracterização molecular de coleções de germoplasma e para gerar informações sobre a sua diversidade genética (FERREIRA, 2008).

A codominância e multialelismo tornam os marcadores SSR indicados para análises de identidade genética ou *fingerprinting*, pois exibem um padrão único (impressão digital genética), identificando e caracterizando os indivíduos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; FALEIRO, 2007; FALEIRO, 2011).

A utilidade dos marcadores SSR no estudo de diversidade genética e *fingerprinting* de DNA foram relatados em estudos com outras culturas como uva e arroz (LAMBOY; ALPHA, 1998; CHAKRAVARTHI; NARAVANENI, 2006) e, segundo Aviani e Santos (2011), os perfis genéticos (“*fingerprinting*”) de cultivares, obtidos por meio de marcadores SSR apesar de não apresentarem caráter decisivo podem ser anexados ao pedido de proteção pelos obtentores para fins de complementariedade de caracterização de cultivares quando diferenças entre os DNAs de cultivares não estejam relacionadas a uma expressão fenotípica. Neste trabalho, objetivou-se caracterizar e estimar a diversidade genética de seis matrizes de maracujazeiro ornamental e cinco matrizes de maracujazeiro azedo por meio de marcadores microssatélites (SSR).

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

A extração do DNA genômico de 11 matrizes selecionadas (Tabela 1) foi realizada em 2015 no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados, Planaltina-DF, pelo método do CTAB, com modificações (FALEIRO et al., 2003), utilizando folhas em estágio intermediário de maturação de seis matrizes de maracujazeiro ornamental coletadas na Embrapa Cerrados (Planaltina-DF) e de cinco matrizes de maracujazeiro azedo coletadas em um parceiro licenciado pela Embrapa para produção de sementes, também localizado em Planaltina-DF. A concentração de DNA foi estimada no espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) e cada amostra foi diluída para uma concentração de 5 ng/ µl.

**Tabela 1.** Códigos e descrição e procedência das matrizes selecionadas utilizadas. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

Nº	MATRIZ	TIPO	CÓDIGO	DESCRIÇÃO
1	BRS Rubiflora	Ornamental	-	-
2	BRS Rosea Púrpura	Ornamental	BRS RP	-
3	BRS Roseflora	Ornamental		-
4	BRS Céu do Cerrado	Ornamental	BRS CC	-
5	BRS Estrela do Cerrado	Ornamental	-	-
6	BRS Pérola do Cerrado	Ornamental	BRS PC	-
7	MSC	Azedo	CPMSC1	Genitor feminino do híbrido BRS GA1
8	GA	Azedo	CPGA1	Genitor masculino do híbrido BRS GA1
9	GA2	Azedo	CPMGA2	Genitor feminino do híbrido BRS SC1
10	MA	Azedo	BRSMR1	Genitor masculino do híbrido BRS SC1
11	Matriz Rubi	Azedo	CPACMJM08	Genitor feminino do híbrido BRS RC

Reações de amplificação de amostras de DNA das 11 matrizes foram realizadas no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, utilizando 18 pares de *primers* microssatélites di e tri-nucleotídeos desenvolvidos por ARAYA (2016).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) em *Passiflora* foi realizada em um volume de 5 µL, contendo 5 ng de cDNA genômico, 1X de QIAGEN Multiplex PCR Kit Master Mix (QIAGEN), 0,5X Q-Solution (QIAGEN), e 0,2 µM de cada primer. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Veriti™ (Applied Biosystems, USA) constituído pela sequência: 95°C por 15 minutos; 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55, 57 ou 60°C por 90 segundos, e 72°C por 60 segundos e, ao final, uma extensão de 60°C por 60 minutos. Adicionou-se 9 µL de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems, USA) e 1 µL de ROX-labeled

de tamanho padrão no produto da PCR, que foi desnaturado a 94°C por 5 minutos. O produto desnaturado foi injetado no sequenciador automático ABI3730 (Applied Biosystems, USA). As análises da genotipagem foram realizadas com o auxílio do software GeneMapper® v4.1 (Applied Biosystems, USA) e a binagem dos alelos foi realizada com o software Tandem (MATSCHINER; SALZBURGER, 2009), a partir dos quais estimou-se as distâncias genéticas entre as matrizes com o auxílio do Programa Genes (CRUZ, 2013) a partir da seguinte fórmula:

$DG_{ij} = 1 - (NLC/NTL)$  sendo:  $DG_{ij}$  = Distância genética entre as matrizes  $i$  e  $j$ ; NLC = Número de Locos Coincidentes; NTL = Número Total de locos. O NLC é o somatório das coincidências alélicas de cada loco analisado, sendo que cada coincidência pode assumir o valor 1 (dois alelos coincidentes); 0,5 (um alelo coincidente) e 0 (nenhum alelo coincidente) para encontros (0 1) e (1 0).

As matrizes de distâncias genéticas obtidas foram utilizadas para realizar as análises de agrupamento dos acessos. Para a formação de grupos via dendrograma, foi utilizado como critério de agrupamento o método UPGMA (*Unweighted pair-group method arithmetic average*). Foi realizada também a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio dos Programas SAS (SAS INSTITUTE INC., 1989) e Statistica (STATSOFT INC., 1999).

Além das análises supracitadas, estimou-se o polimorfismo, o número de alelos, a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), o conteúdo de informação polimórfica (PIC) e as frequências alélicas para os marcadores utilizando o software CERVUS v.3.0.3 (KALINOWSKI et al., 2007).

### 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 18 pares de *primers* SSR, 16 foram eficientes na amplificação do DNA, gerando o total de 74 alelos, com uma variação de dois a nove alelos por *loco*, perfazendo uma média de 4,6 alelos por *loco* (Tabela 2). Essa variação no número de alelos (dois a nove) foi semelhante ao observado por Cerqueira-Silva et al. (2012) em um estudo com *Passiflora cincinnata*. Outros autores também relataram baixo número de alelos: Reis et al (2011) encontraram média inferior (2,46 alelos por loco), ao estudarem a diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro azedo proveniente da estreita base genética dos parentais, Cerqueira-Silva et al. (2014) verificaram 2 a 6 alelos por loco e uma média de 3,1 alelos por loco para três espécies

de *Passiflora* e Oliveira et al. (2005) relataram o maior número de alelos para o gênero *Passiflora*, até 20 alelos por loco. Segundo Cerqueira-Silva (2012), o baixo número de alelos por loco é característico do gênero.

Esses pares de *primers* foram desenvolvidos por Araya (2016) para maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims), entretanto, a taxa de transferibilidade para outras espécies de maracujazeiro (*Passiflora* spp) foi muito alta. Verificou-se polimorfismos em todos os pares de *primers* utilizados (Tabela 2). O alto polimorfismo é uma característica evidente nesse tipo de marcador molecular relatado pela literatura (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), porém, há relatos de poucos microssatélites polimórficos para *Passiflora* e o baixo número de *loci* polimórficos como característica do gênero tem sido frequente (CERQUEIRA-SILVA et al., 2012; CERQUEIRA-SILVA, 2014).

**Tabela 2.** Estatísticas descritivas dos 18 pares de marcadores microsatélites de *Passiflora edulis* Sims utilizados em 11 matrizes de *Passiflora*. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

N°	Marcador	Sequência do primer 5'-3'	Motivo repetido	T <sub>a</sub>	N alelos	Faixa tamanho do alelo (pb)	He	Ho	PIC
1	BrPe0001	F:GTTGAGAGGATTGTGTTTG R:ATGGTAGAGGAGGAGAGA	(CT) <sub>14</sub>	55°C	4	153-159	0,59	0,46	0,48
2	BrPe0002	F:AAAGCCCAGATGAAGTGAA R:GGCTCCAATCAGAAGTGT	(AG) <sub>12</sub>	55°C	4	171-181	0,65	0,00	0,57
3	BrPe0003	F:CTTTCTCTCCCTATACCC R:CCCTCCATAATCACATAAC	(TC) <sub>11</sub>	55°C	6	274-296	0,73	0,36	0,66
4	BrPe0006	F:AAGGAAAAGAACAGCCTCA R:CGCTCTCAAATCAGTCAA	(TC) <sub>10</sub>	55°C	3	186-196	0,54	0,36	0,44
5	BrPe0010	F:GAAGAAAAAAGGGCTTG R:GTTAGGGTTTGGAGGA	(TC) <sub>9</sub>	55°C	6	187-205	0,86	0,60	0,80
6	BrPe0014	F:AATATGGCTGGGGAAAAC R:TTCCTGTCTTGGACCTT	(AG) <sub>7</sub>	57°C	6	215-227	0,68	0,33	0,61
7	BrPe0021	F:ACTTCTCATCATTCG R:GCTATGCCTCTTTTG	(TA) <sub>7</sub>	55°C	3	152-166	0,57	0,09	0,44
8	BrPe0024	F:CCCTACCTTTCTCTGCTT R:CATCTCCTCTATCTCCTC	(TC) <sub>7</sub>	55°C	5	226-234	0,71	0,40	0,63
9	BrPe0028	F:CAAAAGGAACAGGGAAGA R:GAAAGAGAGAAAGACAGAGA	(TA) <sub>6</sub>	55°C	4	98-104	0,70	0,18	0,61
10	BrPe0031	F:AGGTCCGGTGGGTGTGTTAG R:CATTCAACTCCCCAAAAGGT	(TA) <sub>9</sub>	60°C	3	147-151	0,63	0,18	0,52
11	BrPe0032	F:TTGCACAATGACCAATGTTGT R:CTGAGCACCTTGTCAAAATACA	(AT) <sub>13</sub>	60°C	5	138-152	0,80	0,50	0,72
12	BrPe0033	F:GCCATGAGAGACTTGGGAGA R:CGGTTGCCAAAAAGAAGAGA	(AT) <sub>8</sub>	60°C	6	231-249	0,71	0,60	0,63
13	BrPe0034	F:CCTGTGGTGAAAATGGAACC R:GAGCCCTGGACTGACACATT	(CT) <sub>15</sub>	60°C	9	217-239	0,88	0,89	0,81
14	BrPe0036	F:TCGGACCTTAAAACCGAGAA R:CAGCACCAAATTTGACGAG	(TC) <sub>6</sub>	60°C	2	197-203	0,52	0,36	0,37
15	BrPe0038	F:TTTCAACTTTTCGTGTGTGC R:TGTTGTGCTTGGAAAGGATG	(AT) <sub>6</sub>	60°C					
16	BrPe0042	F:CATGCATTCATTGTTTTCTTG R:GATGCTGGGAAAAAGAGTGC	(AT) <sub>8</sub>	60°C	6	139-163	0,75	0,27	0,67
17	BrPe0043	F:TCATACATGGATGTCAAATCGATAC R:GCGGACCAAGAAAATTCAAA	(AT) <sub>8</sub>	60°C					
18	BrPe3011	F:CCGGTCTTCCTGATTGACTC R:CCTCTCTCACCTGGAAGTGC	(TTC) <sub>4</sub>	60°C	2	157-161	0,17	0,18	0,15
MÉDIA					4,63		0,66	0,36	0,57

F: *Primer Forward*; R: *Primer Reverse*; T<sub>a</sub>: Temperatura de anelamento; Ho: Heterozigidade observada; He: Heterozigidade esperada; PIC: Conteúdo de Informação Polimórfica.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,15 (BrPe3011) a 0,81 (BrPe0034), com uma média de 0,57. O maior PIC foi semelhante ao relatado por Cerqueira-Silva et al. (2012), que variou de 0,06 a 0,80 em um estudo com *Passiflora cincinnata*. A média do PIC foi superior às encontradas por Reis et al. (2011), de 0,18 em uma população e 0,16 em outra população de maracujazeiro.

Segundo Botstein et al. (1980), os loci codominantes são considerados altamente informativos quando apresentam PIC maior a 0,5; razoavelmente informativos quando apresentam PIC entre 0,25 e 0,50 e levemente informativos quando apresentam PIC menor a 0,25. Sendo assim, de modo geral, os marcadores utilizados foram altamente informativos, apresentado uma média de 0,57, sendo que apenas quatro dos 16 marcadores apresentaram PIC entre 0,25 e 0,50 (razoavelmente informativos) e 1 foi levemente informativo (BrPe3011).

Em apenas um loco (BrPe0002) a heterozigidade observada ( $H_o$ ) foi igual a 0, e em dois loci (BrPe0034 e BrPe3011) a  $H_o$  foi superior a heterozigidade esperada ( $H_e$ ). A  $H_o$  variou de 0 a 0,89, perfazendo uma média de 0,36 e a  $H_e$  variou de 0,17 a 0,88, com uma média de 0,66. A média da  $H_o$  foi superior às relatadas por Reis et al. (2011), com 0,15 e 0,12 e inferior à observada por Cerqueira-Silva et al. (2012), de 0,516 e a média da  $H_e$  foi superior à 0,20 e 0,18 (REIS et al., 2011) e 0,525 (CERQUEIRA-SILVA et al., 2012).

A Figura 1 ilustra um exemplo de eletroferograma que gerou os dados de cada loco, com os respectivos tamanhos dos alelos em pares de base (pb). O marcador microssatélite é capaz de gerar tamanhos diferentes de fragmentos, representando alelos diferentes no mesmo loco (codominante), portanto, alelos iguais representam genótipos homozigotos e alelos diferentes definem genótipos heterozigotos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Nota-se, na ilustração, que os três primeiros genótipos são homozigotos e apresentam o mesmo alelo, já o quarto indivíduo é heterozigoto.



**Figura 1.** Eletroferograma do loco BrPe0042, com as respectivas estimativas dos pares de base de cada alelo das matrizes 1 a 4 (matrizes 1, 2 e 3: genótipos homocigotos e matriz 4: genótipo heterocigoto).

A Tabela 3 apresenta os 16 pares de *primers* SSR utilizados nas ampliações e os alelos obtidos (pb). Para as 11 matrizes estudadas no presente trabalho, a porcentagem de loci heterocigotos variou de 17% a 64%. A matriz CPACMJM08 (genitor feminino do híbrido BRS RC) apresentou a maior porcentagem de loci heterocigotos (64%), superior ao relatado (aproximadamente 15% a 30%) em outros trabalhos que utilizaram marcadores microssatélites em *Passiflora* (CERQUEIRA-SILVA et al. 2014; OLIVEIRA et al., 2008; PEREIRA, 2010).

**Tabela 3.** Alelos obtidos de 11 matrizes selecionadas de maracujazeiro utilizando 16 pares de *primers* SSR. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

Marcador/matrizes*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
BrPe0001	155, 155	155, 155	155, 155	157, 157	155, 155	155, 157	157, 157	155, 157	153, 157	155, 157	155, 159
BrPe0002	-	-	173, 173	181, 181	171, 171	171, 171	179, 179	179, 179	179, 179	179, 179	179, 179
BrPe0003	274, 274	274, 274	274, 274	286, 286	274, 274	274, 274	278, 296	278, 286	288, 292	286, 286	286, 292
BrPe0006	186, 196	186, 196	186, 186	186, 186	186, 196	186, 196	186, 186	186, 186	192, 192	196, 196	186, 186
BrPe0010	199, 199	197, 199	199, 199	187, 187	197, 197	-	201, 205	203, 205	201, 203	203, 205	201, 203
BrPe0014	-	223, 227	223, 225	217, 217	221, 223	-	215, 215	215, 215	215, 215	215, 215	215, 215
BrPe0021	152, 152	152, 152	152, 152	160, 166	152, 152	152, 152	160, 160	160, 160	160, 160	160, 160	160, 160
BrPe0024	232, 232	-	228, 228	232, 234	226, 226	226, 226	232, 232	230, 232	230, 232	232, 232	230, 232
BrPe0028	100, 100	100, 100	100, 100	104, 104	98, 98	100, 104	102, 102	104, 104	102, 104	104, 104	104, 104
BrPe0031	147, 147	147, 147	147, 147	147, 149	147, 147	147, 147	149, 149	149, 149	151, 151	149, 149	149, 151
BrPe0032	138, 144	140, 140	140, 144	138, 150	138, 144	138, 138	150, 152	152, 152	152, 152	152, 152	-
BrPe0033	-	243, 243	231, 243	241, 245	231, 241	241, 241	241, 249	241, 241	237, 243	241, 241	241, 243
BrPe0034	-	221, 233	231, 233	225, 227	229, 231	235, 239	217, 227	217, 227	217, 217	217, 227	-
BrPe0036	197, 197	197, 197	197, 203	203, 203	203, 203	203, 203	197, 203	197, 203	197, 197	197, 197	197, 203
BrPe0042	139, 139	139, 139	139, 139	151, 155	139, 139	163, 163	151, 151	141, 149	151, 151	151, 151	141, 151
BrPe3011	157, 157	157, 157	157, 157	157, 157	157, 157	157, 157	157, 157	157, 157	157, 157	157, 161	157, 161
Número de loci que amplificaram	12	14	16	16	16	14	16	16	16	16	14
% de loci homozigotos	83%	71%	69%	56%	69%	71%	69%	56%	63%	75%	36%
% de loci heterozigotos	17%	29%	31%	44%	31%	29%	31%	44%	38%	25%	64%

- Não amplificou

\* Matrizes 1 a 11 – ver Tabela 1

A frequência dos alelos variou de 0,05 a 0,91 (Tabela 4). A maior frequência (0,91) foi observada no loco BrPe3011, o qual apresentou o menor conteúdo de informação polimórfica, pois além de apresentar apenas dois alelos (157 e 161), verificou-se a presença do alelo 157 nas 11 matrizes analisadas. Nove delas foram homozigotas (157, 157) e as matrizes 10 e 11 (BRSMR1 e CPACMJM08, respectivamente) foram heterozigotas, apresentando os mesmos alelos (157, 161), conforme pode ser observado na Tabela 3.

**Tabela 4.** Frequência dos alelos em cada par de *primer* SSR. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

MARCADOR	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
BrPe0001	0,05 (153)	0,55 (155)	0,36(157)	0,05 (159)					
BrPe0002	0,22 (171)	0,11 (173)	0,56 (179)	0,11 (181)					
BrPe0003	0,45 (274)	0,09 (278)	0,27 (286)	0,05 (288)	0,09 (292)	0,05 (296)			
BrPe0006	0,64 (186)	0,09 (192)	0,27 (196)						
BrPe0010	0,10 (187)	0,15 (197)	0,25 (199)	0,15 (201)	0,20 (203)	0,15 (205)			
BrPe0014	0,56 (215)	0,11 (217)	0,06 (221)	0,17 (223)	0,06 (225)	0,06 (227)			
BrPe0021	0,45 (152)	0,50 (160)	0,05 (166)						
BrPe0024	0,20 (226)	0,10 (228)	0,15 (230)	0,50 (232)	0,05 (234)				
BrPe0028	0,09 (98)	0,32 (100)	0,14 (102)	0,45 (104)					
BrPe0031	0,50 (147)	0,36 (149)	0,14 (151)						
BrPe0032	0,25 (138)	0,15 (140)	0,15 (144)	0,10 (150)	0,35 (152)				
BrPe0033	0,10 (231)	0,05 (237)	0,50 (241)	0,25 (243)	0,05 (245)	0,05 (249)			
BrPe0034	0,28 (217)	0,06 (221)	0,06 (225)	0,22 (227)	0,06 (229)	0,11 (231)	0,11 (233)	0,06 (235)	0,06 (239)
BrPe0036	0,55 (197)	0,45 (203)							
BrPe0042	0,36 (139)	0,09 (141)	0,05 (149)	0,36 (151)	0,05 (155)	0,09 (163)			
BrPe3011	0,91 (157)	0,09 (161)							

Com apenas quatro marcadores SSR (BrPe0034, BrPe0010, BrPe0032 e Br0042) foi possível diferenciar as 11 matrizes de matrizes de maracujazeiro (Tabela 5). A seleção foi realizada com base nos loci mais informativos. O loco BrPe0010 conseguiu diferenciar os alelos das matrizes de maracujazeiro ornamental, com exceção da BRS Rubiflora que não amplificou, entretanto, as matrizes CPMSC1, CPGA1 e BRSMR1 apresentaram os mesmos alelos. Com o segundo loco (BrPe0010) foi possível amplificar o DNA das cultivares BRS Rubiflora e CPACMJM08, que não tinham amplificado com o primeiro marcador e foi possível diferenciar a matriz CPACMSC1. Com o quarto loco (BrPe0042), foi possível diferenciar as matrizes CPGA1 e BRSMR1 que ainda não haviam sido diferenciadas com as ampliações dos três primeiros loci.

**Tabela 5.** Quantidade mínima de loci capazes de diferenciar as 11 matrizes de *Passiflora*. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

Nº	Matriz	BrPe0034	BrPe0010	BrPe0032	BrPe0042
1	BRS Rubiflora	-	199, 199	138, 144	139, 139
2	BRS RP	221, 233	197, 199	140, 140	139, 139
3	BRS Roseflora	231, 233	199, 199	140, 144	139, 139
4	BRS CC	225, 227	187, 187	138, 150	151, 155
5	BRS Estrela do Cerrado	229, 231	197, 197	138, 144	139, 139
6	BRS PC	235, 239	-	138, 138	163, 163
7	CPMSC1	217, 227	201, 205	150, 152	151, 151
8	CPGA1	217, 227	203, 205	152, 152	141, 149
9	CPMGA2	217, 217	201, 203	152, 152	151, 151
10	BRSMR1	217, 227	203, 205	152, 152	151, 151
11	CPACMJM08	-	201, 203	-	141, 151

-não amplificou;

As dissimilaridades genéticas entre as matrizes variaram de 0,297 a 0,962 (Tabela 6). É possível verificar a coerência nesses dados, pois a menor distância foi observada entre duas matrizes de maracujazeiro azedo (CPGA1 e BRSMR1) e a maior dissimilaridade genética foi obtida entre uma matriz de maracujazeiro ornamental e uma matriz de maracujazeiro azedo (BRS Estrela do Cerrado e CPMGA2).

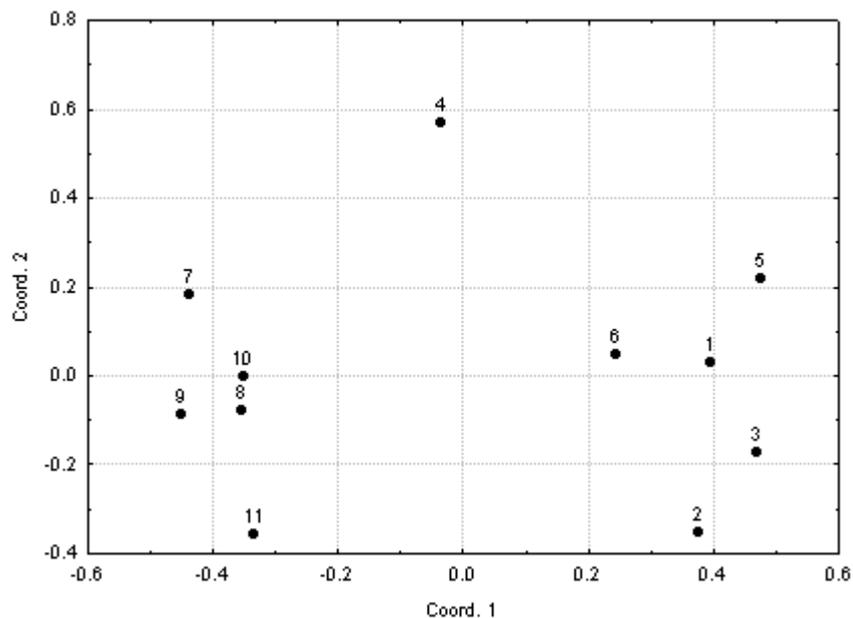
**Tabela 6.** Matriz de dissimilaridade genética entre 11 matrizes de maracujazeiro, calculadas com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei & Li, utilizando 16 pares de *primers* SSR. Embrapa Cerrados/ UnB, Brasília, DF, 2017.

MATRIZ*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0	0,570	0,538	0,867	0,595	0,759	0,949	0,905	0,918	0,867	0,905
2		0	0,335	0,873	0,639	0,703	0,905	0,835	0,937	0,778	0,880
3			0	0,835	0,563	0,722	0,892	0,867	0,949	0,861	0,867
4				0	0,861	0,873	0,766	0,804	0,880	0,741	0,810
5					0	0,570	0,918	0,892	0,962	0,886	0,873
6						0	0,854	0,753	0,943	0,804	0,861
7							0	0,361	0,506	0,380	0,576
8								0	0,519	0,297	0,468
9									0	0,443	0,494
10										0	0,475
11											0

\*Matrizes 1 a 11 – ver tabelas 1 e 5.

Pela dispersão gráfica (Figuras 2), foi possível observar um grupo bem definido composto pelas matrizes selecionadas de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims). As matrizes BRS RP e BRS Roseflora ficaram próximas geneticamente, pois a BRS Roseflora é

genitora da BRS RP. Dentre as matrizes ornamentais, observa-se um distanciamento da matriz 4 (BRS CC), com uma tendência de agrupamento com as matrizes de maracujazeiro azedo, o que é explicado por essa matriz ter em sua genealogia a espécie *Passiflora edulis* Sims (maracujazeiro azedo). A dissimilaridade genética dessa matriz em relação às demais matrizes ornamentais também foi verificada por Fonseca et al. (2017), utilizando os marcadores moleculares RAPD e ISSR.



**Figura 2.** Dispersão gráfica de 11 matrizes de maracujazeiro (1: BRS Rubiflora; 2: BRS RP; 3: BRS Roseflora; 4: BRS CC; 5: BRS Estrela do Cerrado; 6: BRS PC; 7: CPMSC1; 8: CPGA1; 9: CPMGA2; 10: BRSMR1; 11: CPACMJM08) com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 74 alelos SSR.

## 6.4 CONCLUSÃO

Os marcadores SSR permitiram a caracterização de cada uma das matrizes analisadas e quantificaram a diversidade genética entre elas, a qual foi correlacionada com as diferentes genealogias.

## 6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAYA, S. Desenvolvimento, validação, transferibilidade e aplicação de marcadores microsatélites em estudos genéticos das Passifloras. 2016. 283f. **Tese** (Doutorado em Agronomia). Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

AVIANI, D.M.; SANTOS, F.S. Uso de marcadores moleculares em proteção de cultivares. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de Cultivares no Brasil**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, Brasília: Mapa/ACS, 2011. p.155-158.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.

BRASIL. **Lei Nº 10.711, de 5 de agosto de 2003**. Dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças e dá outras providências. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/2003/L10.711.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/L10.711.htm)>. Acesso em: 30 nov.2016.

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. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.317-338.

CERQUEIRA-SILVA, C. B.; SANTOS, E.S.L.; VIEIRA, J.G.P.; MORI, G.M.; JESUS, O.N.; CORRÊA, R.X.; SOUZA, A.P. New microsatellite markers for wild and commercial species of *Passiflora* (Passifloraceae) and cross-amplification. **Applications in Plant Sciences**, v. 2, n. 2: 1300061, 2014.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; SANTOS, E.S.L.; SOUZA, A.M.; MORI, G.M.; OLIVEIRA, E.J.; CORRÊA, R.X. e SOUZA, A.P. Development and characterization of microsatellite markers for the wild South American *Passiflora cincinnata* (Passifloraceae). **American Journal of Botany**: e170-e172, 2012.

CHAKRAVARTHI, B.K. & NARAVANENI, R. SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa*. L). **African Journal of Biotechnology**, vol. 5, n. 9, p. 684-688, 2006.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **BRS Estrela do Cerrado**: Primeiro híbrido de maracujazeiro ornamental do Brasil. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/publico/usuarios/uploads/lancamentoornamentais/BRS%20Estrela%20do%20Cerrado.pdf>>. Acesso em: 20 de jan. 2017d.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **BRS Pérola do Cerrado**: Cultivar de maracujazeiro silvestre com quádrupla aptidão: consumo in natura, processamento

industrial, ornamental e funcional. Disponível em:  
<<http://www.cpac.embrapa.br/publico/usuarios/uploads/lancamentoperola/foldertecnico.pdf>>  
Acesso em: 05 jan. 2017g.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **BRS Roseflora:** Híbrido de passiflora para uso como planta ornamental. Disponível em:  
<<http://www.cpac.embrapa.br/publico/usuarios/uploads/lancamentoornamentais/BRS%20Roseflora.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2017f.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **BRS Rubiflora:** Híbrido de passiflora para ornamentação de muros e pérgulas. Disponível em:  
<<http://www.cpac.embrapa.br/publico/usuarios/uploads/lancamentoornamentais/BRS%20Rubiflora.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2017e.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Maracujá - BRS Gigante Amarelo (BRS GA1).** Disponível em<<https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/1035/maracuja---brs-gigante-amarelo-brs-ga1>>. Acesso em: 18 jan. 2017a.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Maracujá - BRS Sol do Cerrado (BRS SC1).** Disponível em< <https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/1038/maracuja---brs-sol-do-cerrado-brs-sc1>>. Acesso em: 18 jan. 2017b.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Maracujá - BRS Rubi do Cerrado (BRS RC).** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/1040/maracuja---brs-rubi-do-cerrado-brs-rc>>. Acesso em: 18 jan. 2017c.

FALEIRO, F.G. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 55-118, 2011.

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

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.; PEIXOTO, J.R. Pré-melhoramento do maracujá. In: LOPES, M.A.; FAVERO, A.P.; FERREIRA, M.A.J.F.; FALEIRO, F.G.; FOLLE, S.M.; GUIMARÃES, E.P. (Eds.) **Pré-melhoramento de plantas: estado da arte e experiências de sucesso.** Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, DF. 2011. p. 549-570.

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.

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. Genotipagem de coleções de germoplasma vegetal. In: FALEIRO, F.G.; FARIAS NETO, A.L.; RIBEIRO JÚNIOR, W.Q. **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2008. p. 75-89.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. Ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220p. (Embrapa Cenargen. Documentos, 20).

FONSECA, K.G.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BARTH, M.; FELDBERG, N.P. Morphoagronomic and molecular characterization of ornamental passion fruit varieties. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. No prelo 2017.

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. 81-108.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 5, p. 1099–1106, 2007.

LAMBOY, W.F. e ALPHA, C.G. Using Simple Sequence Repeats (SSR) for DNA Fingerprinting germoplasm accessions of grape (*Vitis L.*) species. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. v.123, n. 2, p. 182-188, 1998.

MATSCHINER, M.; SALZBURGER, W. TANDEM: Integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. **Bioinformatics**, v. 25, n. 15, p. 1982–1983, 2009.

MELETTI, L.M.M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, Volume Especial, E. 083-091, 2011.

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

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

OLIVEIRA, E.J.; VIEIRA, M.L.C.; GARCIA, A.A.F.; MUNHOZ, C.F.; MARGARIDO, G.R.A.; CONSOLI, L.; MATTA, F.P. e MORAES, M.C. An integrated molecular map of

yellow passion fruit based on simultaneous maximum-likelihood estimation of linkage and linkage phases. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. v.133, n.1, p.35-41, 2008.

OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônômico. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 143-158.

PEREIRA, G.S. **Desenvolvimento de Marcadores SSR, M-AFLP e SNP visando a integração de mapas genético-moleculares de *Passiflora alata* Curtis**. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo, Brasil, 154p., 2010.

REIS, R.V.; OLIVEIRA, E.J.; PIO VIANA, A.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G. e SILVA, M.G.M. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro-amarelo detectada por marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.1, p.51-57, 2011.

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 East 14th Street, Tulsa. 1999.

---

**ANEXOS**

## **ANEXO A. INSTRUÇÕES PARA EXECUÇÃO DOS ENSAIOS DE DISTINGUIBILIDADE, HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE DE CULTIVARES DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis* Sims)**

### **I. OBJETIVO**

Estas instruções visam estabelecer diretrizes para as avaliações de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) uniformizando o procedimento técnico de comprovação de que a cultivar apresentada é distinta de outra(s) cujos descritores sejam conhecidos, que seja homogênea quanto às suas características em cada ciclo reprodutivo e estável quanto à repetição das mesmas características ao longo de gerações sucessivas. Aplicam-se às cultivares de MARACUJÁ da espécie *Passiflora edulis* Sims (demais espécies são abordadas em outro normativo).

### **II. AMOSTRA VIVA**

1. Para atender ao disposto no art. 22 e seu parágrafo único da Lei 9.456 de 25 de abril de 1997, o requerente do pedido de proteção obrigará-se a disponibilizar ao SNPC, no mínimo 5 plantas, propagadas vegetativamente, ou 800 sementes viáveis, por ocasião do pedido de proteção.
2. As plantas devem estar vigorosas e em boas condições sanitárias.
3. As plantas não deverão ter sido submetidas a nenhum tipo de tratamento que possa influenciar na manifestação de características da cultivar que sejam relevantes para o exame de DHE, a menos que autorizado ou recomendado pelo SNPC. Em caso de tratamento já realizado, o mesmo deve ser informado com detalhes e justificativas ao SNPC.
4. As plantas devem ser obtidas, preferencialmente, de estacas. Caso seja utilizado outro método de propagação, este deverá ser especificado.
5. A amostra deverá ser disponibilizada ao SNPC após a obtenção do Certificado de Proteção. Entretanto, sempre que durante a análise do pedido for necessária a apresentação da amostra para confirmação de informações, o solicitante deverá disponibilizá-la.

### **III. EXECUÇÃO DOS ENSAIOS DE DISTINGUIBILIDADE, HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE-DHE**

1. Os testes deverão ser conduzidos por no mínimo dois ciclos de produção significativos independentes. No Brasil, os ensaios deverão ser iniciados com o plantio no período de setembro a novembro e as plantas acompanhadas até pelo menos o seu primeiro pico de safra.
2. Os ensaios deverão ser conduzidos em um único local. Caso neste local não seja possível a visualização de todas as características da cultivar, a mesma poderá ser avaliada em um local adicional.
3. Os ensaios de campo deverão ser conduzidos em condições que assegurem o desenvolvimento normal das plantas.

4. Cada teste deve incluir no mínimo 12 plantas úteis. Podem ser usadas parcelas separadas para avaliações, desde que estejam em condições ambientais similares.
5. A menos que seja indicado outro modo, as observações devem ser feitas em 12 plantas ou partes tiradas de cada uma das 12 plantas.
6. Testes adicionais para a avaliação de características relevantes poderão ser estabelecidos.

#### IV. LEGENDA DA TABELA DE DESCRITORES

1. As características contendo a classificação (a), (b), (c), (d), (#) ou (+) na primeira coluna da Tabela de Características, deverão ser examinadas como indicado no item VI (Observações e Figuras).

2. Considerar para as características contendo a classificação QL, QN ou PQ na primeira coluna da Tabela de Características:

QL: Característica qualitativa

QN: Característica quantitativa

PQ: Característica pseudo-qualitativa

V. TABELA DE CARACTERÍSTICAS DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis* Sims)

Denominação proposta para a cultivar:

Informar altitude e latitude do local dos testes de DHE:

Característica	Identificação da característica	Código de cada descrição	Cultivares-exemplo	Código da cultivar
1. Ramo: coloração PQ (a)	verde-clara	1		
	verde-escura	2		
	verde-arroxeadada	3		
	roxa	4		
2. Limbo foliar: comprimento QN (b) (+)	curto	3		
	médio	5		
	longo	7		
3. Limbo foliar: largura máxima QN (b) (+)	estreita	3		
	média	5		
	larga	7		
4. Limbo foliar: profundidade dos sinus QN (b) (+)	rasa	3		
	média	5		
	profunda	7		
5. Pecíolo: comprimento QN (b) (+)	curto	3		
	médio	5		
	longo	7		
6. Pecíolo: posição dos nectários QL (b)	adjacentes ao limbo foliar	1		
	distantes do limbo foliar	2		
7. Flor: comprimento da bráctea QN (c) (+)	curto	3		
	médio	5		
	longo	7		
8. Flor: comprimento da sépala QN (c) (+)	curto	3		
	médio	5		
	longo	7		
9. Flor: largura da sépala QN (c) (+)	estreita	3		
	média	5		
	larga	7		
10. Flor: diâmetro da corona QN (c) (+)	pequeno	3		
	médio	5		
	grande	7		

11. Flor: bandeamento nos filamentos da corona PQ (#) (c) (+)	ausente presente	1 2		
12. Flor: coloração dos anéis (exceto brancos) da corona PQ (c) (+)	rosa roxa	1 2		
13. Flor: largura dos anéis coloridos nos filamentos da corona QN (c) (+)	estreita média larga	3 5 7		
14. Flor: filamentos da corona QL (c) (+)	reto ondulado	1 2		
15. Fruto: diâmetro longitudinal QN (d) (+)	pequeno médio grande	3 5 7		
16. Fruto: diâmetro transversal QN (d) (+)	pequeno médio grande	3 5 7		
17. Fruto: relação diâmetro longitudinal/diâmetro transversal QN (d) (+)	muito pequeno pequeno médio grande muito grande	1 3 5 7 9		
18. Fruto: forma PQ (d) (#) (+)	oval oblonga arredondada oblata elipsóide oboval	1 2 3 4 5 6		
19. Fruto: coloração da casca (epiderme) PQ (#) (d)	amarela vermelha roxa	1 2 3		
20. Fruto: lenticelas QL (d)	inconspícuas (não visíveis ou pouco visíveis) conspícuas (visíveis)	1 2		

21. Fruto: peso médio (com polinização natural) QN (d) (+)	baixo médio alto	3 5 7		
22. Fruto: espessura da casca QN (d) (+)	fina média espessa	3 5 7		
23. Fruto: coloração da polpa PQ (d)	amarela-esverdeada amarela alaranjada alaranjada-escuro	1 2 3 4		
24. Fruto: teor de sólidos solúveis totais QN (d) (+)	baixo médio alto	3 5 7		
25. Fruto: número de sementes por fruto maduro (com polinização natural) QN (d) (+)	pequeno médio grande	3 5 7		

## VI. OBSERVAÇÕES E FIGURAS

1. As características contendo as letras a seguir na primeira coluna da tabela de características devem ser examinadas como o indicado abaixo:

(a) Ramo: avaliar ramos vigorosos, resultantes da brotação primaveril (ramos jovens, do ano, ainda não totalmente lignificados).

(b) Limbo foliar e pecíolo: avaliar em folhas completamente desenvolvidas (basais), no terço médio do ramo, durante a estação de crescimento.

(c) Flor: avaliar em flores completamente abertas (antese completa), sem defeitos resultantes de ataques de pragas ou intempéries climáticas.

(d) Fruto: avaliar em frutos característicos da cultivar, colhidos em pico de safra, em igual estágio de maturação, próximos ao ponto ideal de consumo.

2. Para as características contendo a indicação (#) na primeira coluna da Tabela de Características, apresentar fotografias ilustrativas com resolução de pelo menos 300 dpi.

3. As características contendo a indicação (+) na primeira coluna da Tabela de Características, deverão ser examinadas conforme as orientações ou figuras a seguir:

Característica 2 e 3. Limbo foliar: comprimento e largura máxima

2. Limbo foliar: comprimento

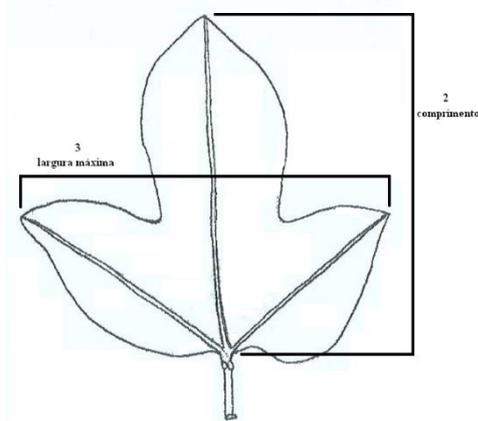
Considerar:

- curto: < 12 cm
- médio: 12 a 15 cm
- longo: > 15 cm

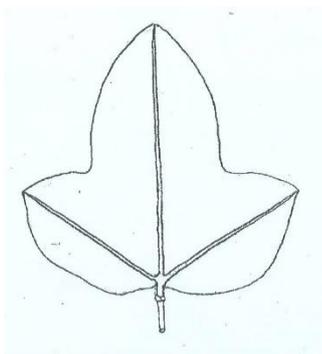
3. Limbo foliar: largura máxima

Considerar:

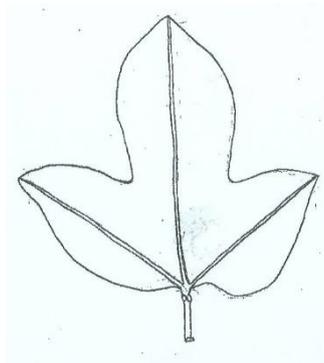
- estreita: < 12 cm
- média: 12 a 15 cm
- larga: > 15 cm



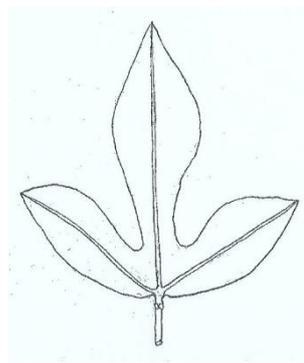
Característica 4. Limbo foliar: profundidade dos sinus



3  
Rasa



5  
média



7  
profunda

Característica 5. Pecíolo: comprimento

Considerar:

- curto: < 3,0 cm
- médio: 3,0 a 3,5 cm
- longo: > 3,5 cm

Características 7 a 9. Flor: comprimento da bráctea, comprimento da sépala e largura da sépala

7. Flor: comprimento da bráctea

Considerar:

- curto: < 2,0 cm
- médio: 2,0 a 3,0 cm
- longo: > 3,0 cm

8. Flor: comprimento da sépala

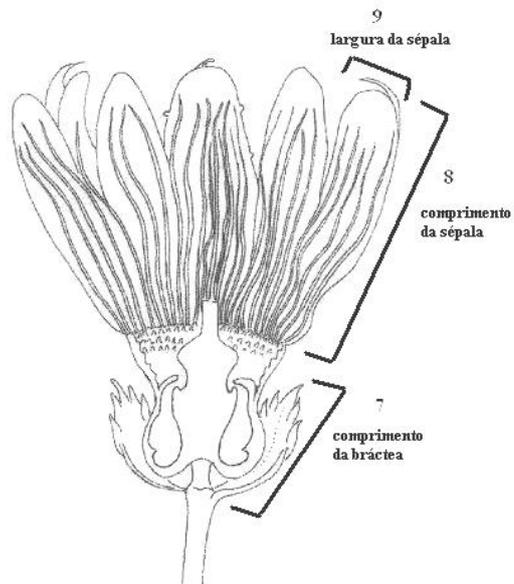
Considerar:

- curto: < 3,5 cm
- médio: 3,5 a 4,0 cm
- longo: > 4,0 cm

9. Flor: largura da sépala

Considerar:

- estreita: < 1,5 cm
- média: 1,5 a 2,0 cm
- larga: > 2,0 cm



Características 10 a 13. Flor: diâmetro da coroa, bandeamento nos filamentos da coroa, coloração dos anéis (exceto brancos) da coroa e largura dos anéis coloridos nos filamentos da coroa

10. Flor: diâmetro da coroa

Considerar:

- pequeno: < 7 cm
- médio: 7 a 8 cm
- grande: > 8 cm

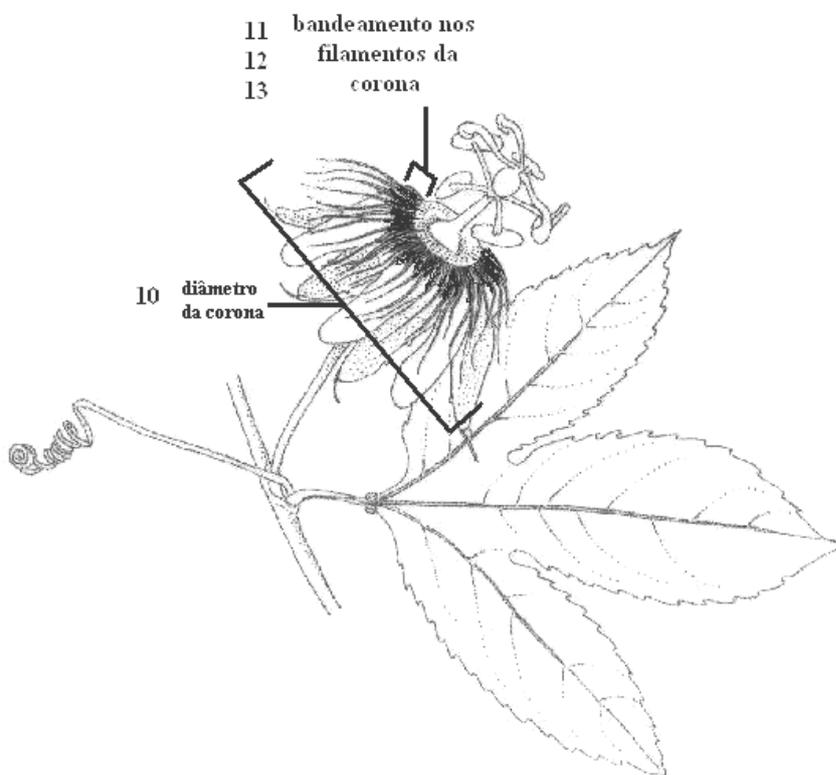
11. Flor: bandeamento nos filamentos da coroa

12. Flor: coloração dos anéis (exceto brancos) da coroa

13. Flor: largura dos anéis coloridos nos filamentos da coroa

Considerar:

- estreita: < 1,0 cm
- média: 1,0 a 1,5 cm
- larga: > 1,5 cm



Característica 15. Fruto: diâmetro longitudinal

Considerar:

- pequeno: < 10 cm
- médio: 10 a 13 cm
- grande: > 13 cm

Característica 16. Fruto: diâmetro transversal

Considerar:

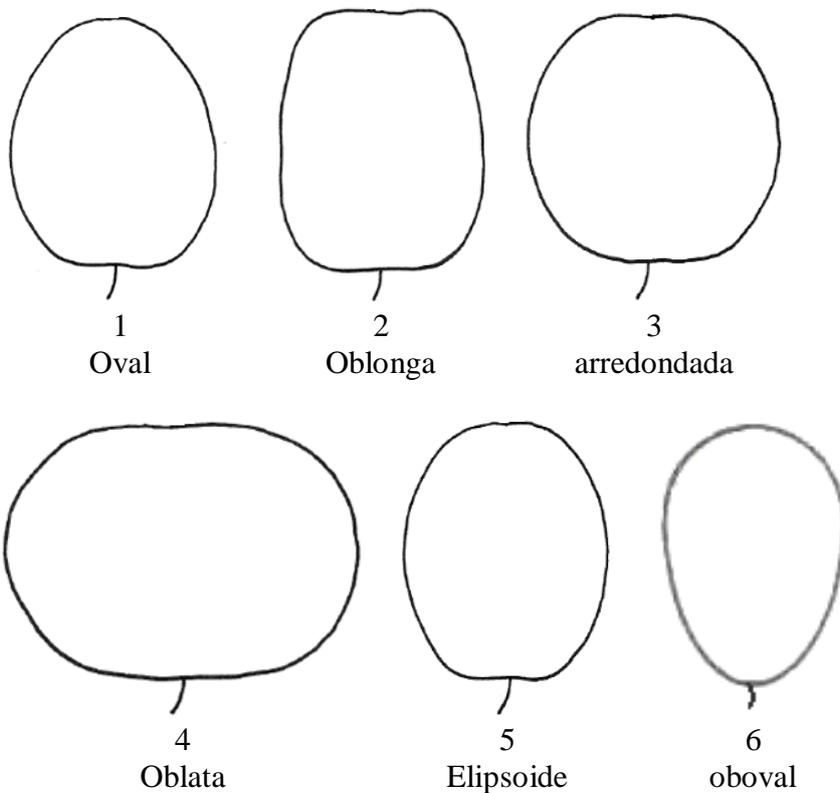
- pequeno: < 8 cm
- médio: 8 a 10 cm
- grande: > 10 cm

Característica 17. Fruto: relação diâmetro longitudinal/diâmetro transversal

Considerar:

- muito pequena: <0,9
- pequena: 0,9-1,2
- média: 1,2 – 1,5
- grande: 1,5-1.8
- muito grande: > 1,8

Característica 18. Fruto: forma



Característica 21. Fruto: peso médio (com polinização natural)

Considerar:

- baixo: < 150 gramas
- médio: 150 a 250 gramas
- alto: > 250 gramas

Característica 22. Fruto: espessura da casca

Considerar:

- fina: < 0,6 cm
- média: 0,6 a 1,0 cm
- espessa: > 1,0 cm

Característica 24. Teor de Sólidos Solúveis (°BRIX)

Medir com refratômetro e considerar:

- baixo: < 10°Brix

- médio: 10 a 13° Brix
- alto: > 13° Brix

Característica 25. Fruto: número de sementes (com polinização natural)

Considerar:

- pequeno: < 200
- médio: 200 a 400
- grande: > 400

## VII. REFERÊNCIAS

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). *Revista Brasileira Fruticultura*, Jaboticabal, v.30, n. 2, p. 566-576, 2008.

BRÜCKNER, C.H.; MELETTI, L.M.M.; OTONI, W.C.; ZERBINI JUNIOR, F.M. Maracujazeiro. In: BRÜCKNER, C.H. (editor) *Melhoramento de Fruteiras Tropicais*. Viçosa, MG: UFV, il., 2002. p.373-409, ISBN 85-7269-144-8

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. 670p. il. ISBN 85-7075-029-3

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Maracujá: demandas para a pesquisa. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2006. 54p. il. ISBN 85-7075-031-5

MELETTI, L. M. M. *Propagação de Frutíferas Tropicais*. Guaíba: Agropecuária, 2000. 239 p.

MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C. Caracterização Fenotípica de três seleções de maracujazeiro-roxo (*Passiflora edulis* Sims). *Revista Brasileira Fruticultura*, Jaboticabal, v.27, n. 2, p. 268-272, 2005.

Publicado no DOU Nº 246, de 18/12/2008, seção 01, páginas 49 e 50.

**ANEXO B. INSTRUÇÕES PARA EXECUÇÃO DOS ENSAIOS DE DISTINGUIBILIDADE, HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE DE CULTIVARES DE MARACUJÁ DAS ESPÉCIES *Passiflora alata* Curtis; *Passiflora amethystina* J.C.Mikan; *Passiflora caerulea* L.; *Passiflora cincinnata* Mast.; *Passiflora coccinea* Aubl.; *Passiflora foetida* L.; *Passiflora gardneri* Mast.; *Passiflora ligularis* Juss.; *Passiflora mucronata* Lam.; *Passiflora nitida* Bonpl. ex Kunth; *Passiflora quadrangularis* L.; *Passiflora setacea* DC.; *Passiflora tenuifila* Killip e *Passiflora tripartita* (Juss.) Poir. (abrangendo cultivares ornamentais, medicinais, frutíferas e híbridos interespecíficos)**

**I. OBJETIVO**

Estas instruções visam estabelecer diretrizes para as avaliações de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) uniformizando o procedimento técnico de comprovação de que a cultivar apresentada é distinta de outra(s) cujos descritores sejam conhecidos, que seja homogênea quanto às suas características em cada ciclo reprodutivo e estável quanto à repetição das mesmas características ao longo de gerações sucessivas. Aplicam-se às cultivares ornamentais, medicinais, frutíferas e híbridos interespecíficos de MARACUJÁ das espécies *Passiflora alata* Curtis; *Passiflora amethystina* J.C.Mikan; *Passiflora caerulea* L.; *Passiflora cincinnata* Mast.; *Passiflora coccinea* Aubl.; *Passiflora foetida* L.; *Passiflora gardneri* Mast.; *Passiflora ligularis* Juss.; *Passiflora mucronata* Lam.; *Passiflora nitida* Bonpl. ex Kunth; *Passiflora quadrangularis* L.; *Passiflora setacea* DC.; *Passiflora tenuifila* Killip e *Passiflora tripartita* (Juss.) Poir.

**II. AMOSTRA VIVA**

1. Para atender ao disposto no art. 22 e seu parágrafo único da Lei 9.456 de 25 de abril de 1997, o requerente do pedido de proteção obrigará-se a disponibilizar ao SNPC, no mínimo 5 plantas, propagadas vegetativamente, ou 800 sementes viáveis, por ocasião do pedido de proteção.
2. As plantas devem estar vigorosas e em boas condições sanitárias.
3. As plantas não deverão ter sido submetidas a nenhum tipo de tratamento que possa influenciar na manifestação de características da cultivar que sejam relevantes para o exame de DHE, a menos que autorizado ou recomendado pelo SNPC. Em caso de tratamento já realizado, o mesmo deve ser informado com detalhes e justificativas ao SNPC.
4. As plantas devem ser obtidas, preferencialmente, de estacas. Caso seja utilizado outro método de propagação, este deverá ser especificado.
5. A amostra deverá ser disponibilizada ao SNPC após a obtenção do Certificado de Proteção. Entretanto, sempre que durante a análise do pedido for necessária a apresentação da amostra para confirmação de informações, o solicitante deverá disponibilizá-la.

### III. EXECUÇÃO DOS ENSAIOS DE DISTINGUIBILIDADE, HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE-DHE

1. Os testes deverão ser conduzidos por no mínimo dois ciclos de produção significativos independentes. No Brasil, os ensaios deverão ser iniciados com o plantio no período de setembro a novembro e as plantas acompanhadas até pelo menos o seu primeiro pico de safra.
2. Os ensaios deverão ser conduzidos em um único local. Caso neste local não seja possível a visualização de todas as características da cultivar, a mesma poderá ser avaliada em um local adicional.
3. Os ensaios de campo deverão ser conduzidos em condições que assegurem o desenvolvimento normal das plantas.
4. Cada teste deve incluir no mínimo 12 plantas úteis. Podem ser usadas parcelas separadas para avaliações, desde que estejam em condições ambientais similares.
5. A menos que seja indicado outro modo, as observações devem ser feitas em 12 plantas ou partes tiradas de cada uma das 12 plantas.
6. Testes adicionais para a avaliação de características relevantes poderão ser estabelecidos.

### IV. LEGENDA DA TABELA DE DESCRITORES

1. As características contendo a classificação (a), (b), (c), (d), (#) ou (+) na primeira coluna da Tabela de Características, deverão ser examinadas como indicado no item VI (Observações e Figuras).
2. Considerar para as características contendo a classificação QL, QN ou PQ na primeira coluna da Tabela de Características:  
QL: Característica qualitativa  
QN: Característica quantitativa  
PQ: Característica pseudo-qualitativa

## V. TABELA DE CARACTERÍSTICAS DE MARACUJÁ

Espécie:

Nome proposto para a cultivar:

Híbrido interespecífico: (citar as espécies)

Informar altitude e latitude do local dos testes de DHE:

Característica	Identificação da característica	Código de cada descrição	Cultivares-exemplo	Código da cultivar
1. Ramo: coloração PQ (a)	verde-clara	1		
	verde-escura	2		
	verde-arroxeadada	3		
	roxa	4		
2. Limbo foliar: forma PQ (b) (+)	lanceolada	1		
	ovada	2		
	cordata	3		
	oblonga	4		
	elíptica	5		
	fendida	6		
	partida	7		
	seccionada	8		
3. Limbo foliar: divisão QL (b)	simples	1		
	bilobada	2		
	trilobada	3		
	pentalobada	4		
	heptalobada	5		
4. Limbo foliar: comprimento QN (b) (+)	curto	3		
	médio	5		
	longo	7		
5. Limbo foliar: largura máxima QN (b) (+)	estreita	3		
	média	5		
	larga	7		
6. Limbo foliar: sinus QL (b)	ausente	1		
	presente	2		
7. Limbo foliar: profundidade do sinus QN (b) (+)	rasa	3		
	média	5		
	profunda	7		
8. Limbo foliar: bulado QL (b)	ausente	1		
	presente	2		
9. Limbo foliar: pilosidade QL (b)	ausente	1		
	presente	2		

10. Pecíolo: comprimento QN (b) (+)	curto médio longo	3 5 7		
11. Pecíolo: posição das glândulas (nectários) QL (b)	adjacentes ao limbo foliar próximos ao meio do pecíolo adjacentes à inserção da folha no ramo distribuídos ao longo do pecíolo	1 2 3 4		
12. Flor: forma do hipanto QL (c) (+)	aplanada campanulada cilíndrica	1 2 3		
13. Flor: coloração predominante no perianto (sépalas e pétalas, internamente) PQ (c) (#)	branca rosada vermelha vermelha arroxeadada roxa azul-arroxeadada azul	1 2 3 4 5 6 7		
14. Flor: período predominante de antese das flores QN (c)	matutino vespertino noturno	1 2 3		
15. Flor: comprimento da bráctea QN (c) (+)	curto médio longo	3 5 7		
16. Flor: comprimento da sépala QN (c) (+)	curto médio longo	3 5 7		
17. Flor: largura da sépala QN (c) (+)	estreita média larga	3 5 7		
18. Flor: comprimento da pétala QN (c) (+)	curto médio longo	3 5 7		
19. Flor: diâmetro da coroa QN (c) (+)	pequeno médio grande	3 5 7		

20. Flor: coloração predominante da coroa PQ (c)	branca rosada vermelha vermelha-arroxeadada roxa azul-arroxeadada azul	1 2 3 4 5 6 7		
21. Flor: bandeamento (anéis de cores diferentes entre si, inclusive brancos) nos filamentos mais longos da coroa QN (c) (#) (+)	ausente presente	1 2		
22. Flor: número de anéis coloridos (excluídos os brancos) nos filamentos mais longos da coroa QL (c)	um mais de um	1 2		
23. Flor: filamentos mais longos da coroa QL (c)	lisos ondulados	1 2		
24. Fruto: forma PQ (d) (#) (+)	ovalada oblonga arredondada oblata elipsóide fusiforme oboval piriforme	1 2 3 4 5 6 7 8		
25. Fruto: diâmetro longitudinal QN (d) (+)	pequeno médio grande	3 5 7		
26. Fruto: diâmetro transversal QN (d) (+)	pequeno médio grande	3 5 7		
27. Fruto: coloração predominante da casca (epiderme) PQ (d) (#)	verde amarela laranja rosada vermelha roxa	1 2 3 4 5 6		

28. Fruto: lenticelas distribuídas em padrão de estrias QL (d)	ausente presente	1 2		
29. Fruto: espessura da casca QN (d) (+)	muito fina fina média espessa muito espessa	1 2 3 4 5		
30. Fruto: tamanho da semente QN (d) (+)	pequeno médio grande	3 5 7		
31. Fruto: coloração da polpa PQ (d)	esbranquiçada amarelo-esverdeada amarela amarelo-alaranjada alaranjada alaranjada-escura vermelha	1 2 3 4 5 6 7		
32. Fruto: teor de sólidos solúveis totais QN (d) (+)	muito baixo baixo médio alto muito alto	1 2 3 4 5		
33. Fruto: número de sementes, com polinização natural QN (d) (+)	muito pequeno pequeno médio grande muito grande	1 3 5 7 9		

## VI. OBSERVAÇÕES E FIGURAS

1.As características contendo as letras a seguir na primeira coluna da tabela de características devem ser examinadas como o indicado abaixo:

(a) Ramo: avaliar ramos vigorosos, resultantes da brotação primaveril (ramos jovens, do ano, ainda não totalmente lignificados).

(b) Limbo foliar e pecíolo: avaliar em folhas completamente desenvolvidas (basais), no terço médio do ramo, durante a estação de crescimento.

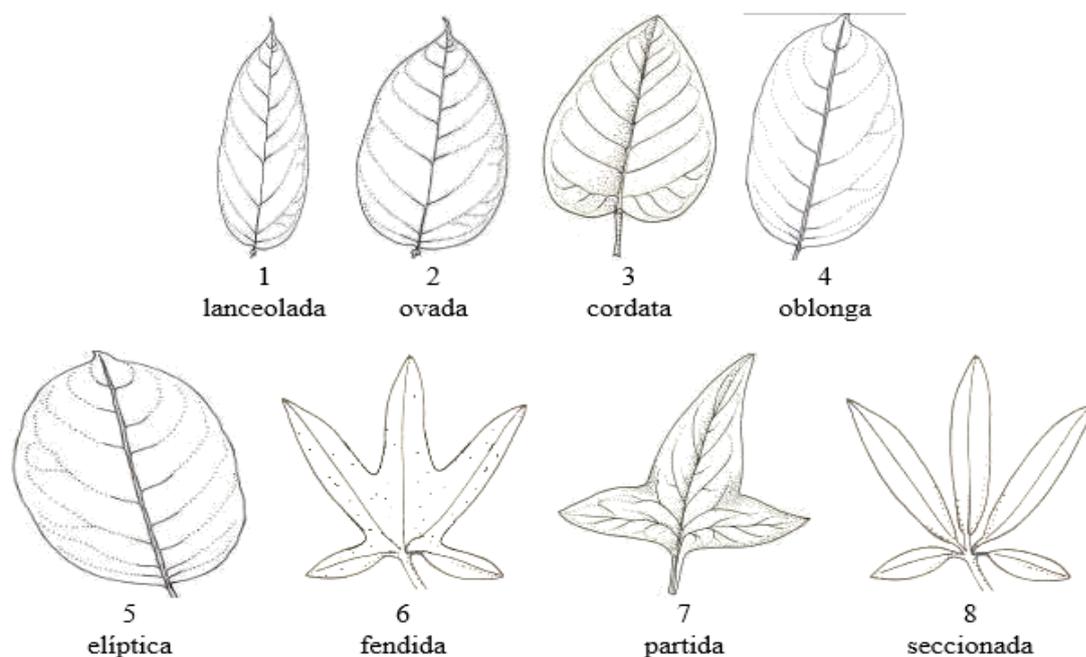
(c) Flor: avaliar em flores completamente abertas (antese completa), sem defeitos resultantes de ataques de pragas ou intempéries climáticas.

(d) Fruto: avaliar em frutos característicos da cultivar, colhidos em pico de safra, em igual estágio de maturação, próximos ao ponto ideal de consumo.

2. Para as características contendo a indicação (#) na primeira coluna da Tabela de Características, apresentar fotografias ilustrativas com resolução de pelo menos 300 dpi.

3. As características contendo a indicação (+) na primeira coluna da Tabela de Características, deverão ser examinadas conforme as orientações ou figuras a seguir:

Característica 2: Limbo foliar: forma



Característica 4. Limbo foliar: comprimento

Considerar:

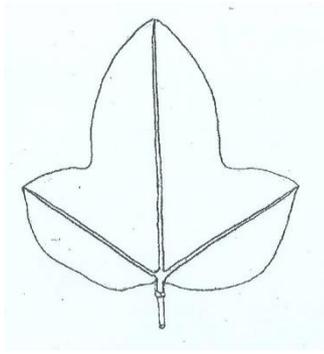
- curto: < 8 cm
- médio: 8-15 cm
- longo: > 15 cm

Característica 5. Limbo foliar: largura máxima

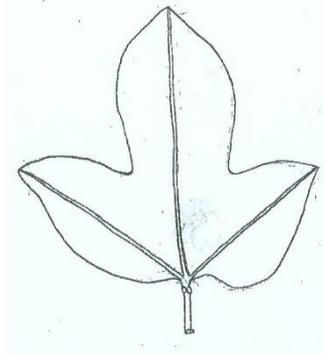
Considerar:

- estreita: < 8 cm
- média: 8-15 cm
- larga: > 15 cm

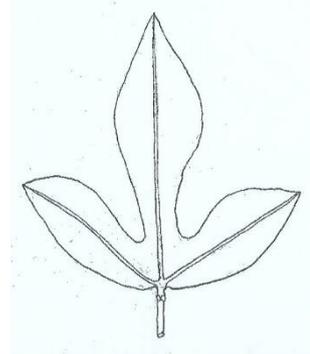
Característica 7. Limbo foliar: profundidade dos sinus



3  
Rasa



5  
Média



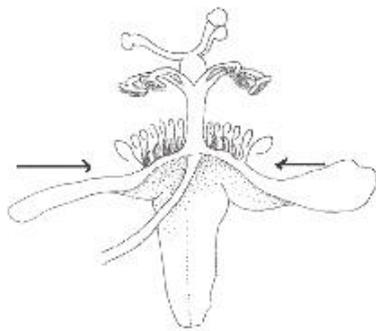
7  
profunda

Característica 10. Pecíolo: comprimento

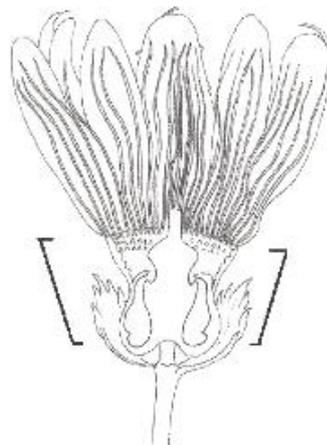
Considerar:

- curto: < 2 cm
- médio: 2-4 cm
- longo: > 4 cm

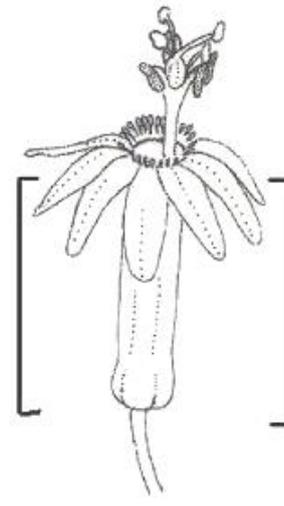
Característica 12. Flor: forma do hipanto



1  
aplanada



2  
campanulada



3  
Cilíndrica

Características 15 a 18. Flor: comprimento da bráctea, comprimento da sépala, largura da sépala e comprimento da pétala

15. Flor: comprimento da bráctea

Considerar:

- curto: < 2 cm
- médio: 2-4 cm
- longo: > 4 cm

16. Flor: comprimento da sépala

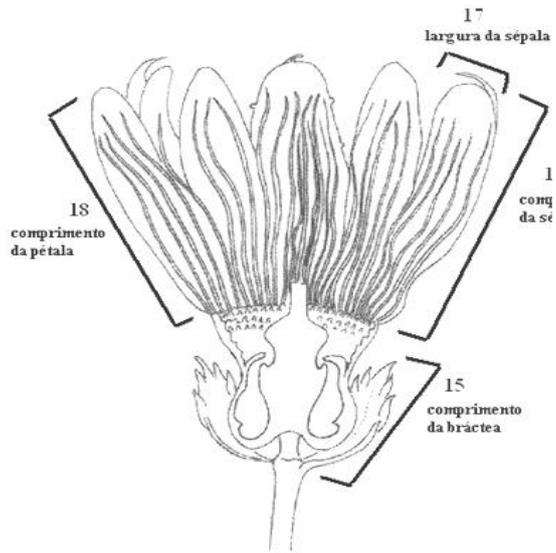
Considerar:

- curto: < 3 cm
- médio: 3-6 cm
- longo: > 6 cm

17. Flor: largura da sépala

Considerar:

- estreita: < 1 cm
- média: 1-2 cm
- larga: > 2 cm



18. Flor: comprimento da pétala

Considerar:

- curto: < 3 cm
- médio: 3-6 cm
- longo: > 6 cm

Características 19 e 21. Flor: diâmetro da coroa e bandeamento nos filamentos mais longos da coroa

19. Flor: diâmetro da coroa

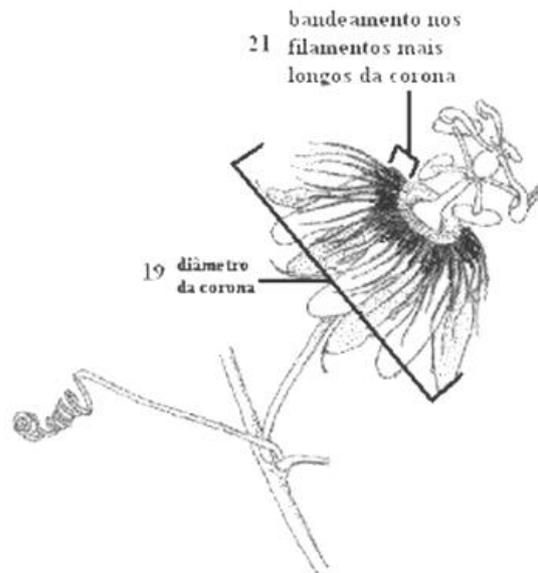
Considerar:

- pequeno: < 5 cm
- médio: 5-10 cm
- grande: > 10 cm

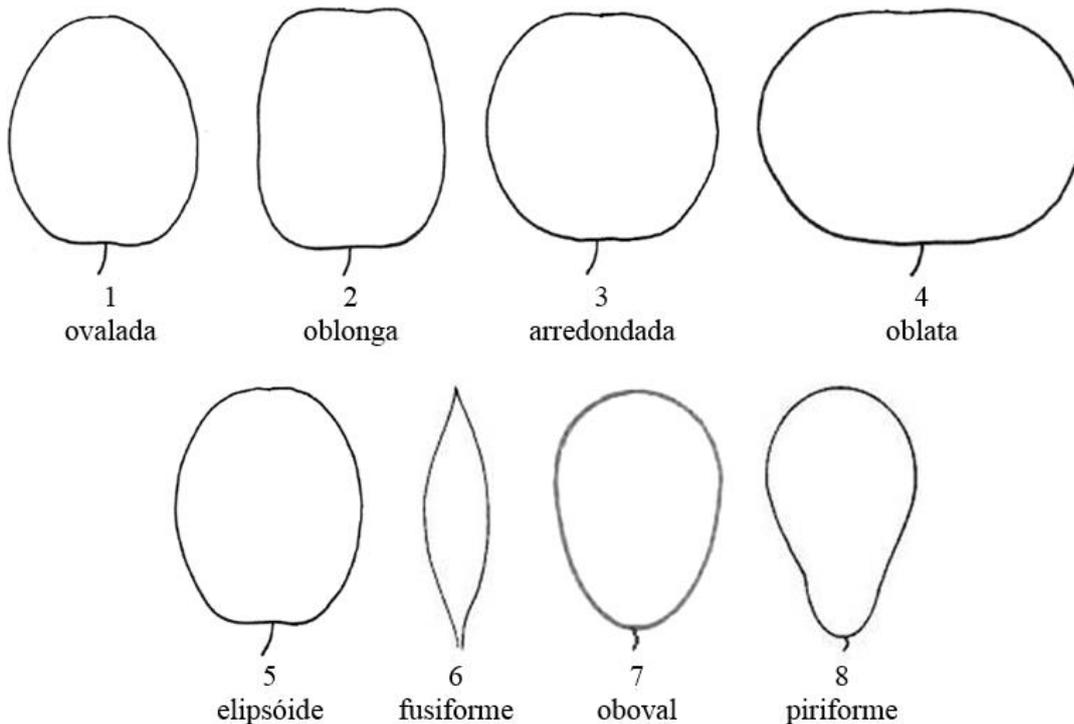
21. Flor: bandeamento nos filamentos mais longos da coroa

Considerar:

- ausente
- presente



Característica 24. Fruto: forma



Característica 25. Fruto: diâmetro longitudinal

Considerar:

- pequeno: < 5 cm
- médio: 5-15 cm
- grande: > 15 cm

Característica 26. Fruto: diâmetro transversal

Considerar:

- pequeno: < 5 cm
- médio: 5-15 cm
- grande: > 15 cm

Característica 29. Fruto: espessura da casca

Considerar:

- muito fina: < 0,3 cm
- fina: < 0,3-0,6 cm
- média: 0,6 a 1,0 cm
- espessa: >1,0-1,5 cm
- muito espessa: > 1,5 cm

Característica 30. Fruto: tamanho da semente

Considerar:

- pequeno: < 0,3 cm
- médio: 0,3-0,7 cm
- grande: < 0,7 cm

Característica 32. Fruto: teor de sólidos solúveis totais

Considerar:

- muito baixo: < 7°Brix
- baixo: 7- 10° Brix
- médio: >10 a 13°Brix
- alto: > 13°-17°Brix
- muito alto: > 17°Brix

Característica 33. Fruto: número de sementes, com polinização natural

Considerar:

- muito pequeno: <50
- pequeno: 50-100
- médio: >100-200
- grande: > 200-400
- muito grande: >400

## VII. REFERÊNCIAS

- BERNACCI, L.C.; VITTA, F.A. & BAKKER, Y.V. Passifloraceae. In WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; GIULIETTI, A.M. & MELHEM, T.S. (Coord.). *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. v. 3. São Paulo: FAPESP/Rima, 2003, p.247-274.
- CERVI, A.C. Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. *FontQuerria*, Madrid, v.45, p. 1-92. 1997.
- DEGINANI, N.B. Las especies argentinas del género *Passiflora* (*Passifloraceae*). *Darwiniana*, San Isidro, v.39, n. 1-2, p.43-129. 2001.
- ESCOBAR, L. Passifloraceae: *Passiflora* subgéneros *Tacsonia*, *Rathea*, *Manicata* & *Distephana*. In PINTO, P. & LOZANO, G. *Flora de Colombia*, v. 10. Bogotá: Instituto de Ciências Naturales/Universidad Nacional de Colombia, 1998, p. 1-138.
- FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados , 2005.670p. il. ISBN85-7075-029-3
- FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Maracujá: demandas para a pesquisa. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. 54p. il. ISBN 85-7075-031-5
- HOLM-NIELSEN, L.B. JORGENSEN, P.M. & LAWESSON, J.E. 126-*Passifloraceae*. In HARLING, G. & ANDERSON, L. *Flora of Ecuador*, v.31. Copenhagen: Nordic Journal of Botany, 1988, p.1-131.
- MELETTI, L.M.M. Propagação de Frutíferas Tropicais. Guaíba: Agropecuária, 2000. 239 p.
- MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; PINTO-MAGLIO, C.A.; MARTINS, F.P. Caracterização de germoplasma de maracujazeiro (*Passiflora* spp). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v.14, n.2, p.157-162. 1994.
- MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A. & BAUMGRATZ, J.F.A. *Passiflora* L.: subgênero *Decaloba* (DC.) Rchb (*Passifloraceae*) na região sudeste do Brasil: *Rodriguésia*, Rio de Janeiro, v. 55, n.85, p. 17-54. 2004.
- NUNES, T.S. & QUEIROZ, L.P. Flora da Bahia: *Passifloraceae*. *Sitientibus*, Série Ciências Biológicas, Feira de Santana, v.6, n.3, p. 194-226. 2006.
- SACCO, J.C. Passifloráceas. In REITZ, R. (ed.) *Flora Ilustrada Catarinense*, parte 1, fasc. Pass. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1980, 132p.
- SOUZA, J. S. I. & MELETTI, L. M. M. *Maracujá: espécies, variedades e cultivo*. Piracicaba: FEALQ, 1997. 179 p.
- ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. & ULMER, B. *Passiflora: passionflowers of the World*. Portland: Timber Press, 2004. 430p.
- VANDERPLANK, J. *Passion flowers*. 3rd ed. Cambridge: MIT, 2000. 224p.

## OBSERVAÇÃO

Com base nos resultados desta tese, as INSTRUÇÕES PARA EXECUÇÃO DOS ENSAIOS DE DISTINGUIBILIDADE, HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE DE CULTIVARES DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis* Sims) e (*Passiflora* L. e híbridos interespecíficos) relatadas acima foram revisadas e aperfeiçoadas gerando novas Instruções publicadas no DOU nº 97, de 23/05/2016, seção 01, páginas 6 e 7 e disponíveis na home page do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA: ([http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/protecao-de-cultivar/frutiferas/maracuja\\_formulario\\_23mai2016\\_passiflora-edulis\\_p](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/protecao-de-cultivar/frutiferas/maracuja_formulario_23mai2016_passiflora-edulis_p)) para *Passiflora edulis* Sims e publicadas no DOU nº 97, de 23/05/2016, seção 01, páginas 4 a 6, disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/protecao-de-cultivar/frutiferas/maracuja\\_formulario\\_23mai2016\\_passiflora\\_p](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/protecao-de-cultivar/frutiferas/maracuja_formulario_23mai2016_passiflora_p) para *Passiflora* L. e híbridos interespecíficos.