

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

MARACUJAZEIROS COMERCIAIS E SILVESTRES: NEMATÓIDES ASSOCIADOS E
VARIABILIDADE GENÉTICA COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES E
NA RESISTÊNCIA A *MELOIDOGYNE INCOGNITA*.

ANA PAULA GOMES DE CASTRO

Brasília-DF

2008

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

MARACUJAZEIROS COMERCIAIS E SILVESTRES: NEMATÓIDES ASSOCIADOS E VARIABILIDADE GENÉTICA COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES E NA RESISTÊNCIA A *MELOIDOGYNE INCOGNITA*.

ANA PAULA GOMES DE CASTRO

Dissertação apresentada ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

Brasília-DF

2008

Trabalho executado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília e da Embrapa Cerrados, sob orientação do Professor Juvenil Enrique Cares, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES.

MARACUJAZEIROS COMERCIAIS E SILVESTRES: NEMATÓIDES ASSOCIADOS E VARIABILIDADE GENÉTICA COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES E NA RESISTÊNCIA A *MELOIDOGYNE INCOGNITA*.

ANA PAULA GOMES DE CASTRO

Dissertação aprovada em 25/08/2008 por:

Fábio Gelape Faleiro, Doutor (Embrapa Cerrados).
Examinador

Prof. Jean Kleber Abreu Mattos, Doutor
Examinador

Professor. Juvenil Enrique Cares, Ph.D.
Orientador

Ao Deus Pai, Meu Tudo.
À minha Avó, Dalva Gomes dos Santos, minha Maior Estrela.
À minha Mãe, Dalva Gomes de Castro, minha Estrela Guia.
Ao meu Pai, Osvaldo Miranda de Castro, minha Força.
Aos meus Tios Binho e Gilson (*in memoriam*), minha inspiração.
Aos meus Sobrinhos, minhas paixões.
Dedico

AGRADECIMENTOS

A DEUS, presença viva em todos os momentos da minha vida, que a cada dia proporciona-me sonhar....., concedendo-me a graça de realizá-los.

Ao meu orientador e amigo, Professor Juvenil E. Cares pela atenção, paciência, confiança, respeito, profissionalismo e pelos ensinamentos valiosos, críticas construtivas durante todas as etapas deste trabalho.

Ao Dr. Fábio Gelape Faleiro, quem teve grande participação no decorrer de todo o trabalho, por todos os ensinamentos, disponibilidade, atenção, paciência, profissionalismo e principalmente simplicidade.

Ao Dr. Alexandre Moura Cintra Goulart, pela amizade, disponibilidade, ensinamentos, incentivo, profissionalismo, paciência e atenção.

Ao Dr. Nilton Junqueira pelas sugestões e ensinamentos.

A Emanuelita Cavalcante, pela amizade, ensinamentos, paciência e por ter contribuído para realização deste trabalho do primeiro ao último dia.....

A Embrapa Cerrado pela utilização dos laboratórios de biologia molecular e nematologia.

A grande AMIGA Ednalva Patrícia de Andrade, por todas as vezes que se dispôs a ajudar-me na realização de todo o trabalho bem como pelo seu carinho, paciência, cumplicidade, conselhos, companhia e principalmente por sua sincera amizade.

Aos queridos Professores da UFRRJ, João Pedro Pimentel e Helena Guglielmi Montano por terem acreditado em mim.

A incondicional amiga Jackeline Silva Mendes, pela sua presença constante em muitos momentos da minha vida.

A amiga Carmen Bruno, Nematologista da Souza Cruz, por ter ensinado-me os primeiros passos no aprendizado com os nematóides.

Ao Geraldo Henrique, pesquisador da Souza Cruz, pelo primeiro contato com a Fitopatologia.

A amiga Mônica Gouvêa Malheiros, que mesmo tão longe, está tão perto torcendo por mim.

A Mariana da Silva Paula por todo o material concedido.

A Loiselene Trindade da EMATER-DF pela ajuda na realização do levantamento nematológico.

A amiga Rita de Cássia pela amizade.

Ao Milton P. Lima pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao Amigo Daniel Diego por todas as ajudas na reta final do trabalho.

A amiga Michelle Souza Fayad por todas as ajudas, ensinamentos e principalmente conselhos.

A amiga Janaina pela cumplicidade dos bons e maus momentos vividos nessa fase da vida.

Ao Amigo Eder Marques por todos os bons momentos compartilhados.

A amiga Silvia Aranha, pelo carinho e grande amizade.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia pelos ensinamentos.

Ao Professor Carlos Inácio por todas as vezes que ficou no laboratório para fazer-me companhia.

A Dr^a Regina Carneiro da Embrapa Cenargem, pela valiosa ajuda.

A todos os amigos da Fitopatologia, Magno Filho, Patrícia, Eliane Terumi, Jaqueline Dutra, Leonardo Lopes, Sarah, Jansen, Keize Junqueira, Marcos Freitas e Zuleide.

A amiga Denise Camargo pela amizade.

Aos funcionários da Embrapa Cerrados, Nathália, Dani, João, Valdeci e Paixão pela amizade.

Aos amigos que fiz na Embrapa Cerrados, Helena, Carla, Francielle, Carol, Angélica, em especial a Kenia, Erivanda, Graciele Bellon e Ariane pela amizade e companheirismo.

Aos funcionários do laboratório, em especial César Castro e Kamila Pereira pela amizade e colaboração.

Aos funcionários da Estação Biológica, em especial ao Sr. Fábio por tamanha ajuda com os experimentos.

Agradeço também a todos aqueles que não mencionei, mas que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Finalmente, agradeço a Deus pela minha família: alicerce seguro sobre o qual eu tenho edificado cada etapa de meu desenvolvimento como ser humano. Meus pais, Dalva Gomes de Castro e Osvaldo Miranda de Castro, com seu amor incondicional, que representa o meu maior estímulo para minha constante jornada. A minha AMADA avó Dalva Gomes dos Santos, por ser a minha fortaleza, alegria, motivação e vida. Aos meus sobrinhos que buscam em mim um exemplo. A tia Zilda, tia Nilza, tio Binho, tia Solange, tio Gilson, pelo carinho.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE QUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMO GERAL	xi
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1 (REVISÃO BIBLIOGRÁFICA)	3
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO 2 (OCORRÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DE NEMATÓIDES FITOPARASITAS.NA CULTURA DO MARACUJAZEIRO EM PLANTIOS COMERCIAIS DO DISTRITO FEDERAL E EM CERRADO NATIVO ADJACENTE).....	25
RESUMO.....	25
ABSTRACT.....	26
INTRODUÇÃO.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
RESULTADOS	31
DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÕES.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
CAPÍTULO 3 (VARIABILIDADE GENÉTICA DE MARACUJAZEIROS OBTIDOS EM PLANTAÇÕES COMERCIAIS DO DISTRITO FEDERAL COM BASE EM MARCADORES RAPD).....	40
RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	41
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
RESULTADOS	46
DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
CAPÍTULO 4 (RESISTÊNCIA DE ACESSOS COMERCIAIS E SILVESTRES DE <i>PASSIFLORA A MELOIDOGYNE INCOGNITA</i> EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO).....	54
RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	55
INTRODUÇÃO.....	56
MATERIAL E MÉTODOS.....	57
RESULTADOS	60
DISCUSSÃO.....	64
CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
POEMA.....	70

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Abundância dos gêneros de nematóides em plantios de maracujazeiros e em cerrado nativo do DF.....32

Tabela 2.2 - Número de exemplares de nematóides extraídos de amostras coletadas em áreas de plantios de maracujazeiro e de cerrado nativo, em diferentes localidades do Distrito Federal.....34

Tabela 3.1 - “*Primers*” utilizados para obtenção dos marcadores RAPD.....46

Tabela 4.1 - Valores de comprimento da parte aérea (cm), diâmetro (cm) e número de folhas de plantas de *Passiflora* inoculadas com *Meloidogyne incognita* e de plantas não inoculadas.....61

Tabela 4.2 - Valores de peso fresco da parte aérea, peso seco da parte aérea e peso fresco de raiz de passiflora spp. inoculadas com *Meloidogyne incognita* e de plantas não inoculadas.....62

Tabela 4.3 - Reação de nove genótipos de maracujazeiro a *Meloidogyne incognita* após 62 dias da inoculação em casa de vegetação.....63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Localidades onde foram coletadas as amostras de solo e de raízes29

Figura 2.2 - Localidades (propriedades) onde foram coletadas amostras de solo e raízes em plantios comerciais.....29

Figura 2.3 - Áreas nativas de cerrado, onde amostras de solo foram coletadas.....30

Figura 3.1 - Pontos de coleta de acessos de maracujazeiros em plantações comerciais no Distrito Federal.....45

Figura 3.2 - Análise de agrupamentos de 30 acessos de maracujazeiros.....47

Figura 3.3 - Dispersão gráfica de 30 acessos de maracujazeiro.....48

Figura 4.1 - Galhas causadas por *Meloidogyne incognita* em *Passiflora capsularis*; impressão perineal; gel de eletroforese evidenciando o perfil de esterase do nematóide.....58

Figura 4.2 - Momento da inoculação dos nematóides; avaliação das plantas em casa de vegetação.....59

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 4.1	-	Genótipos de <i>Passiflora</i> avaliados.....	58
-------------------	---	---	----

MARACUJAZEIROS COMERCIAIS E SILVESTRES: NEMATÓIDES ASSOCIADOS E VARIABILIDADE GENÉTICA COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES E NA RESISTÊNCIA A *MELOIDOGYNE INCOGNITA*.

RESUMO GERAL

O Brasil tem se destacado na produção de maracujá, entretanto, a produtividade média está abaixo do potencial da cultura. Um dos motivos da baixa produtividade são os problemas fitossanitários, inclusive aqueles causados por nematóides, que comprometem a produção e qualidade dos frutos. Mesmo sabendo da importância dos nematóides para essa cultura, não se sabe a real dimensão desses problemas por carência de informações de campo, como é o caso Distrito Federal em que o último levantamento de nematóides fitoparasitas em maracujazeiros ocorreu há uma década. Diante das dificuldades de controle de doenças nessa cultura, a exploração da grande diversidade genética de *Passiflora* em busca de resistência varietal é o que há de mais promissor na solução dos problemas fitossanitários do maracujazeiro. Em decorrência disso, objetivou-se neste trabalho avaliar a ocorrência e a distribuição de nematóides fitoparasitas em plantios comerciais de maracujazeiro e em áreas de vegetação nativa no Distrito Federal; caracterizar a variabilidade genética desses acessos comerciais com base em marcadores moleculares RAPD; avaliar a reação de acessos comerciais e silvestres de maracujazeiros a uma população do nematóide *Meloidogyne incognita*.

Amostras de solo e de raízes foram coletadas em áreas plantadas com maracujazeiro e em áreas adjacentes de vegetação nativa de Cerrado, em cinco diferentes núcleos rurais do Distrito Federal (Gama, Lago Oeste, Brazlândia, Pípiripau e Paranoá), em 14 propriedades, no período de julho de 2007 a janeiro de 2008. Foram coletadas 20 amostras compostas em áreas plantadas com maracujazeiro e cinco em áreas de Cerrado nativo. Foram encontrados nove gêneros de nematóides fitoparasitas (*Meloidogyne*, *Helicotylenchus*, *Rotylenchulus*, *Scutellonema*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Hemicycliophora*, *Xiphinema* e *Criconemoides*) e cinco de micófagos (*Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Tylenchus*, *Coslenchus* e *Ditylenchus*) nas amostras coletadas em plantios comerciais de maracujazeiro e em Cerrado nativo. No presente trabalho, foram verificados altos níveis populacionais de nematóides fitoparasitas associados à cultura do maracujazeiro no DF, como *Rotylenchulus reniformis* e *Meloidogyne* spp. O número total de nematóides fitoparasitas por amostra foi

consideravelmente maior em plantios de maracujazeiro, indicando que a monocultura favoreceu esses nematóides. Estima-se que algumas das espécies de nematóides encontradas possam estar envolvidas na redução do crescimento das plantas com conseqüente reflexo na queda da produção de maracujá.

Para avaliar a variabilidade genética dos acessos comerciais de maracujazeiros, foram coletadas folhas de 24 acessos de maracujazeiro-azedo representando plantações comerciais de 14 propriedades do DF. Também foram analisados três híbridos de maracujazeiro-azedo, recentemente lançados pela Embrapa Cerrados (BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro Vermelho e BRS Gigante Amarelo), dois acessos de maracujazeiro-doce, utilizados como *outgroup* e um acesso maracujazeiro-azedo obtido no comércio local. O DNA genômico foi extraído utilizando o método do CTAB, com modificações. Amostras de DNA de cada acesso foram amplificadas pela técnica de RAPD. Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre os diferentes acessos. A análise de agrupamento realizada com base nas distâncias genéticas permitiu a separação dos dois acessos de maracujazeiro-doce (*outgroup*) e a formação de vários grupos de acessos, evidenciando a variabilidade genética entre os mesmos. O posicionamento gráfico do híbrido BRS Ouro Vermelho confirma a maior contribuição deste material para a variabilidade genética dos materiais comerciais de maracujazeiro-azedo. A dispersão dos demais acessos evidencia as diferentes origens genéticas dos materiais utilizados pelos produtores de maracujá do Distrito Federal.

Para avaliar a resistência de acessos comerciais e silvestres de maracujazeiro a uma população de nematóide de galhas, nove materiais genéticos foram analisados, sendo três espécies silvestres (*P. capsularis*, *P. setacea* e *P. nitida*), dois acessos de maracujá doce (*P. alata*), três híbridos comerciais recentemente lançados pela Embrapa Cerrados e parceiros (BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro vermelho e BRS Gigante Amarelo) e um acesso de maracujazeiro azedo obtido no comércio local. O inóculo de *Meloidogyne incognita* proveniente do município de Santos Dumont (MG) foi multiplicado em plantas de tomate cv. Santa Clara em casa-de-vegetação. Plantas de maracujazeiro foram inoculadas com *M. incognita*, utilizando-se aproximadamente 2.200 ovos/juvenis por planta. O delineamento foi o inteiramente casualizado com 10 repetições. Cada genótipo de maracujazeiro teve 10 plantas inoculadas e quatro não inoculadas que serviram de controle. As plantas foram mantidas em casa de vegetação sob temperatura de 18 a 29 °C e umidade, de 30 a 90%. Aos 62 dias após a inoculação foram avaliados, o comprimento da parte aérea, o número de

folhas, o diâmetro do caule, o peso fresco da parte aérea, o peso seco da parte aérea, o peso fresco da raiz, o número de galhas/planta, o número de massas de ovos/planta, o número de ovos/massa de ovos, o número total de nematóides no solo e nas raízes e o fator de reprodução. Todos os genótipos se comportaram como resistentes com base no fator de reprodução, embora existam diferenças entre os genótipos com base em outras características relacionadas à resistência.

Com base nos marcadores moleculares RAPD e na resistência a *M. incognita* foi possível analisar e quantificar a variabilidade genética entre os acessos comerciais e silvestres. Este resultado subsidia futuros trabalhos de seleção de acessos comerciais e silvestres, com importantes genes relacionados à produtividade, adaptabilidade e resistência a doenças, valiosos para trabalhos de melhoramento genético.

Palavras-chave: marcador molecular, *Meloidogyne incognita*, *Passiflora*, resistência genética, nematóides, maracujá.

ABSTRACT

COMMERCIAL AND WILD PASSION FRUIT: NEMATODES ASSOCIATED, AND GENETIC VARIABILITY BASED ON MOLECULAR MARKERS AND RESISTANCE TO *MELOIDOGYNE INCOGNITA*.

Brazil is a world leader in passion fruit production, however, yield average is under potential levels of the fruit production. Phytosanitary constraints, including those caused by plant-parasitic nematodes are among the reasons for poor yield and fruit quality. Despite the importance of plant pathogens for passion fruit production, the exact dimension of crop losses is ignored due to lack of field information, as it occurs in the Brazilian Federal District (DF) where the last survey of plant-parasitic nematodes in soils planted with passion fruit occurred a decade ago. In front of the difficulties for disease control, the exploration of the wide genetic diversity among *Passiflora* spp. in search for plant disease resistance, seems to be the most promising approach for the control of passion fruit diseases. Therefore, the objectives of this work were: to evaluate the occurrence and distribution of plant-parasitic nematodes in fields planted with passion fruit, and in soils of corresponding areas of native vegetation in DF; to characterize the genetic variability in commercial accessions of passion fruit planted in DF, on the basis of molecular markers, RAPD; to evaluate host reaction of nine genotypes of *Passiflora* spp. to a population of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*.

Soil and root samples had been collected in areas planted with passion fruit, and in areas of corresponding native cerrado vegetation, of five different agricultural regions of DF (Gama, Lago Oeste, Brazlândia, Pipiripau and Paranoá), in 14 farms, from July, 2007 through January, 2008. Twenty composed soil and root samples from the rhizosphere of passion fruit, and five composed soil samples in corresponding areas of native vegetation had been collected. Nine genera of plant-parasitic nematodes (*Meloidogyne*, *Helicotylenchus*, *Rotylenchulus*, *Scutellonema*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Hemicycliophora*, *Xiphinema* and *Criconemoides*), and five of fungal feeder nematodes (*Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Tylenchus*, *Ditylenchus* and *Coslenchus*) were found in both land use systems. High population levels of important plant-parasitic nematodes as *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne* spp. were associated with passion fruit root system. The total number of plant-parasitic nematodes per sample was considerably higher in passion fruit fields, indicating that monocropping favored these nematodes. Therefore,

some of the nematode species recovered may be involved in the reduction of plant growth, and consequently with reflex on passion fruit yield.

To evaluate genetic variability of commercial accessions of passion fruit, leaves of 24 accessions of sour passion fruit had been collected in commercial plantations of 14 farms in DF. In addition, three hybrids of sour passion fruit (BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro Vermelho, and BRS Gigante Amarelo), recently released by Embrapa Cerrados and partners, one accession of sour passion fruit from the local market, and two accessions of sweet passion fruit (outgroup) had been analyzed. Genomic DNA had been extracted by CTAB method, with modifications. DNA samples of each accession had been amplified by RAPD technique. RAPD markers generated had been converted into a matrix of binary data, from which the genetic distances between the different accessions had been estimated. Clustering analysis based on the genetic distances allowed to separate the two sweet passion fruit accessions (outgroup), and to build-up various clusters of sour passion fruit accessions, supporting the wide range of genetic variability enclosed in these accessions. The graphical positioning of the hybrid BRS Ouro Vermelho confirms its major contribution for the genetic variability of the commercial accessions of sour passion fruit planted in the sampled areas. Dispersal of genetic distances among the commercial accessions of sour passion fruit supports the evidence that the materials planted by growers in DF came from different genetic origin.

To evaluate resistance of commercial and wild accessions of passion fruit, nine genotypes of *Passiflora* spp. including three wild species (*P. capsularis*, *P. setacea* and *P. nitida*), two of sweet passion fruit (*P. alata* (J) and *P. alata* (N)), three hybrids of sour passion fruit (BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro vermelho, and BRS Gigante amarelo), and a commercial accession from the local market were evaluated for host reaction to a population of *Meloidogyne incognita*. The inoculum from the municipality of Santos Dumont, MG. was multiplied in tomato plants cv. Santa Clara under green house. Plants of *Passiflora* spp. had been inoculated with 2,200 juveniles/eggs of per plant. A complete randomized design was applied. For each genotype 10 plantlets had been inoculated, and four other non-inoculated served as control. The plants had been kept under green house (temperature of 18 - 29 °C, and humidity of 30 - 90%). Sixty-two days after inoculation the assay was evaluated for, shoot length, number of leaves, diameter of stem, fresh shoot weight, dry shoot weight, fresh root weight, number of galls per root system, number of egg masses per root system, number of egg per egg mass, number of nematodes in soil pot, number of nematodes per root system, and the nematode factor of reproduction.

Based on RAPD markers, and resistance to *M. incognita*, it was possible to analyze and to quantify the genetic variability between accessions of wild and commercial passion fruit. Present results give support for further works to select genetic resources from commercial and wild background, with important genes related to fruit yield, adaptability and resistance the diseases, valuable for breeding programs.

Keywords: *Meloidogyne incognita*, molecular markers, *Passiflora*, resistance.

INTRODUÇÃO GERAL

A palavra maracujá é uma denominação indígena, de origem tupi que significa “alimento em forma de cuia”. O maracujazeiro também é conhecido como flor-da-paixão, nome popular pouco usual no Brasil que tem origem na correlação da morfologia da flor com os símbolos da paixão de Cristo (Souza & Meletti, 1997). Tal correlação é explicada por Frei Vicente (Hoehne, 1937) referindo-se, inicialmente, aos três estiletos/estigmas que representam a Santíssima Trindade e aos três cravos utilizados na crucificação de Jesus Cristo; os cinco filetes/estames representam as cinco chagas e a corona/verticilos, a coroa de espinhos de Jesus Cristo. As folhas, em forma de lança, segundo Frei Vicente, também estão relacionadas aos símbolos da Paixão de Cristo.

O maracujazeiro é uma planta tropical, com ampla diversidade genética, pertence à família Passifloraceae, abrangendo 18 gêneros e 630 espécies, sendo o gênero *Passiflora* o mais importante economicamente. O gênero *Passiflora* é composto de 22 subgêneros e 485 espécies, das quais 150 a 200 são originárias do Brasil e podem ser utilizadas como alimento, remédios e ornamento (Vanderplank, 2000).

No Brasil, o maracujazeiro-amarelo apresenta baixa produtividade, devido, em grande parte, a problemas fitossanitários, dos quais as doenças provocadas por patógenos de solo, como fungos e nematóides, se mostram economicamente importantes (Junqueira *et al.*, 1999; Meletti & Bruckner, 2001).

O cultivo do maracujazeiro em escala comercial teve início no começo da década de 70, com a espécie *Passiflora edulis* Simmonds f. *flavicarpa* Degener, também conhecida como maracujá-amarelo ou maracujá-azedo. O Brasil é, atualmente, o maior produtor e consumidor mundial (Faleiro *et al.*, 2008). No ano de 2007, o Distrito Federal contribuiu com 1.867 ton. de frutos, o que corresponde a 0,38% do total da produção brasileira (Agrianual, 2007).

A cultura do maracujá, embora de grande importância econômico-social, ainda apresenta vários problemas agrônômicos que dificultam seu cultivo, afetando o ciclo produtivo e, conseqüentemente, reduzindo a produtividade. Dentre esses problemas destacam-se os de ordem fitossanitária que comprometem a produtividade e longevidade dos plantios (Torres Filho, 1985). Entre os patógenos que acometem a cultura, os nematóides fitoparasitas estão entre os de maior importância, estando estes associados ao sistema radicular. Os nematóides causadores de galhas, *Meloidogyne* spp. e o nematóide reniforme,

Rotylenchulus reniformis Linford & Oliveira, 1940 causam danos de expressão econômica e limitam a produtividade de frutos e a longevidade das plantações (Sharma *et al.*, 2003b).

Desta forma, faz-se necessário o estudo da variabilidade genética de acessos de *Passiflora* spp. em busca de resistência a nematóides para dar suporte ao crescimento da produção que se encontra em plena expansão no Brasil. Os programas de melhoramento genético têm sido conduzidos visando à obtenção de variedades mais produtivas e resistentes a doenças, por meio da hibridação sexual entre as espécies cultivadas e espécies selvagens. O estudo da diversidade genética de potenciais genitores é uma etapa básica e de fundamental importância para o sucesso de programas de melhoramento genético. Por isso, o desenvolvimento de cultivares com resistência a doenças é uma alternativa interessante, pois envolve medidas de segurança para o trabalhador agrícola e o consumidor, preservação do ambiente, redução de custos de produção, qualidade mercadológica, entre outros, sendo uma demanda atual para as pesquisas em maracujazeiro (Faleiro *et al.*, 2005a).

Com o advento dos marcadores moleculares é possível analisar a variabilidade genética, identificar genótipos ou genes específicos e com isso aumentar a eficiência dos programas de conservação e uso dos recursos genéticos vegetais. Além disso, por meio dos marcadores moleculares pode-se obter um número ilimitado de polimorfismos genéticos em qualquer estágio da planta ou a partir de cultura de células ou tecidos (Faleiro, 2007).

Neste trabalho, objetivou-se obter informações da ocorrência e distribuição de nematóides fitoparasitas na cultura do maracujazeiro nos principais plantios comerciais do Distrito Federal, estudar a variabilidade genética desses acessos comerciais com base em marcadores moleculares RAPD e avaliar a resistência de acessos comerciais e silvestres de maracujazeiro a *Meloidogyne incognita* em condições de casa de vegetação.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1- Importância Econômica do Maracujazeiro

A fruticultura tem se destacado atualmente no sistema agroalimentar brasileiro, promovendo o desenvolvimento de diversas regiões, graças a mudanças nos padrões de demanda nos mercados internos e externos e do conseqüente crescimento tecnológico. A produção nacional de maracujá estende-se por todos os estados brasileiros e pelo Distrito Federal. A região Nordeste é a maior produtora, seguida das regiões Sudeste, Norte e Sul (Durigan, 1998; Souza, 2002). Estima-se que a metade da produção brasileira seja utilizada na fabricação de suco concentrado congelado, e a outra metade, para o consumo *in natura*.

O Brasil também é um dos principais exportadores de suco de maracujá, cujos produtos mais comercializados são o suco integral congelado (12 °Brix) e o suco concentrado congelado (50 °Brix) (Silva, 1998).

Atualmente, o maracujazeiro vem sendo plantado em quase todo o território brasileiro, destacando-se os seguintes estados produtores: Bahia, Sergipe, São Paulo, Pará e Minas Gerais. Proporcionando economia e renda em muitos municípios, com forte apelo social, já que se destaca como uma cultura com uso intensivo de mão-de-obra (Folegatti, 2001).

A produção mundial de maracujá é de 640.000 toneladas, e o Brasil apresenta-se como produtor de 70% desse total. O Equador e a Colômbia aparecem em segundo e terceiro lugares, respectivamente (ITI Tropicals, 2005).

De acordo com Faleiro *et al.* (2005a), *Passiflorara edulis* Sims. (maracujá azedo) e *Passiflora alata* Curtis (maracujá doce) são as espécies mais cultivadas, sendo estimado que essas duas espécies ocupem mais de 90% da área cultivada no mundo.

2 - Gênero *Passiflora*

O termo maracujá de denominação indígena e origem tupi, que significa “alimento em forma de cuia” também conhecido como flor-da-paixão ou fruto-da-paixão, termo este, que faz correlação da morfologia da flor e com os símbolos da paixão de Cristo (Souza & Meletti, 1997). As flores do maracujá no passado foram apreciadas e celebradas como "as graças dos prados, brincos da natureza e devoção da piedade cristã". Por volta do início do

século XVII, a primeira planta da América chegou a Roma, onde foi oferecida ao Papa Paulo V (PASSIFLORA, 2008).

No Brasil o gênero *Passiflora* apresenta um importante centro de diversidade, pois muitas espécies *Passiflora* são nativas, notadamente no Cerrado do Centro-Norte do País (Lopes, 1991).

A família Passifloraceae tem ampla distribuição, principalmente, nas regiões tropicais, mas também ocorre em regiões subtropicais, estendendo-se até o norte da Argentina, África do Sul, Austrália, Nova Zelândia, América do Norte e Ásia. A maioria dos gêneros tem distribuição restrita ao hemisfério ocidental (tribo Passifloreae Juss.) ou ao hemisfério oriental (tribo Paropsieae DC.). A exceção a esta limitação é o gênero *Passiflora*, que apesar de ser predominantemente americano, apresenta 20 espécies registradas também em áreas do Sul da Ásia, África e Oceania (Lopes, 1991).

A família Passifloraceae apresenta uma expressiva diversidade, com 18 gêneros e 630 espécies, sendo o gênero *Passiflora* o maior, constituído por 22 subgêneros e 485 espécies, das quais 150 a 200 espécies são nativas do Brasil (VANDERPLANK, 2000).

No Brasil, são registrados 4 gêneros (*Mitostemma* Mast., *Dilkea* Mast., *Passiflora* L. e *Tetrastylis* Barb. Rodr.) com 83 espécies, a maioria delas no gênero *Passiflora*. Nas Américas, são conhecidos estes quatro gêneros e mais *Ancistrothyrsus* Harms. (MARACUJÁ2, 2008).

Apesar de sua rusticidade, a cultura enfrenta vários problemas patogênicos, sendo estes fatores limitantes ao aumento da qualidade e produtividade dos pomares. Dentre os principais problemas fitossanitários que afetam esta cultura destacam-se: a morte prematura de plantas, doenças como fusariose, antracnose, bacteriose, doenças por nematóides e murcha-do-fruto. Além dos problemas fitossanitários a cultura enfrenta também problemas, como a falta de matrizes para propagação, polinização e a obtenção de porta-enxertos (Oliveira *et al.*, 1994a).

3 - Botânica e Taxonomia

O maracujazeiro, esta elegante trepadeira herbácea ou lenhosa, geralmente com gavinhas, raramente eretas, possuem a raiz do tipo axial, podendo desenvolver raízes adventícias quando as plantas são propagadas por estacas.

O caule na base é lenhoso e menos lenhoso em direção ao ápice da planta. As folhas têm disposição alternada, geralmente simples, raramente compostas. Margem inteira ou serrilhada, as lâminas apresentam nervuras secundárias ao longo da nervura principal (nervação peninérvea) ou nervuras que partem de sua base (nervação palminérvea).

As gavinhas, ausentes em espécies lenhosas, geralmente solitárias, desenvolvem-se nas axilas das folhas.

As flores são completas, destacando-se a coluna denominada androginóforo que é bem desenvolvida. São hermafroditas (bissexuais), actinomorfas, geralmente isoladas ou aos pares nas axilas das folhas, fasciculadas. São pedunculadas, protegidas na base por, geralmente, três brácteas. O tubo floral pode ter diversas formas: bacia, taça e campânula, sendo geralmente verde naquelas de tubo bem desenvolvido. As sépalas são em número de cinco, carnosas ou membranáceas, lineares, comumente providas de uma quilha dorsal e aristadas. As pétalas são formadas por um tubo calicinal, alternadamente com as sépalas, geralmente menores e a textura mais delgada que as sépalas podendo ocorrer nas cores verde, branca, amarelada ou fortemente coloridas (Vanderplank, 1996 e Cunha *et al.*, 2004).

Geralmente, o maracujazeiro produz flores auto-incompatíveis, isto é, o pólen produzido em determinada flor não pode fecundá-la e nem pode fecundar, de forma eficaz, as demais flores produzidas na mesma planta (Junqueira *et al.*, 2001).

A polinização natural do maracujazeiro, geralmente é feita por mamangavas, abelhas do gênero *Xylocopa* Latr., 1802 que, devido ao seu grande porte, ao visitarem a flor do maracujazeiro, encostam seu dorso nos estames onde estão os grãos de pólen, fazendo a retirada dos mesmos e levando-os para o estigma.

O cálice é gamossépalo esverdeado ou colorido. A corola é composta de cinco pétalas que são menores e de textura mais delgada do que as sépalas, mas podem ser ausentes. São geralmente verdes, brancas, amareladas ou fortemente coloridas.

A corona localiza-se na região apical do tubo do cálice e apresenta-se em uma ou várias séries de elementos filamentosos, de tamanhos variados, expostos em anéis coloridos e de importância taxonômica. O opérculo situa-se no interior do tubo calicinal. É membranoso, ereto ou pendente, geralmente filamentosos.

O androceu é formado por cinco estames com filetes unidos na base por uma membrana tubular. O gineceu é tricarpelar, formado por ovário súpero, que pode ser globoso, ovóide, cilíndrico, trígono ou hexagonal. A flor pode apresentar os estiletos totalmente ou parcialmente curvos, ou ainda sem curvatura.

O fruto é caracterizado como baga, e tem a forma ovóide, globosa ou fusiforme, com polpa mucilagínosa com grande variação em tamanho e coloração de polpa. Possui, em média, 6 a 8 cm de comprimento, 5 a 7 cm de largura, 44 a 160 gramas de peso e o número de sementes variando de 200 a 300. É um fruto carnoso, com sementes recobertas com arilo,

o qual contém um suco amarelo-alaranjado, bastante aromático e nutritivo (Meletti & Maia, 1999; Cunha *et al.*, 2004).

As sementes são tidas como ortodoxas ou ortodoxas intermediárias, tolerantes à perda de umidade. A forma é oval, sendo comprimidas lateralmente, numerosas, com testa endurecida, reticulada ou verrugosa.

No maracujá amarelo, a casca é coriácea, quebradiça e lisa, protegendo o mesocarpo, no interior do qual estão localizadas as sementes. Sua coloração é amarela intensa no final do amadurecimento. (MARACUJÁ1, 2008). A taxonomia em *Passiflora* baseia-se na caracterização morfológica e agrônômica da planta, levando à classificação nítida até espécie. Porém, dentro das espécies, as dissimilaridades existentes apresentam maiores dificuldades para serem observadas e caracterizadas. Geralmente, em *Passiflora edulis*, a caracterização considera o fruto e a algumas características pomológicas, tais como produção/safra, peso do fruto, tamanho do fruto, rendimento do suco, °Brix e acidez do suco, porém estes caracteres quantitativos não são precisos sob o plano taxonômico. Para Martin & Nakasone (1970), além da coloração do fruto, sabor e resistência às doenças, *P. edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa* não apresentam diferenças contrastantes entre si.

4 – Regiões de Produção de Maracujá no Brasil

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

5 - Características de algumas espécies de maracujá

Uma vez que o Brasil é o mais importante centro de diversidade do maracujá, vários autores entre eles Ferreira & Oliveira (1991) descrevem a ampla variabilidade genética existente no gênero *Passiflora*. O Centro-Norte do Brasil é o maior em distribuição geográfica deste gênero (Oliveira *et al.*, 1994b.; Souza & Meletti, 1997) e a espécie mais cultivada no Brasil é a *Passiflora edulis*, que tem como nome vulgar maracujá-amarelo ou maracujá azedo, seguido pela *P. alata* ou maracujá-doce. A espécie *P. edulis* também é muito cultivada na Austrália, África e Sudeste Asiático, porém variedades de maracujás com casca roxa. Estima-se que, a espécie *P. edulis* ocupe mais de 90% da área cultivada com maracujá no mundo (Souza & Meletti, 1997).

Outras espécies de maracujá apresentam importância ou potencial comercial. Ferreira (1998) relacionou mais de 50. Dentre elas, destacam-se as espécies a seguir.

5.1 - *Passiflora alata* Curtis.

O maracujá-doce ou alado (*P. alata*), provavelmente é originário do Brasil, onde está distribuído pelos estados da Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás, Amazonas e Pará, sendo encontrado também no Peru (Cunha *et al.*, 2002). Também é conhecido como maracujá de frescos, maracujá de comer, maracujá-alado e maracujá-guaçu. É uma trepadeira que apresenta o caule quadrangular e frutos ovais a piriformes, amarelos ou laranja, comestíveis e adocicados, com polpa muito perfumada e ligeiramente ácida (Kavati *et al.*, 2002).

Esta espécie é cultivada no Brasil pelo seu valor para consumo *in natura*, como planta ornamental e planta medicinal. No cerrado é encontrada em matas de galeria, matas secas ou matas ciliares (Braga & Junqueira, 2000).

5.2 - *Passiflora caerulea* L.

Passiflora caerulea é a passiflorácea ornamental mais conhecida no mundo e seus frutos são comestíveis e de cor alaranjada muito vistosos, com polpa vermelha. Esta espécie pode ser utilizada como planta medicinal com fins sedativos e é de fundamental importância para programas de melhoramento por possuir resistência à bacteriose do maracujazeiro causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* de acordo com Gonçalves & Rosato (2000).

5.3 - *Passiflora coccinea* Aubl.

Passiflora coccinea é uma espécie promissora a programas de melhoramento genético, devido à resistência a *Epicauta atomaria* Germar, 1821 e a *Dione juno* Juno Cram., 1779 (Oliveira & Ruggiero, 1998). Espécie de origem amazônica é talvez uma das mais cultivadas com fins ornamentais, podendo ser encontrada em jardins e em casas de vegetação de quase todo o mundo, por sua beleza e o exotismo das flores. Conhecida também como maracujá-tomé-açu, *P. coccinea* é planta habitante de uma extensa região que vai desde as Guianas até o Estado do Rio Grande do Sul. Esse maracujá distingue-se por suas flores de coloração vermelha com filamentos que apresentam uma variação de cores que vão do púrpura ao cor-de-rosa e ao branco. Além disso, seu fruto ovalado, de pequenas dimensões e de coloração alaranjada com estrias verde-claras, assemelha-se a um pequeníssimo e curioso melão.

5.4 - *Passiflora nitida* Kunth

Proveniente da Amazônia e do Cerrado é uma espécie rústica cujos frutos apresentam sabor exótico e são bastante apreciados para consumo *in natura*. Tem sido

apontada como resistente à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*) e à morte precoce, à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz), *Dione juno juno* e *Epicauta atomaria*, mas é suscetível à cladosporiose (*Cladosporium* spp.) (Oliveira *et al.*, 1994a.); Oliveira & Ruggiero, 1998; Moraes *et al.*, 2002).

5.5 - *Passiflora setacea* DC.

Passiflora setacea é conhecida como maracujá-do-sono, maracujá-do-cerrado, maracujá-sururuca e maracujá-de-boi, é nativa do cerrado. Possui frutos com a casca verde-claro com listras verde-escuro em sentido longitudinal e a polpa, cor amarelo-claro ou creme. Apresenta potencial agrônômico, econômico e medicinal.

Espécie muito utilizada como porta-enxerto ou fonte de resistência à morte precoce (doença associada a fungos do solo, como *Fusarium oxysporum* f. *passiflorae* Gordon *apud* Purss e *Phytophthora* spp.), e à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*), à cladosporiose e, aos insetos *Dione juno juno* e *Epicauta atomaria* (Braga & Junqueira, 2000).

5.6 - *Passiflora capsularis* L.

P. capsularis apresenta ampla distribuição por quase todo o país. É uma trepadeira com indumento dos ramos, gavinhas, estípulas, folhas, pedúnculos, pedicelos florais, hipantos e face abaxial das sépalas densa e esparsamente pubescentes e, tricomas persistentes. Suas flores podem ser brancas, creme, amarelas ou esverdeadas, ápice ereto, disco nectarífero ausente.

5.7 - *Passiflora amethystina* Milkan

Conhecida como maracujá-da-serra ou maracujá-ametista, *P. amethystina* é utilizada como planta ornamental. É amplamente distribuída no Cerrado, podendo ser encontrada em matas ciliares e matas de galerias do Distrito Federal. Podendo também ser encontrada em estado nativo na Serra do Mar e em outras regiões serranas de São Paulo, Rio de Janeiro e Santa Catarina. Trata-se de espécie de excepcional beleza, em especial pelo colorido de sua flor, que apresenta a mesma e preciosa cor ametista da mais brasileira das pedras semipreciosas. É altamente suscetível à mosca-das-frutas e à verrugose.

6 - Doenças do maracujazeiro

A cultura do maracujá é afetada por um grande número de doenças, fazendo dos problemas fitossanitários a maior limitação para a cultura. Essas doenças acarretam perda de produtividade e qualidade e, diminuição da longevidade da cultura. Dentre essas doenças destacam-se as mencionadas a seguir.

6.1 - Virose do endurecimento do fruto

A virose endurecimento dos frutos, pode ser causada por duas espécies de vírus (*Passionfruit woodiness virus*, PWV e *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, CABMV), é a principal doença de etiologia viral do maracujazeiro no Brasil e atualmente está disseminada na maioria das regiões produtoras (Kitajima & Resende, 2001; Nascimento *et al.*, 2006).

O primeiro relato da virose do endurecimento dos frutos do maracujazeiro foi feito na Austrália há mais de cem anos (Cobb, 1901). Tanto o (PWV) quanto o (CABMV) da família *Potyviriidae*, do gênero *Potyvirus* sendo ambos descritos como agentes causadores do endurecimento dos frutos.

No Brasil a virose do endurecimento do fruto foi constatada pela primeira vez em plantios comerciais de maracujá amarelo e doce, no Estado da Bahia, no final da década de 70 (Chagas *et al.*, 1981; Yamashiro & Chagas, 1979). Posteriormente, foi detectada em quase todos os Estados do Brasil (Barbosa & Santos Filho, 2003). A distribuição geográfica dessa virose inclui também a Austrália, Suriname, Formosa, África do Sul, Sumatra, Quênia e Inglaterra (Kitajima *et al.*, 1986). Os danos são maiores quanto mais cedo as plantas são infectadas, reduzindo número, peso e valor comercial dos frutos. Os sintomas se caracterizam com a malformação, rugosidade, clareamento das nervuras e mosaico nas folhas.

6.2 - Bacteriose do maracujazeiro

A bacteriose do maracujazeiro causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* ocorre em todas as regiões do país, podendo ser fator limitante à produção.

Essa bactéria apresenta forma de bastonetes, é gram negativa e monótrica, possuindo um único flagelo, cuja finalidade é a locomoção em meios aquosos, facilitando sua disseminação por toda a planta. Forma colônias amareladas em meio de cultura, sendo esta coloração conferida pela substância xanthomonadina (Golçalves & Rosato, 2000).

Os sintomas tornam-se evidentes quando manchas de cor verde-escuro, encharcadas, translúcidas e halo amarelado tornam-se evidentes. A bactéria pode também atingir feixes vasculares ocasionando redução na frutificação e levando a morte da planta.

6.3 - Antracnose

A antracnose causada pelo fungo *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) é comumente encontrada nas regiões produtoras de maracujá do Brasil. Ocorre principalmente em frutos desenvolvidos e é a mais importante doença de pós-colheita da cultura, reduzindo o período de conservação dos frutos.

Quanto aos sintomas, os frutos apresentam lesões grandes, arredondadas, cor escura que evoluem para uma podridão mole e deprimida que atinge grande extensão do fruto que acaba caindo (Souza, 2005).

6.4 - Doenças causadas por fitonematóides

Os nematóides fitoparasitas encontram-se entre os que mais limitam a produtividade agrícola, sendo capazes de infectar quase todas as plantas cultivadas (Taylor *et al.*, 1985).

Segundo Sasser & Carter 1985, estima-se uma perda média de 12,68% na agricultura brasileira em decorrência dos nematóides formadores de galhas. Justificando dessa forma o fato de 70% dos trabalhos em nematologia no Brasil serem referentes a espécies desse gênero.

Diversos nematóides têm sido encontrados em associação ao sistema radicular do maracujazeiro (Sharma & Loof, 1972; Milne, 1982), embora somente o nematóide das galhas, *Meloidogyne* spp., e o nematóide *Rotylenchulus reniformis* causem danos de expressão econômica, limitando a produtividade e a longevidade das plantações (Sharma *et al.*, 2003a).

O parasitismo de nematóides em passifloráceas constitui fato conhecido há várias décadas. Goodey *et al.* (1965), relatou a associação de *Meloidogyne* spp. a raízes de *Passiflora caerulea* e *Passiflora incarnata* L., em 1911. O primeiro registro de ataques de nematóides a maracujazeiros cultivados em escala comercial (*P. edulis* f. *edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa*) foi feito por Carne (1927), na Austrália.

Um levantamento realizado no Cerrado brasileiro revelou que *R. reniformis* estava presente em 35% das amostras coletadas de plantas de maracujá com 2 anos apresentando declínio e, *M. incognita* e *M. arenaria* em 47% das amostras de plantas sintomáticas (Sharma *et al.*, 2003b).

Desta forma, faz-se mister enfatizar a respeito desses dois gêneros de nematóides que podem ter influência negativa na cultura do maracujazeiro que encontra-se em plena expansão no Brasil.

6.4.1 - *Rotylenchulus reniformis*

O nematóide reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) pertencente à família Hoplolaimidae Filip'ev, 1934 é semi-endoparasita de raízes de diversas plantas cultivadas, de ocorrência comum nas áreas tropicais e subtropicais. Apresenta ampla distribuição geográfica e grande número de hospedeiras. A fêmea jovem introduz a parte anterior do corpo no interior da raiz, induzindo a formação de um sincício, sítio especializado de alimentação. A fêmea adulta apresenta corpo alargado, lembrando o formato de um rim. No

entanto, não há formação de galhas, mas as plantas de maracujazeiro atacadas por *R. reniformis* apresentam sintomas de nanismo e amarelecimento completo da parte aérea, resultando em atraso no crescimento e na maturação dos frutos. Em casos mais severos de ataque do nematóide reniforme, as plantas não florescem permanecendo raquíticas, o que resulta em grande perda da produção (Freire, 2003; Campos *et al.*; 2002; Sharma *et al.*, 2005).

6.4.2 - *Meloidogyne* spp.

O nematóide de galhas radiculares do gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887 pertence à família Meloidogynidae Skarbilovich, 1959 é endoparasita sedentário, com uma gama de hospedeiros que inclui mais de 2000 espécies, sendo considerado o gênero mais importante dos fitonematóides. O juvenil de segundo estágio penetra a raiz e estabelece um sítio de alimentação no parênquima vascular. O sítio de alimentação é constituído de células nutridoras hipertrofiadas, denominadas células gigantes multinucleadas que conectam-se às células vizinhas e delas recebem parte dos solutos e fotoassimilados produzidos pela planta (Ferraz, 2001). Paralelo ao processo de hipertrofia celular, o nematóide induz a hiperplasia de células parenquimáticas do córtex e do cilindro vascular, levando ao desenvolvimento de uma protuberância denominada galha radicular. Com a formação das galhas ocorre o comprometimento do sistema radicular que reduz a capacidade de absorção de água e minerais e conseqüentemente contribui para uma menor eficiência da fotossíntese.

O macho e a fêmea adulta desse gênero são facilmente distintos na morfologia. As fêmeas apresentam corpo dilatado, em formato de pêra e os machos são vermiformes.

No gênero *Meloidogyne* podem ocorrer diferentes modalidades reprodutivas, algumas espécies se reproduzem por anfimixia (reprodução sexuada), por partenogênese do tipo meiótica; e as que se reproduzem exclusivamente por partenogênese mitótica. De acordo com Ferraz (2001) as espécies mais importantes economicamente como *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 e *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949, se reproduzem por partenogênese mitótica obrigatória.

Os danos causados após a infecção por esses nematóides podem ser acentuados em decorrência da infecção causada por fungos de solo, como os dos gêneros *Pythium* Prings., *Fusarium* Link e *Rhizoctonia* DC., que podem ocasionar a morte desses tecidos mais rapidamente (Mai & Mullin, 1996; Agrios, 1997).

7 - Melhoramento genético e resistência do maracujazeiro a doenças

O melhoramento genético de plantas tem sido praticado com sucesso desde os primórdios da civilização. A análise de fenótipos tem sido a base para o melhoramento. A pesquisa tem sido fundamental para a seleção de genótipos de maracujá-azedo e maracujá-doce que sejam mais produtivos e resistentes a doenças. Uma das alternativas para essa seleção é fazer o uso da hibridação interespecífica, ou seja, cruzamentos convencionais de seleção ou cultivares comerciais com espécies silvestres, que geralmente apresentam resistência a doenças. Assim, é fundamental conhecer as características agronômicas, físicas e químicas das espécies nativas utilizadas nos cruzamentos (Braga *et al.*, 2005).

O melhoramento genético visa solucionar problemas, principalmente referentes a doenças, fazendo uso da hibridação para a transferência de genes de resistência de um material resistente para um material suscetível. De modo geral, as espécies silvestres são importantes aos programas de melhoramento, pois apresentam genes de resistência a fitopatógenos (Junqueira *et al.*, 2005). Além disso, tem-se uma característica importante a ser mencionada quanto às espécies silvestres que é a presença do androginóforo mais curto que reduz a distância dos estigmas em relação à coroa, facilitando a polinização por insetos menores. O androginóforo é a estrutura formada pelo prolongamento do receptáculo floral que sustenta o gineceu e o androceu.

Os autores Menezes *et al.* (1994); Oliveira *et al.* (1994b); Fischer (2003) e Meletti & Bruckner (2001) relataram que as passifloras silvestres: *Passiflora caerulea* L., *P. nitida* Kunth, *P. laurifolia* L., alguns acessos de *P. suberosa* L., *P. alata*, *P. coccinea*, *P. gibertii* N.E. Br. e *P. setacea* são resistentes à morte precoce e a outras doenças causadas por patógenos de solo.

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

Espécies silvestres de maracujá espontâneas no Cerrado são alternativas para a ampliação da base genética da resistência a diversas doenças, que podem ser combinadas com características de produtividade e qualidade de frutos em programas de melhoramento genético. Em vista disso, programas de melhoramento genético têm sido conduzidos visando à obtenção de variedades mais produtivas e resistentes a doenças, por meio da hibridação sexual entre as espécies cultivadas e espécies silvestres (Barbosa, 1998; Faleiro *et al.*, 2005b; Junqueira *et al.*, 2005).

Assim, o melhoramento do maracujazeiro além da qualidade dos frutos e da produtividade, visa também a incorporação de resistência a moléstias nas atuais cultivares ou o desenvolvimento de outras com resistência ou tolerância a elas. Como verificado por Paula (2006), as espécies comerciais, *P. setacea*, *P. odontophylla*, *P. edulis* nativo e o híbrido *P. coccinea* x *P. setaceae* se comportaram como resistentes a *M. incognita*. Também verificou que *M. incognita* e *M. javanica* de maneira geral, reduziram o desenvolvimento vegetativo das plantas das espécies de *Passiflora*, exceto para alguns casos, que *M. javanica* estimulou o desenvolvimento de plantas. Sendo tais informações úteis aos programas de melhoramento genético que buscam características agrônômicas desejáveis, em especial voltadas para obtenção de material resistente a doenças.

8 - Marcadores moleculares

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

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

A técnica RAPD, por ser uma metodologia mais simples e relativamente mais barata, tem sido intensamente usada pelos diversos laboratórios, em diferentes culturas, para as

mais variadas finalidades. A técnica é capaz de detectar variações diretamente no DNA, e isso têm sido intensamente utilizados para diferentes estudos genéticos de diversas cultivares, incluindo importantes trabalhos sobre a variabilidade genética do maracujazeiro (FALEIRO *et al.*, 2005b) e na identificação rápida de seleções interespecíficas provenientes ou não de cruzamentos controlados.

Fragmentos de DNA são amplificados no decorrer da técnica de RAPD, e para isso utiliza-se um único *primer*. Para que ocorra a amplificação de um fragmento de RAPD no genoma analisado, duas seqüências de DNA complementares ao *primer* arbitrário devem estar adjacentes e em orientação oposta, de forma a permitir a amplificação de um segmento de DNA pela DNA polimerase (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A presença ou ausência de bandas é determinada pelo polimorfismo e é resultante da diferença do local de anelamento do *primer*. As bandas são herdadas de maneira Mendeliana e, portanto, são úteis como marcadores moleculares para caracteres qualitativos e quantitativos.

Sendo assim, não é necessário conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos da região alvo. Por isso, os marcadores moleculares RAPD podem ser obtidos para qualquer espécie, mesmo aquelas ainda pouco estudadas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os marcadores RAPD baseiam-se no uso de iniciadores arbitrários que são utilizados na amplificação de DNA via PCR.

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

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

Um ciclo da PCR envolve três etapas (desnaturação, anelamento e extensão). A fita dupla de DNA alvo é desnaturada através da elevação de temperatura para 92 a 95 °C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60 °C, dependendo essencialmente do tamanho e seqüência do primer utilizado, permitindo a hibridização

DNA-DNA de cada *primer* com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72 °C para que a enzima polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos *primers*. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência-alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência seja feita no processo. Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da seqüência-alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, seja produzida mais de um milhão de vezes a quantidade inicial da seqüência alvo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

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

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

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

principais (“principal coordinate analysis” - PCDA) (Gower,1966) que também é discutido por Dias (1998).

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

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGRIOS, G. N. Plant disease caused by nematodes. In: AGRIOS, G. N. Plant Pathology. San Diego: Academic Press, Inc., 565-597 p.1997.

BARBOSA, C.J. & SANTOS FILHO, H.P. Doenças causadas por vírus e similares. In: Maracujá: fitossanidade. Frutas do Brasil. Brasília: Embrapa 2003.

BARBOSA, L. V. Citologia de híbridos somáticos de *Passiflora* spp. obtidos por fusão de protoplastos. Tese de Doutorado. São Paulo SP. Universidade de São Paulo. 1998.

BRAGA, F. M. & JUNQUEIRA, N. T. V. Uso potencial de outras espécies do gênero *Passiflora*. In: Informe Agropecuário 21: 72-75. 2000.

BRAGA, M.F.; BATISTA, A.D.; JUNQUEIRA, N.T.V.; JUNQUEIRA, K.P.; VAZ, C.F.; SANTOS, E.C. & SANTOS, F.C. Características agronômicas, físicas e químicas de maracujá-alho (*Passiflora tenuifila* Killip.) cultivado no Distrito Federal. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PINTO, A.C.Q; SOUSA, E.S. IV Reunião técnica de pesquisas em maracujazeiro. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 86-90 p. 2005.

CAMPOS, V.P.; CAMPOS, J.R.; SILVA, L.H.C.P.; DUTRA, M.R. Manejo de doenças causadas por nematóides em frutíferas. In: ZAMBOLIM, L. Manejo integrado: fruteiras tropicais, doenças e pragas, Viçosa, MG: UFV, Suprema Gráfica e Editora Ltda, 185-238 p. 2002.

CARNE, W. M. Additions to the plant disease of South Western Australia. J. Proc. R. Soc. West. Australia 14: 24-28. 1927.

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

COBB, N.A. Woodiness of the passionfruit. Agric. Gaz. N.S.W.12: 407-418, 1991. In: KITAJIMA, E. W.; CHAGAS, C.M. & CRESTANI, O.A. Enfermidades de etiologia viral e

associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiros no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 11: 409-432, 1986.

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

CRUZ, C.D. & SCHUSTER, I. Programa GQMOL: genética quantitativa e molecular. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>>. Acesso em: 13 maio. 2008.

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

CUNHA, M.A.P. da; BARBOSA, L.V. & JUNQUEIRA, N.T.V. Aspectos botânicos. In: LIMA, A. de A. (Ed.). *Maracujá produção: aspectos técnicos*. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica (Frutas do Brasil, 15). 15-24. p.2002.

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

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

DURIGAN, J.F. Colheita e conservação pós-colheita. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5., 1998, Jaboticabal. *Anais... Jaboticabal: FUNEP*, 388p. 1998.

EDITORA NACIONAL: *Brasiliense*, v. 71, 5ª Série. 410 p. 1937.

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

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

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. & BRAGA, M.F. Maracujá: potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. & BRAGA, M.F. (Eds.). Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – desafios da pesquisa. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p.81-107. 2005b.

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

FERRAZ, L. C. C. B. Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja. In: SILVA, J.F.V. (Org.). As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. Embrapa Soja. 2001.

FERREIRA, F.R. & OLIVEIRA, J.C. Germoplasma de *Passiflora* no Brasil. In: SÃO JOSÉ, A.R.(Ed.). A cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEP, p.187-200. 1991.

FERREIRA, F.R. Germoplasma de maracujá. In: Reunião técnica sobre pesquisa em maracujazeiro no Brasil: Embrapa-CNPMPF. p.48-53. 1998.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220p. 1998.

FISCHER, I. H. Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da “morte prematura” do maracujazeiro, causada por *Nectria hematococca* e *Phytophthora parasitica*. Dissertação Mestrado. São Paulo SP. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 2003.

FOLEGATTI, M.I.S. & MATSUURA, F.C.A.U. Produtos. Maracujá: pós-colheita. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 51p. (Frutas do Brasil, 23). 2001.

FREIRE, F.C.O. Nematóides de Fruteiras Tropicais de Interesse Agroindustrial. In: FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E. & VIANA, F.M.P. Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 533-537p.2003.

GONCALVES, E. R. & ROSATO, Y. B. Genotypic characterization of Xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:811-821. 2000.

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

HOEHNE, F. C. Botânica e agricultura no Brasil (Século XVI). São Paulo: Companhia

ITI Tropicals. Disponível em: www.passionfruitjuice.com. Acesso em fevereiro de 2008.

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 do maracujazeiro – desafios da pesquisa. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p. 341-358. 2005.

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

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

KAVATI, R. & PIZA JÚNIOR, C. de T. A. Cultura do maracujá-doce. Campinas: CATI, Boletim Técnico, 244, 46p. 2002.

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

KITAJIMA, E.W. & REZENDE, J.A.M. Enfermidade de etiologia viral e fitoplasmática. In: BRUCKENER, C. H. & PICANÇO, C. Maracujá: Tecnologia de produção, pós colheita, agroindústria e mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 85-137p. 2001.

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

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

LOPES, S.C. Citogenética do maracujá, *Passiflora* spp. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R. & VAZ, R.L. (Eds.) A cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEP. p.201-209. 1991.

MAI, W. F. & MULLIN, P. G. Plant-parasitic nematodes: a pictorial key to genera. 5th. ed. New York: Stage House, Cornell University Press, 277p. 1996.

MARACUJÁ1: http://www.passifloras.org/publi_artigos.html- acesso em 12 de fevereiro de 2008.

MARACUJÁ2:http://zoo.bio.ufpr.br/polinizadores/Textos/passiflora_genero.htm#passiflora - acesso em 12 de fevereiro 2008.

MARTIN, F. W. & NAKASONE, H. Y. The edible species of *Passiflora*. *Economic Botany* 24: 43-333. 1970.

MARTIN, F.W. & NAKASOME, Y. The edible species of passiflora. *Economic Botany*, Bronx, v.24,n.3, 333-343p.1970.

MELETTI, L.M.M. & BRUCKNER, C.H. Melhoramento genético. In: BRUCKNER, C. H. & PICANÇO, M. C. (Eds.). Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, Mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes. p. 345-385. 2001.

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

MELETTI, L.M.M. Maracujá-roxo. *Revista Brasileira de Fruticultura* 27 (2): 194-348.2005.

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

MILNE, D. L. Nematode pests of miscellaneous sub-tropical crops. In: KEETCH, D. P. & HEYS, J. (Eds.). *Nematology in Southern Africa Science Bulletin* 400:42-46. 1982.

MORAES, M.C.; VIEIRA, M.L.C.; NOVAES, Q.S. & REZENDE, J.A.M. Susceptibilidade de *Passiflora nitida* ao *Passion fruit woodiness virus*. *Fitopatologia Brasileira* 27:108. 2002.

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

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

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

OLIVEIRA, J. C. de; NAKAMURA, K.; CENTURION, M. A. P. C.; RUGGIERO, C.; FERREIRA, F. R.; MAURO, A.O. & SACRAMENTO, C. K. Avaliação de Passifloráceas quanto à morte prematura de plantas. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA*, 13., 1994, Salvador. Anais... Salvador: SBF, v. 3, p. 827. 1994a. (Resumo 347). CITAR NO TEXTO COMO 1994a

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

PASSIFLORA: http://www.passifloras.org/publi_artigos.html- ISSN 0365-4508. Acesso em 12 de fevereiro de 2008.

PAULA, M.S. Diversidade genética e reação de *Passiflora* spp. a *Meloidogyne incognita* e a *Meloidogyne javanica*. (Tese de Mestrado). Brasília. Universidade de Brasília. 2006.

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

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

SASSER, J. N. & CARTER, C. C. Overview of the international *Meloidogyne* project (1975-1984). In: SASSER, J. N. & CARTER, C. C. (Eds). An advanced treatise *Meloidogyne: biology and control*. Raleigh: North Caroline State University Graphics. v.1:19-24. 1985.

SHARMA, R. D.; RITZINGER, C. H. S. P.; JUNQUEIRA, N. T. V. & ALVES, R; T. Reprodução e patogenicidade de *Meloidogyne javanica* no híbrido EC-2-0 de maracujá-azedo. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 87. 12 p. 2003a.

SHARMA, R. D.; RITZINGER, C. H. S. P.; JUNQUEIRA, N. T. V. & GOMES, A. C. Reação de genótipos de maracujá-azedo ao nematóides *Rotylenchullus reniformis*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 86. 14 p. 2003b.

SHARMA, R.D. & LOOF, P. A. A. Nematodes associated with different plants at the Centro de Pesquisa do Cacau, Bahia. Revista Theobroma 4:38-43. 1972.

SHARMA, R.D.; JUNQUEIRA, N.T.V. & GOMES, A.C. Reação de espécies de *Passiflora* a nematóide-das-galhas. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISAS EM MARACUJAZIRO, 4, 2005. Planaltina, DF: EMBRAPA, Resumos... p.183-186, 2005.

SILVA, J.R. da. Situação da cultura do maracujazeiro na Região Central do Brasil. In: RUGGIERO, C. (Coord.) SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, 5., 1998, Jaboticabal. Anais. Jaboticabal, FUNEP; p.18-19.1998.

SOUZA, J.S.; CARDOSO, C.E.L.; FOLEGATTI, M.I.S.; MATSUURA, F.C.A.U. Maracujá: pós-colheita. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica (Frutas do Brasil, 23) 51p. 2002.

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

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

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

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

TAYLOR, S.G.; BALTENSBERGER, D.D. & DUNN, R.A. Interaction between six season legumes and three species of root-knot nematodes. Journal of Nematology 17:367-370. 1985.

TORRES FILHO, J. Doenças do maracujá (*Passiflora edulis f.flavicarpa*) na região da Ibiapaba, Ceará, Brasil. Fitopatologia Brasileira 10: 223. 1985.

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

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

YAMASHIRO, T.; CHAGAS, C.M. Ocorrência de grave virose em maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.), no Estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., Pelotas, Anais. Pelotas: SBF, 1979. p. 915-917. 1979.

CAPÍTULO 2

OCORRÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DE NEMATÓIDES FITOPARASITAS NA CULTURA DO MARACUJAZEIRO EM PLANTIOS COMERCIAIS DO DISTRITO FEDERAL E EM CERRADO NATIVO ADJACENTE.

RESUMO

Os danos causados por fitonematóides estão entre os principais problemas fitossanitários da cultura do maracujazeiro, sendo que as perdas por tais parasitas podem comprometer a produtividade, qualidade dos frutos e longevidade da cultura. Neste trabalho, as populações de fitonematóides foram avaliadas em amostras de solo e de raízes de áreas plantadas com maracujazeiro ou de vegetação nativa de Cerrado, em cinco diferentes núcleos rurais do Distrito Federal (Gama, Lago Oeste, Brazlândia, Pípiripau e Paranoá), em 14 propriedades, no período de julho de 2007 a janeiro de 2008. Foram coletadas 20 amostras compostas em 14 diferentes propriedades com plantios de maracujazeiro e em cinco áreas de Cerrado nativo. Foram encontrados nove gêneros de nematóides fitoparasitas (*Meloidogyne*, *Helicotylenchus*, *Rotylenchulus*, *Scutellonema*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Hemicycliophora*, *Xiphinema* e *Criconemoides*) e cinco de micófagos (*Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Tylenchus*, *Coslenchus* e *Ditylenchus*) nas amostras coletadas em plantios comerciais de maracujazeiro e em Cerrado nativo. Foram verificados altos níveis populacionais de nematóides fitoparasitas associados à cultura do maracujazeiro no Distrito Federal, como *Rotylenchulus reniformis* e *Meloidogyne* spp. O número total de nematóides fitoparasitas por amostra foi consideravelmente maior em plantios de maracujazeiro em comparação com as áreas nativas, indicando que a monocultura favoreceu esses nematóides. Estima-se que algumas das espécies de nematóides encontradas possam estar envolvidas na redução do crescimento das plantas com conseqüente reflexo na queda de produção e longevidade do maracujazeiro.

ABSTRACT

Damages due to plant-parasitic nematodes are among the most important phytosanitary problems in passion fruit plantations. When adequate control measures are not adopted, yield losses credited to these parasites may compromise crop production. Therefore, populations of plant-parasitic nematodes were evaluated in soil and root samples from areas planted with passion fruit, or covered with corresponding native cerrado vegetation, from five different cropping regions of the Brazilian Federal District (Gama, Lago Oeste, Brazlândia, Pipiripau, and Paranoá). From May 2007 to January 2008, 20 samples had been collected from 14 farms planted with passion fruit, as well as from five native cerrado sites. Eight genera of plant-parasitic nematodes (*Meloidogyne*, *Helicotylenchus*, *Rotylenchulus*, *Scutellonema*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Hemicycliophora*, *Xiphinema* and *Criconemoides*), and five of fungal feeder nematodes (*Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Tylenchus*, *Ditylenchus* and *Coslenchus*) were found in present survey. In this work, high population levels of important nematode pathogens, such as *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne* spp. were observed in the passion fruit plantations. Plant-parasitic nematodes were more abundant in samples collected in passion fruit plantations, as compared with those from native vegetation, what is an indication that the monocropping system favored those nematodes. Present results indicate that some plant-parasitic nematodes recovered from the sampled fields are responsible for poor plant development, with reflex on passion fruit production.

1 – INTRODUÇÃO

O cultivo do maracujazeiro em escala comercial teve início no começo da década de 70, com a espécie *Passiflora edulis*, também conhecida como maracujá-amarelo ou maracujá-azedo. O Brasil é, atualmente, o maior produtor e consumidor mundial (Faleiro *et al.*, 2008). No ano de 2007, o Distrito Federal contribuiu com 1.867 ton de frutos, o que corresponde a 0,38% do total da produção brasileira (Agrianual, 2007).

A produção dessa fruteira na região do Cerrado tem significativa expressão, uma vez que a cultura apresenta facilidade de adaptação às condições edafoclimáticas, rápido retorno financeiro e, principalmente, um complexo agroindustrial no triângulo mineiro e mercado promissor no Distrito Federal e Goiânia (Aguiar *et al.*, 2001). No entanto, a cultura do maracujá, embora de grande representatividade econômico-social, ainda apresenta vários problemas agronômicos que dificultam seu cultivo, afetando o ciclo produtivo e, conseqüentemente, reduzindo a produtividade.

No Brasil, o maracujazeiro-amarelo apresenta baixa produtividade, devido, em grande parte, a problemas fitossanitários, dos quais as doenças provocadas por patógenos de solo, como fungos e nematóides, se mostram economicamente importantes (Junqueira *et al.*, 1999; Meletti & Bruckner, 2001).

Entre os patógenos que acometem a cultura, os nematóides fitoparasitas estão entre os de maior importância, estando estes associados ao sistema radicular. Os nematóides do gênero *Meloidogyne* spp. e *Rotylenchulus reniformis* causam danos de expressão econômica e limitam a produtividade de frutos e a longevidade das plantações (Sharma *et al.*, 2003).

Os nematóides fitoparasitas são relatados como nocivos ao maracujazeiro no Brasil, sendo uma ameaça aos plantios, pois atuam de maneira destrutiva comprometendo a produtividade e a produção. De acordo com Sharma *et al.* (1999), as espécies mais freqüentemente encontradas, associadas ao maracujazeiro, em declínio, na região de Cerrado do Brasil, são: *Meloidogyne incognita* Kofoid & White (1919) Chitwood (1949); *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood (1949) e *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood (1949). A espécie *M. javanica* foi encontrada somente em algumas amostras de solo e raízes no Distrito Federal.

Neste trabalho, objetivou-se verificar a ocorrência e distribuição de nematóides fitoparasitas associados à cultura do maracujazeiro no Distrito Federal e em Cerrado nativo.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

De acordo com a Emater DF os plantios comerciais de maracujá no DF encontram-se em plena expansão, embora tenha diminuído o número de produtores de 2005 para 2007. O presente trabalho amostrou aproximadamente 22% dos produtores de maracujá do DF.

Amostras de solo e de raízes foram coletadas em cinco diferentes núcleos rurais do Distrito Federal (Gama, Lago Oeste, Brazlândia, Pípiripau e Paranoá), em 14 propriedades (Figura 2.1), no período de julho de 2007 a janeiro de 2008. A coleta de amostra foi em áreas plantadas com maracujazeiro (Figura 2.2) ou de Cerrado nativo (Figura 2.3). Foram coletadas 20 amostras compostas em áreas plantadas com maracujazeiro e cinco em áreas de Cerrado nativo. Cada amostra composta foi constituída de 1 L de solo e 100 g de raízes, utilizando-se 10 subamostras por hectare, percorrendo as áreas de amostragem em “zig-zague” e retirando solo e raízes da camada de 0 a 20 cm de profundidade. No caso da amostragem em Cerrado nativo, as amostras foram constituídas apenas de solo.

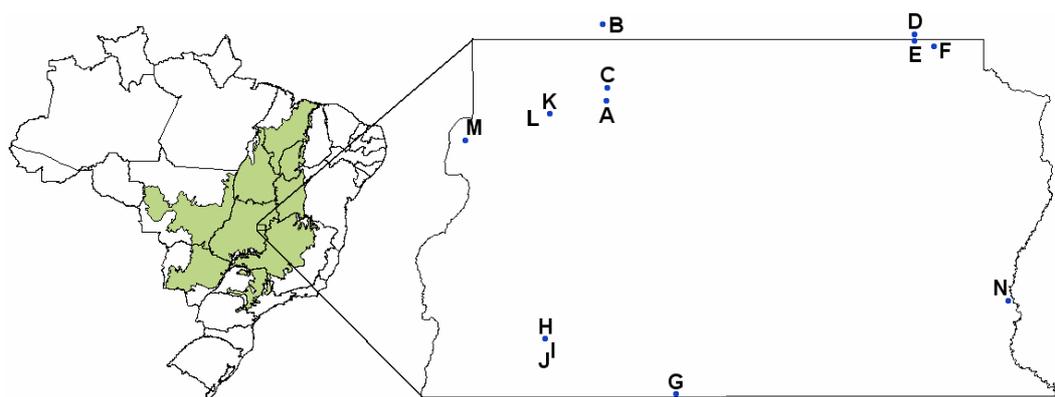


Figura 2.1- Localidades onde foram coletadas as amostras de solo e de raízes.

A, B e C- Núcleo Rural Lago Oeste; D, E e F- Núcleo Rural Pipiripau; G, H, I e J- Núcleo Rural Gama; K, L e M- Núcleo Rural Brazlândia; N- Núcleo Rural Paranoá.



Figura 2.2 - Localidades (propriedades) onde foram coletadas amostras de solo e raízes. A - Núcleo Rural Lago Oeste; B - Núcleo Rural Brazlândia; C - Núcleo Rural Gama.

Para extração dos nematóides de solo e das raízes foram utilizados os métodos de Jenkins (1964) e Coolen e D'Herde (1972), respectivamente. Os exemplares obtidos, suspensos em água, foram mortos por aquecimento gradual e fixados em formaldeído 3%. O número de nematóides extraídos de cada amostra foi estimado por contagem em câmara de Peters, sob microscópio ótico, utilizando-se 30% do volume de cada uma das suspensões. As identificações taxonômicas, até nível de gênero, foram completadas com o exame microscópico de exemplares montados em lâminas “permanentes”, após infiltração com glicerina (Seinhorst, 1959; Hooper, 1986).



Figura 2.3 - Áreas nativas de cerrado, onde amostras foram coletadas: A - Núcleo Rural Gama; B- Núcleo Rural Brazlândia; C- Núcleo Rural Pípiripau; D- Núcleo Rural Paranoá.

3 - RESULTADOS

Nas amostras coletadas em plantios comerciais de maracujazeiro e em Cerrado nativo foram encontrados nove gêneros de nematóides fitoparasitas (*Criconemoides* Taylor, 1936, *Helicotylenchus* Steiner, 1945, *Hemicycliophora* de Man, 1921, *Meloidogyne* Goeldi, 1887, *Paratylenchus* Micoletzky, 1925, *Pratylenchus* Filipjev, 1936, *Rotylenchulus* Linford & Oliveira, 1940, *Scutellonema* Andrassy, 1958 e *Xiphinema* Cobb, 1913) e, cinco micófagos (*Aphelenchoides* Fisher, 1894, *Aphelenchus* Bastian, 1895, *Coslenchus* Siddiqi, 1978, *Ditylenchus* Filipjev, 1936 e *Tylenchus* Cobb, 1913) (Tabela 2.2), com as seguintes frequências de ocorrência (percentagem de amostras com ocorrência de cada gênero): **1) Solos de plantios de maracujazeiro** - *Aphelenchus* (85%); *Meloidogyne* (75%); *Aphelenchoides* (75%); *Tylenchus* (70%); *Helicotylenchus* (60%); *Rotylenchulus* (40%); *Ditylenchus* (35%); *Scutellonema* (15%); *Coslenchus* (15%); *Criconemoides* (10%); *Pratylenchus* (5%); *Paratylenchus* (5%). **2) Raízes de maracujazeiro** - *Aphelenchus* (85%); *Aphelenchoides* (70%); *Ditylenchus* (55%); *Meloidogyne* (50%); *Rotylenchulus* (45%); *Tylenchus* (40%); *Helicotylenchus* (25%); *Pratylenchus* (15%); *Scutellonema* (15%); *Criconemoides* (10%). **3) Solo de cerrado nativo** - *Aphelenchus* (60%); *Meloidogyne* (60%); *Aphelenchoides* (40%); *Tylenchus* (60%); *Helicotylenchus* (60%); *Rotylenchulus* (60%); *Ditylenchus* (60%); *Criconemoides* (60%); *Pratylenchus* (40%); *Paratylenchus* (20%); *Xiphinema* (20%); *Hemicycliophora* (20%).

A distribuição dos nematóides entre os núcleos rurais e respectivas áreas nativas está representada na Tabela 2.1, que mostra o gênero *Meloidogyne* como o mais abundante nas áreas 9,11,16 e Núcleo Rural do Gama e menos abundante nas áreas 4, 6 e 13. O gênero *Rotylenchulus* foi mais abundante nas áreas 4, 5 e 14 e menos abundante nas áreas 3, 6,7, 10 e Núcleo Rural do Paranoá.

Tabela 2.1- Abundância dos gêneros de nematóides em plantios de maracujazeiro e em cerrado nativo do Distrito Federal.

Tipo de cobertura	Núcleos Rurais	Áreas de coleta	Gêneros de nematóides								
			Mel	Rot	Pra	Scu	Hel	Cri	Xi	Cos	Hemi
Maracujazeiro	Lago Oeste	1	13	60	0	0	0	0	0	0	0
	Lago Oeste	2	20	0	0	0	13	44	0	0	0
	Lago Oeste	3	76	7	0	0	0	0	0	0	0
	Pipiripau	4	10	1125	0	0	0	0	0	0	0
	Pipiripau	5	26	696	0	0	17	0	0	0	0
	Pipiripau	6	3	3	0	0	3	0	0	0	0
	Pipiripau	7	30	7	0	0	0	0	0	0	0
	Pipiripau	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Pipiripau	9	337	0	0	0	3	0	0	0	0
	Gama	10	20	3	0	0	3	0	0	0	0
	Gama	11	526	0	0	0	20	0	0	0	0
	Gama	12	0	0	0	20	3	0	0	0	0
	Gama	13	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	Brazlândia	14	23	1103	3	0	0	0	0	0	0
	Brazlândia	15	37	40	0	0	87	0	0	0	0
	Brazlândia	16	183	0	7	0	52	170	0	0	0
	Paranoá	17	13	0	3	3	0	0	0	3	0
	Paranoá	18	0	0	0	20	156	0	0	0	0
	Paranoá	19	13	0	3	0	33	0	0	3	0
	Paranoá	20	36	53	0	3	73	0	0	10	0
Cerrado Nativo	NRLO		0	0	7	0	286	126	0	0	0
	NRPipiripau		0	0	0	0	0	0	3	0	0
	NRGama		123	13	0	0	0	10	0	0	0
	Brazlândia		17	30	7	0	3	3	0	0	0
	Paranoá		20	3	3	0	120	0	0	0	3

Mel: *Meloidogyne*; Rot: *Rotylenchulus*; Hel: *Helicotylenchus*; Tyl: *Tylenchus*; A: *Aphelenchus*; Aph: *Aphelenchoides*; Cri: *Criconemoides*; Dit: *Ditylenchus*; Pra: *Pratylenchus*; Scu: *Scutellonema*; Para: *Paratylenchus*; Cos: *Coslenchus*; Xi: *Xiphinema*; Hemi: *Hemicycliophora*.

NRLO-Núcleo Rural Lago Oeste; NRPIPipiripau-Núcleo Rural Pipiripau; NRGama-Núcleo Rural do Gama.

Nas áreas plantadas com maracujazeiros e de cerrado nativo ocorreram os gêneros: *Meloidogyne*, *Rotylenchulus*, *Helicotylenchus*, *Tylenchus*, *Aphelenchus*, *Aphelenchoides*, *Criconemoides*, *Ditylenchus*, *Pratylenchus*, *Scutellonema*, *Paratylenchus*, *Coslenchus*, *Xiphinema*, *Hemicycliophora* e as espécies *Rotylenchulus reniformis*, *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey, 1929) Filip'ev & Schuurmans Stekhoven, 1941 e *P. zeae* Graham, 1951. Os gêneros *Scutellonema* e *Coslenchus* ocorreram somente em plantios de maracujazeiro; os gêneros *Xiphinema* e *Hemicycliophora* ocorreram somente em cerrado nativo. Nos plantios de maracujazeiro foram obtidos maiores números de nematóides fitoparasitas por amostra. O número total de nematóides fitoparasitas, em plantios de maracujazeiro foi de 287,9 (média de 20 amostras de 200cc de solo + 10 g de raízes), enquanto que em cerrado nativo foi de 147,8 (média de 5 amostras de solo de 200cc).

No presente trabalho, foram verificados altos níveis populacionais de nematóides fitoparasitas associados à cultura do maracujazeiro no Distrito Federal, como *R. reniformis* e *Meloidogyne* spp., que atingiram, respectivamente, os números máximos de 3059 e 983 indivíduos em 200 cc de solo e, 519 e 398 indivíduos ativos em 10 g de raízes.

Tabela 2.2 - Número de exemplares de nematóides fitoparasitas e micófitagos extraídos de amostras coletadas em áreas de plantios de maracujazeiro e de cerrado nativo, em diferentes localidades do Distrito Federal, no período de julho de 2007 a janeiro de 2008.

	Mel	Rot	Hel	Tyl	A	Aph	Cri	Dit	Pra	Scu	Para	Cos	Xi	Hemi
Maracujazeiro														
Solo	9,12*	52,48	2,59	7,81	3,90	2,99	12,83	3,20	1,37	1,19	1,78	0,73	0,0	0,0
Raiz	12,64	18,30	16,64	3,27	26,27	11,05	4,29	4,16	0,95	2,41	0,0	0,0	0,0	0,0
Cerrado														
Solo	9,73	2,82	24,86	10,08	6,07	32,77	8,49	1,82	0,91	0,0	1,22	0,0	0,60	0,60

*Nematóides por 200 cc de solo ou por 10 g de raízes. Maracujazeiro: média de 20 amostras; Cerrado: média de cinco amostras; Mel: *Meloidogyne*; Rot: *Rotylenchulus*; Hel: *Helicotylenchus*; Tyl: *Tylenchus*; A: *Aphelenchus*; Aph: *Aphelenchoides*; Cri: *Criconemoides*; Dit: *Ditylenchus*; Pra: *Pratylenchus*; Scu: *Scutellonema*; Para: *Paratylenchus*; Cos: *Costenichus*; Xi: *Xiphinema*; Hemi: *Hemicyclophora*.

4 - DISCUSSÃO

O primeiro levantamento sobre a ocorrência e distribuição de nematóides fitoparasitas prejudiciais à cultura do maracujazeiro realizado na região dos Cerrados do Centro-oeste do Brasil, evidenciou que os sintomas apresentados como, crescimento e desenvolvimento reduzido, folhas bronzeadas, amarelecimento internervural, amarelecimento completo e desfolhamento, resultaram na secagem e na morte prematura gradual das plantas. Os sistemas radiculares dessas plantas apresentavam galhas de vários tamanhos e graus de desenvolvimento. No levantamento realizado no Distrito Federal, Goiás e Minas Gerais, Sharma *et al.* (1999) encontraram o seguinte percentual de ocorrência: *Meloidogyne* spp. (*M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*) (46,9%), *Rotylenchulus reniformis* (34,7%), *Pratylenchus brachyurus* (32,6%), *Helicotylenchus dihystera* (26,5%) e *Criconemella ornata* (18,4%).

É perceptível com o presente trabalho que houve um aumento significativo da ocorrência de nematóides do gênero *Meloidogyne*, no Distrito Federal, quando comparado com o levantamento realizado por Sharma *et al.* (1999) e Sharma & Junqueira (1999). Esses autores verificaram que nematóides do gênero *Pratylenchus* também foram encontrados em amostras de solo e raízes em 10% das amostras analisadas. Os mesmos autores verificaram a incidência dos nematóides *M. javanica* em algumas amostras de solo e de raízes no Distrito Federal. Diferentemente, no Kenya e Fiji, os nematóides do gênero *Meloidogyne* não são considerados problemas econômicos em maracujazeiro, sendo essa fruteira recomendada como cultura de rotação para o controle desse nematóide.

Os dados obtidos no presente trabalho elucidam o aumento da ocorrência de nematóides dos gêneros *Meloidogyne* e *Rotylenchulus*, com o decorrer dos anos no Distrito Federal, caracterizando a importância de se fazer o controle desses nematóides nas áreas plantadas. Considera-se importante a aplicação de algumas medidas de controle como, por exemplo: o revolvimento do solo, o uso de variedades resistentes, o controle químico, o controle biológico e principalmente rotação de cultura, uma vez que esta é a prática mais eficiente para diminuir a infestação de nematóides no solo.

A presença de diversos nematóides fitoparasitas em plantações de maracujazeiro, inclusive em altos níveis populacionais, indica a necessidade de estudos para determinar a relação entre os níveis populacionais e os danos à cultura, visando orientar medidas no sentido de evitar ou minimizar perdas econômicas causadas por esses patógenos.

Todos os nematóides encontrados nos plantios comerciais de maracujazeiro também foram encontrados em cerrado nativo, sugerindo que, provavelmente, os mesmos já ocorriam associados à vegetação nativa, antes da interferência humana e implantação das culturas agrícolas. Apenas *Scutellonema* spp. e *Coslenchus* spp. foram encontradas somente em plantios de maracujazeiros.

Xiphinema spp. e *Hemicycliophora* spp. ocorreram somente em cerrado nativo, o que provavelmente indica que esses nematóides são mais sensíveis às perturbações ambientais causadas pela retirada da vegetação original e implantação da agricultura ou que maracujazeiros não sejam hospedeiros das espécies encontradas desses gêneros.

O número total de indivíduos de nematóides fitoparasitas por amostra foi consideravelmente maior em plantios de maracujazeiro, indicando que a monocultura provavelmente favoreceu esses nematóides.

Diante desses resultados estima-se que algumas das espécies de nematóides encontradas possam estar envolvidas na redução do crescimento das plantas com conseqüente reflexo na queda da produção de maracujá. O nematoíde reniforme (*R. reniformis*) e os nematoídes de galhas (*M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica*) são considerados de maior importância econômica para a cultura do maracujá (McSorley, 1981; Robinson *et al.*, 1997; Ritzinger *et al.*, 2001). Neste sentido, os mesmos nematóides foram apontados por Sharma *et al.*, (1999) e Sharma & Junqueira (1999) como responsáveis pelo declínio de maracujazeiros no DF, MG e GO, o que foi igualmente verificado por Ponte (1992) nos estados da BA, CE, MA, PE, PI, RN e SE, sendo que *R. reniformis* foi encontrado apenas em PE. Assim, os resultados do presente trabalho mostram que os nematóides de maior importância para a cultura do maracujá estão presentes nas principais áreas de produção dessa fruteira no DF, servindo de alerta aos agricultores sobre a necessidade de adoção de medidas de controle desses patógenos.

5 – CONCLUSÕES

É perceptível o aumento na ocorrência de nematóides do gênero *Meloidogyne* no DF na última década.

Os nematóides de maior importância para a cultura do maracujá estão presentes nas principais áreas de produção dessa fruteira no DF.

Alguns nematóides são de ocorrência mais restrita, como *Scutelonema* spp. e *Coslenchus* spp. encontrados somente em plantios de maracujazeiro e, *Xiphinema* spp. e *Hemicycliophora* spp. presentes somente em cerrado nativo.

O gênero *Meloidogyne* foi mais abundante nas áreas 9(Pipiripau),11(Gama), 16 (Brazlândia) e Núcleo Rural do Gama, enquanto que *Rotylenchulus reniformis* foi mais abundante nas áreas 4(Pipiripau), 5(Pipiripau) e 14(Brazlândia).

A abundância de nematóides fitoparasitas é maior em plantios de maracujazeiros do que em área de vegetação nativa correspondente.

Com raras exceções, os nematóides que ocorrem nos plantios comerciais são também encontrados nas áreas nativas correspondentes.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria, 502p. 2007.
- AGUIAR, J. L. P. de; SPERRY, S. & JUNQUEIRA, N. T. V. A produção de maracujá na região do cerrado: caracterização socioeconômica. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 30p. 2001. (Embrapa Cerrados. Circular Técnica, 19).
- COOLEN, W.A. & D'HERDE, C.J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent: State Nematology and Entomology Research Station, 77p. 1972.
- FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. & BRAGA, M.F. Pesquisa e desenvolvimento do maracujá no Brasil. In: SILVA, A.G.; ALBUQUERQUE, A.C.S.; MANZANO, N.T.; SILVA, R.C. & RUSSELL, N.C. (Eds.). Agricultura Tropical: Quatro Décadas de Inovações Tecnológicas, Institucionais e Políticas. 1 ed. Brasília: Embrapa, 2008.
- HOOPEL, D.J. Handling, fixing, staining and moulting nematodes. In: SOUTHEY, J.F. (Ed.). Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. London: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, p.59-80. 1986.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter 48:692. 1964.
- JUNQUEIRA, N.T.V.; ANJOS, J.R.N. dos; SHARMA, R.D.; SANZONWICZ, C. & ANDRADE, L.R.M.de. Doenças do Maracujazeiro. In: Encontro de Fitopatologia, 3., 1999, Viçosa, MG. Doenças de Fruteiras Tropicais. Palestras. Viçosa:UFV, 83-115 p. 1999.
- Mc SORLEY, R. Plant-parasitic nematodes associated with tropical and subtropical fruits. Gainesville: University of Florida: Institute of Food and Agricultural Sciences, 49p. 1981. (Bulletin, 823).
- MELETTI, L.M.M. & BRUCKNER, C.H. Melhoramento genético. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. (Eds.). Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, Mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes. p.345-385. 2001.
- PONTE, J. J. da. The yellow passion fruit plant nematodes in the northeast of Brasil. Nematologia Brasileira 16:77-79. 1992.

RITZINGER, C.H.S.P.; SHARMA, R.D. & JUNQUEIRA, N.T.V. Nematóides. In: SANTOS FILHO, H.P. (Org.). Aspectos fitossanitários do maracujá amarelo e maracujá doce. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 2001.

ROBINSON, A. F.; INSERRA, R. N.; CASWELL-CHEN, E.P.; VOVLAS, N. & TROCOLLI, A. *Rotylenchulus* Species: Identification, distribution, host ranges, and crop plant resistance. *Nematropica* 27:127-180. 1997.

SEINHORST, J.W. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerine. *Nematologica* 4:67-69. 1959.

SHARMA, R. D. & JUNQUEIRA, N. T. V. Nematóides fitoparasitas associados ao maracujazeiro no Cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados (Embrapa Cerrados. Pesquisa em andamento, 22). 2 p. 1999.

SHARMA, R. D.; RITZINGER, C. H. S. P.; JUNQUEIRA, N. T. V. & GOMES, A. C. Reação de genótipos de maracujá-azedo ao nematóides *Rotylenchulus reniformis*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 86. 14 p. 2003.

SHARMA, R.D.; JUNQUEIRA, N. T. V. & GOMES, A.C. Nematóides nocivos ao maracujazeiro. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 4 p. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 4). 1999.

CAPÍTULO 3

VARIABILIDADE GENÉTICA DE MARACUJAZEIROS OBTIDOS EM PLANTAÇÕES COMERCIAIS DO DISTRITO FEDERAL COM BASE EM MARCADORES RAPD.

RESUMO

A base genética do maracujazeiro-azedo comercial para resistência a doenças é relativamente estreita. O estudo da variabilidade genética de acessos de maracujazeiro com importância comercial, paralelo aos estudos baseados nas análises de características agronômicas relacionadas à resistência a nematóides fitoparasitas é fundamental para o melhoramento genético e, em consequência, para o crescimento da produção que se encontra em plena expansão no Brasil. Neste trabalho, objetivou-se caracterizar a variabilidade genética de acessos comerciais de maracujazeiros cultivados no Distrito Federal, com base em marcadores moleculares RAPD. Para análise do material genético, foram coletadas amostras de 30 acessos, sendo 24 de maracujazeiro-azedo, representando plantações comerciais de 14 propriedades do Distrito Federal, três híbridos de maracujazeiro-azedo, recentemente lançados pela Embrapa Cerrados e parceiros (BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro Vermelho e BRS Gigante Amarelo), um acesso de material do comércio local e dois acessos de maracujazeiro-doce, utilizados como *outgroup*. O DNA genômico de cada acesso foi extraído utilizando o método do CTAB e amplificado pela técnica de RAPD. Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre os diferentes acessos. A análise de agrupamento realizada com base nas distâncias genéticas permitiu a separação dos dois acessos de maracujazeiro-doce (*outgroup*) e a formação de vários grupos de acessos, evidenciando a variabilidade genética entre os mesmos. O posicionamento gráfico do híbrido BRS Ouro Vermelho confirma a maior contribuição deste material para a variabilidade genética dos materiais comerciais de maracujazeiro-azedo. A dispersão dos demais acessos evidencia as diferentes origens genéticas dos materiais utilizados pelos produtores de maracujá do Distrito Federal. Estes resultados servirão de subsídio a futuros trabalhos de seleção de recursos genéticos com importantes genes relacionados à produtividade, adaptabilidade e resistência a doenças, valiosos para trabalhos de melhoramento visando o desenvolvimento de variedades recomendadas para a região.

ABSTRACT

The genetic basis for disease resistance in the commercial sour passion fruit is relatively narrow. The studies on the genetic variability of accessions of *Passiflora* spp. with commercial appeal, in parallel with studies of analyses of characteristics related to resistance to plant-parasitic nematodes are of capital importance for breeding programs and to increase yield of passion fruit, a crop that is currently in full expansion in Brazil. The objective of this study was to characterize the genetic variability in commercial accessions of passion fruit planted in the Brazilian Federal District, on the basis of molecular markers, RAPD. For analysis of the genetic materials, leaf samples of 30 accessions of passion fruit had been collected, including 24 from sour passion fruit, representing 14 commercial plantations in the Brazilian Federal District, three hybrids of sour passion fruit recently released by Embrapa Cerrados and partners (BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro Vermelho and BRS Gigante Amarelo), one accession of material of the local market, and two accessions of sweet passion fruit, considered as *outgroup*. Genomic DNA had been extracted using the method of CTAB, with modifications. DNA samples of each accession had been amplified by RAPD technique. RAPD markers generated had been converted into a matrix of binary data, from which the genetic distances between the different accessions had been estimated. Clustering analysis based on the genetic distances allowed to separate the two sweet passion fruit accessions (*outgroup*), and to build-up various clusters of sour passion fruit accessions, supporting the wide range of genetic variability enclosed in these accessions. The graphical positioning of the hybrid BRS Ouro Vermelho confirms its major contribution for the genetic variability of the commercial accessions of sour passion fruit planted in the sampled areas. Dispersal of genetic distances among the commercial accessions of sour passion fruit supports the evidence that the materials planted by growers in DF came from different genetic origin.

Present results gives support for further works for selection of genetic resources with important genes related to fruit yield, adaptability and resistance t diseases, valuable for breeding programs aiming the development of varieties to be recommended for this region.

1 - INTRODUÇÃO

O maracujá, no Brasil, gera R\$500 milhões anuais, emprega 250.000 pessoas e pode gerar de 5 a 6 empregos diretos e indiretos por hectare durante 2 anos, com apenas R\$12.000,00 de investimentos, fazendo com que tal cultura seja uma excelente alternativa para o agronegócio (Lima, 2001). No Distrito Federal o maracujá, principalmente o maracujá-azedo, é cultivado por pequenos e médios agricultores com produtividades médias em torno de 12 ton/ha/ano. Esta produtividade está bem abaixo daquelas obtidas por variedades geneticamente melhoradas obtidas pelo Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Cerrados. Apesar das baixas produtividades, o Brasil é atualmente, o maior produtor e o maior consumidor de maracujá do mundo (Faleiro *et al.*, 2008).

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

Nos últimos anos, a cultura apresentou produtividade crescente, na região do Cerrado, entretanto, a média nacional ainda é considerada baixa quando analisado seu potencial produtivo, principalmente em condições experimentais (Borges *et al.*, 2005).

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

O plantio comercial de maracujazeiro, no Distrito Federal, tem sido atacado por pragas e doenças, causando perdas expressivas na cultura. O desenvolvimento de cultivares com resistência a doenças é uma alternativa para essa cultura porque envolve medidas de segurança para o trabalhador agrícola e consumidor, preservação do ambiente, redução de custos de produção, qualidade mercadológica, entre outros, sendo uma demanda atual para as pesquisas em maracujazeiros (Faleiro *et al.*, 2005b; Faleiro *et al.*, 2006a).

Os recursos genéticos vêm surgindo como uma ferramenta importante e expressiva para a busca de resistência contra os fitopatógenos, sendo assim, utilizadas para trabalhos de melhoramento visando ao desenvolvimento de variedades resistentes recomendadas para a região.

Como a variabilidade genética das atuais cultivares comerciais a doenças é reduzida, a busca de fontes de resistência é uma atual demanda para a pesquisa. Espécies silvestres de maracujá nativas e espontâneas no Cerrado são alternativas para a ampliação da base genética da resistência a diversas doenças, que podem ser combinadas com características de produtividade e qualidade de frutos em programas de melhoramento genético (Faleiro *et al.* 2006b). A transferência de genes de resistência de espécies silvestres para as comerciais tem sido feita na Embrapa Cerrados e parceiros, por meio de hibridações interespecíficas seguidas de um programa de retrocruzamentos visando a recuperação das características agronômicas das cultivares comerciais, mantendo-se o(s) gene(s) de resistência das espécies silvestres.

Uma vez que a base de qualquer programa de melhoramento genético é a variabilidade genética, estudos desta variabilidade em plantações comerciais de espécies essencialmente alógamas como o maracujá podem revelar recursos genéticos de grande valor, com relação a características agronômicas relacionadas à produtividade, adaptabilidade e resistência a doenças. Segundo Junqueira *et al.* (2003), estudos em populações comerciais de maracujazeiro-azedo têm mostrado que existe pouca variabilidade genética quanto à resistência a doenças. De acordo com Pio Viana *et al.* (2003), estudos de genótipos de maracujazeiro-azedo cultivados no Rio de Janeiro, baseados em características morfo-agronômicas e marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) também não mostraram expressiva variabilidade genética.

Por outro lado, Faleiro *et al.* (2005a), também utilizando marcadores RAPD, verificaram a existência de variabilidade genética entre variedades comerciais, subsidiando trabalhos de seleção em plantações comerciais, tendo em vista a utilização desses materiais em programas de melhoramento genético. É importante mencionar, as vantagens do uso da tecnologia de marcadores moleculares RAPD, pelo fato de existir um número ilimitado desses marcadores, os quais não estão sujeitos a efeitos ambientais, apresentando, assim, vantagens em relação a outros marcadores, como os morfológicos, além de poderem ser determinados em qualquer tipo de tecido ou estágio de desenvolvimento da planta (Gomes *et al.*, 2005).

Neste estudo, objetivou-se confirmar e quantificar a variabilidade genética de maracujazeiro em plantações comerciais do Distrito Federal, fazendo uso dos marcadores do

tipo RAPD e fazer uma comparação com os atuais híbridos de maracujazeiro lançados pela Embrapa Cerrados e parceiros.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais genéticos analisados no presente trabalho foram 30 acessos, sendo 24 de maracujazeiro-azedo, representando plantações comerciais de 14 propriedades do Distrito Federal, três híbridos de maracujazeiro-azedo, recentemente lançados pela Embrapa Cerrados e parceiros (BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro Vermelho e BRS Gigante Amarelo), um acesso representando material do comércio local e dois acessos de maracujazeiro-doce, utilizados como *outgroup* (Figura 3.1).

Folhas de cada um dos acessos foram coletadas e o DNA genômico extraído utilizando o método do CTAB, com modificações (Faleiro *et al.*, 2003). Amostras de DNA foram amplificadas pela técnica de RAPD. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 μ L, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 100 μ M de cada um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 μ M de um “primer” (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Para obtenção dos marcadores RAPD foram utilizados 10 *primers* decâmeros: OPD (03), OPE (5 e 16), OPF (02, 04 e 7), OPG (02 e 03), OPH (05 e 10). As amplificações foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência: 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 35 °C e 90 segundos a 72 °C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de seis minutos a 72 °C e, finalmente a temperatura foi reduzida para 4 °C. Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 μ 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 os diferentes acessos, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, utilizando-se o Programa Genes (Cruz, 1997). A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar as análises de agrupamento com o auxílio do Programa Statistica (Statsoft Inc., 1999), utilizando como critério de agrupamento o método do UPGMA. Ainda com base na matriz de distâncias genéticas, foi realizada a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o

método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS e Statistica (Statsoft Inc., 1999).

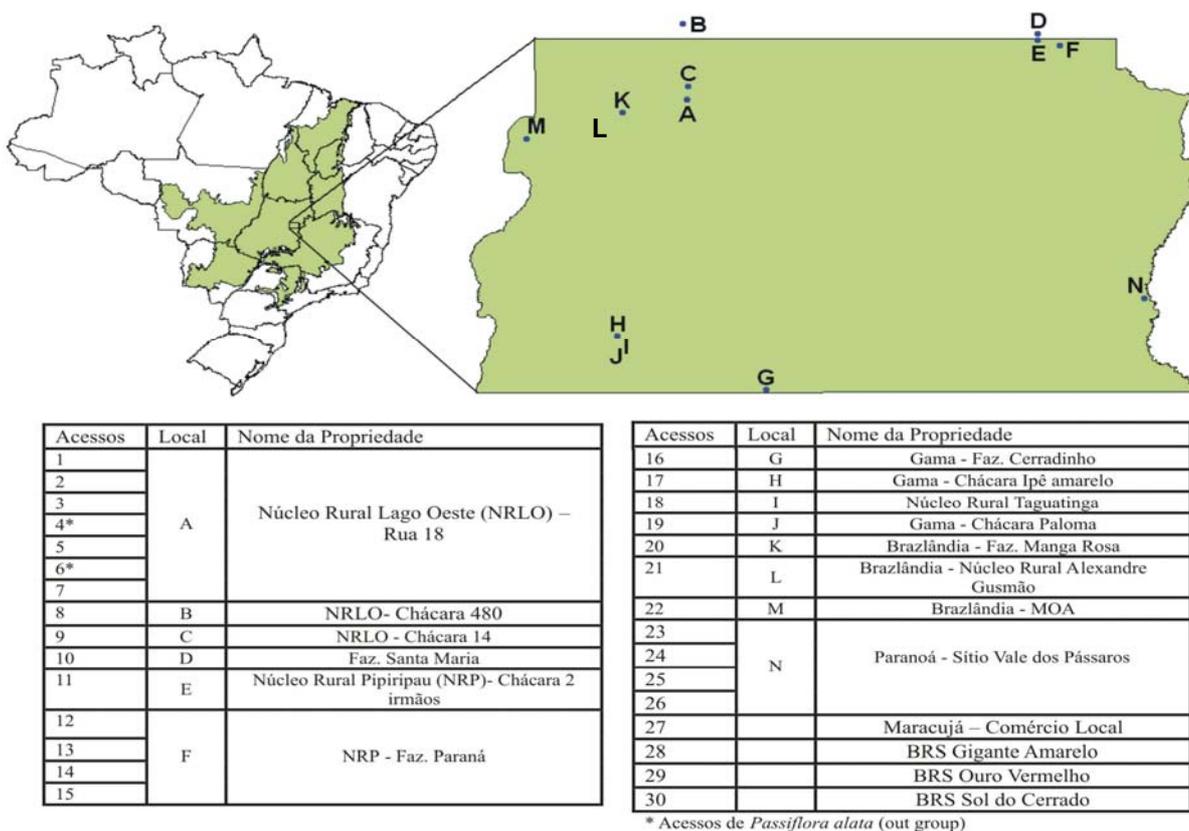


Figura 3.1 - Pontos de coleta de acessos de maracujazeiro em plantações comerciais no Distrito Federal (A a N). O acesso 27 foi obtido a partir de sementes adquiridas no comércio local e os acessos 28, 29 e 30 são híbridos lançados recentemente pela Embrapa Cerrados e parceiros.

3 – RESULTADOS

Os 10 *primers* decâmeros (Tabela 3.1) geraram um total de 99 marcadores RAPD, perfazendo uma média de 9,9 marcadores por *primer*. Dos 99 marcadores, 91 foram verificados nos acessos de maracujazeiro-azedo e apenas 18 (19,78%) foram monomórficos.

As distâncias genéticas entre os 30 acessos de maracujazeiro variaram entre 0,033 e 0,438 (dados não apresentados). As maiores distâncias genéticas foram verificadas entre o híbrido BRS Ouro Vermelho e os demais acessos.

Tabela 3.1 - “*Primers*” utilizados para obtenção dos marcadores RAPD e respectivos número de bandas polimórficas e monomórficas em genótipos de maracujazeiros.

	Primer	Seqüência 5'→3	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas monomórficas
03	OPD-	GTCGCCGTCA	11	1
05	OPE-	TCAGGGAGGT	11	0
16	OPE-	GGTGACTGTG	12	0
02	OPF-	GAGGATCCCT	4	1
04	OPF-	GGTGATCAGG	10	3
07	OPF-	CCGATATCCC	5	3
02	OPG-	GGCACTGAGG	3	2
03	OPG-	GAGCCCTCCA	1	5
05	OPH-	AGTCGTCCCC	10	2
10	OPH-	CCTACGTCAG	6	1
			73	18

A análise de agrupamento realizada com base nas distâncias genéticas (Figura 3.2), permitiu a separação dos dois acessos de maracujazeiro-doce (*outgroup*) e a formação de vários grupos de acessos, evidenciando a variabilidade genética entre os mesmos.

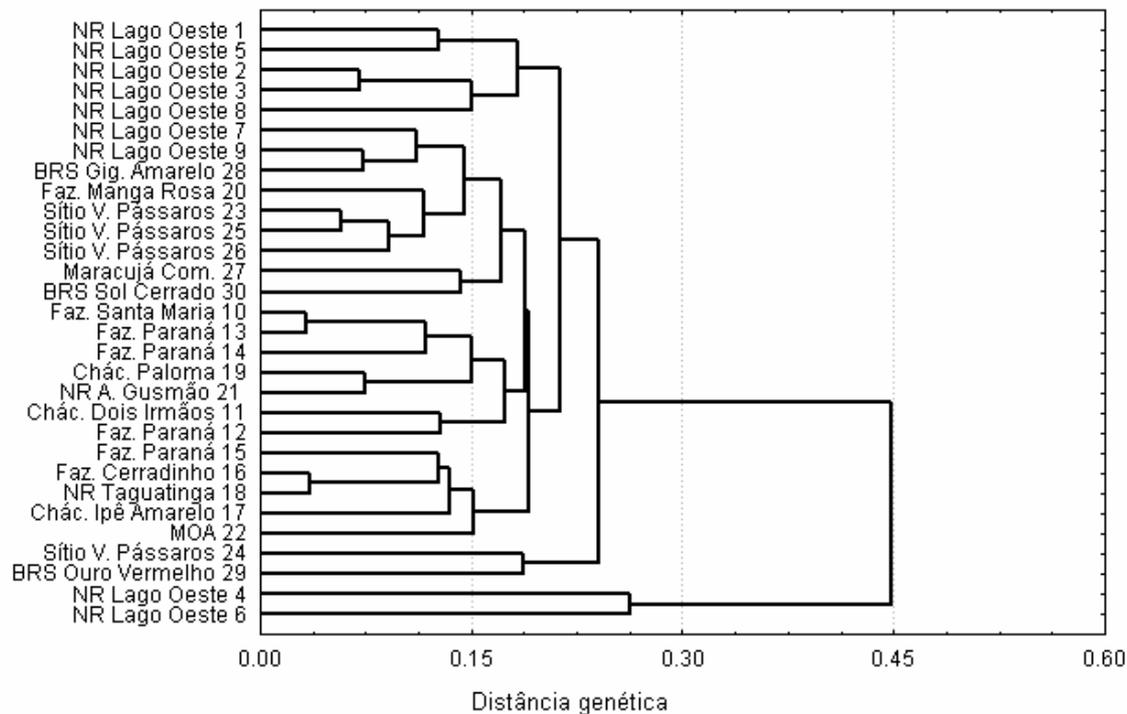


Figura 3.2 - Análise de agrupamento de 30 acessos de maracujazeiros, obtidos em plantações comerciais do Distrito Federal (1 a 26), no comércio local (27) e de híbridos lançados pela Embrapa Cerrados (28 a 30). Sendo os acessos 4 e 6 de maracujá-doce considerados (outgroup) com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando 99 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento. Os números correspondem aos acessos da Figura 3.1.

O gráfico de dispersão (Figura 3.3) também construído com base na matriz de distâncias genéticas entre os acessos de maracujazeiros evidencia a separação dos dois acessos de maracujazeiro-doce (outgroup) daqueles de maracujá-azedo. O híbrido BRS Ouro Vermelho surgiu também em posição destacada dos demais genótipos de maracujá-azedo, evidenciando sua contribuição para a variabilidade genética dos materiais comerciais de maracujazeiro-azedo.

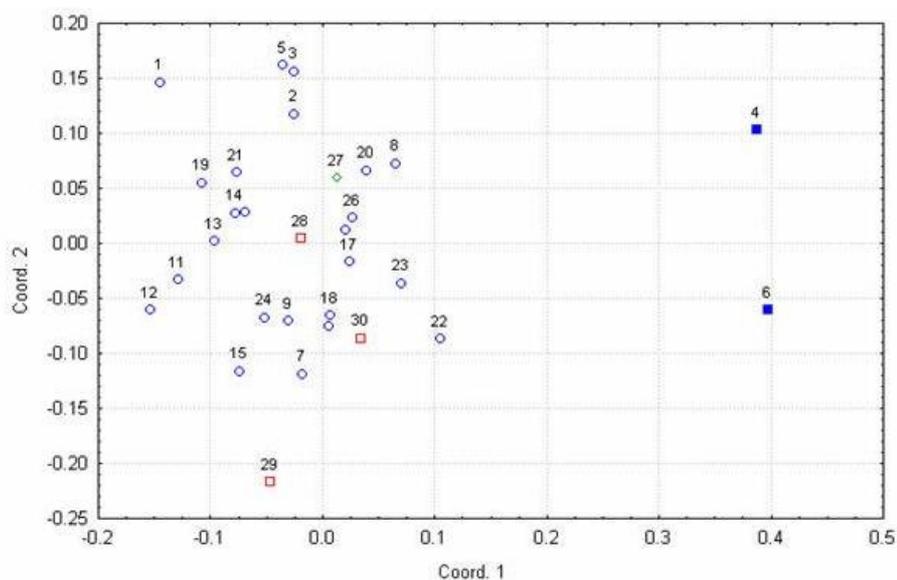


Figura 3.3. - Dispersão gráfica de 30 acessos de maracujazeiro, obtidos em plantações comerciais do Distrito Federal, no comércio local e Embrapa Cerrados, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando 99 marcadores RAPD. Os números correspondem aos acessos do Quadro 3.1, sendo híbridos lançados pela Embrapa Cerrados (○), acesso comercial (◇), maracujazeiro-azedo (◐) e maracujazeiro-doce (■).

4 – DISCUSSÃO

A alta média de marcadores por *primer* e a baixa percentagem de marcadores monomórficos evidenciam a variabilidade genética dos acessos analisados. Este resultado está de acordo com Faleiro *et al.* (2005a) que também verificaram variabilidade genética em algumas variedades comerciais de maracujá e a importância desses materiais para a ampliação da variabilidade genética dos programas de melhoramento do maracujazeiro.

Entre os acessos comerciais analisados, merece destaque o BRS Ouro Vermelho, como um dos mais distantes em relação aos demais acessos. Esta observação é respaldada pelo envolvimento de espécies silvestres na genealogia e no desenvolvimento deste híbrido. Bellon *et al.* (2005), analisando acessos comerciais e silvestres de *P. edulis*, verificaram que os acessos silvestres foram os que mais contribuíram para a ampliação da base genética. Distâncias genéticas elevadas também foram verificadas entre os acessos de maracujazeiro-doce e os acessos de maracujazeiro-azedo, respaldando a técnica de RAPD utilizada para quantificar a variabilidade genética.

De acordo com Lopes (1991), o gênero *Passiflora* é originário da América do Sul, com o Centro-Norte do Brasil, sendo seu maior centro de dispersão geográfica, fato que pode explicar a grande variabilidade dos acessos estudados.

Pio Viana *et al.* (2003) avaliaram a diversidade genética entre acessos de espécies do gênero *Passiflora* através da técnica de RAPD e observaram que há grande variabilidade genética entre as espécies *P. foetida*, *P. alata*, *P. gibertii*, *P. suberosa*, *P. cincinnata*, *P. maliformis* e *P. edulis f. edulis*, tendo as espécies *P. edulis f. flavicarpa* e *P. gibertii* sido as mais distantes entre as espécies estudadas. *P. cincinnata* e *P. edulis f. edulis* formaram um grupo, sugerindo que elas compartilhem uma similaridade genética. O mesmo foi observado entre as espécies *P. foetida* e *P. suberosa*.

Segundo Ganga *et al.* (2004), um dos fatores que podem explicar a elevada diversidade genética existente entre as espécies de maracujazeiro é o fato da maioria das espécies serem alógamas, com presença de um sistema genético de auto-incompatibilidade que favorece a polinização cruzada e, conseqüentemente, o fluxo gênico entre genótipos distintos, inclusive entre espécies.

Na análise de agrupamento, chama a atenção o grupo formado entre o híbrido BRS Ouro Vermelho e o acesso coletado no Sítio Vale dos Pássaros. Este agrupamento é justificado pela montagem de unidades demonstrativas da Embrapa Cerrados nessa propriedade com os híbridos recentemente lançados pela Embrapa, incluindo o BRS Ouro Vermelho. Estes materiais citados acima podem ter a mesma origem genética.

O posicionamento diferenciado do híbrido BRS Ouro Vermelho no gráfico de dispersão confirma a maior contribuição deste material para a variabilidade genética dos materiais comerciais de maracujazeiro-azedo. Este híbrido, lançado recentemente pela Embrapa Cerrados e parceiros, tem apresentado em condições experimentais e comerciais alta produtividade, qualidade físico-química de frutos, além de maior tolerância e resistência a doenças (Junqueira *et al.*, 2008)

A dispersão dos demais acessos evidencia as diferentes origens genéticas dos materiais utilizados pelos produtores de maracujá do Distrito Federal. Estes resultados subsidiam futuros trabalhos de seleção de recursos genéticos com importantes genes relacionados à produtividade, adaptabilidade e resistência a doenças, valiosos para trabalhos de melhoramento visando ao desenvolvimento de variedades recomendadas para a região.

5 - CONCLUSÕES

Com o uso de marcadores moleculares RAPD é possível analisar e quantificar, de forma rápida e segura, a variabilidade genética entre os acessos de maracujazeiro de plantações comerciais do Distrito Federal.

Verifica-se a existência de diferentes origens genéticas dos maracujazeiros em cultivo no Distrito Federal, evidenciando a ampla base genética e a importância desses materiais para futuros trabalhos de seleção visando, principalmente, a adaptabilidade e a resistência e tolerância a doenças, incluindo a nematóides fitoparasitas.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELLON, G.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, K.P.; PAULA, M.S.; BRAGA, M.F.; JUNQUEIRA, N.T.V. & PEIXOTO, J.R. Diversidade genética de acessos comerciais e silvestres de maracujazeiro-doce com base em marcadores RAPD. In : Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F.; Pinto, A.C.Q. & Sousa, E.S. (Eds.) IV Reunião Técnica de Pesquisas em Maracujazeiro – Trabalhos apresentados. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p.118-121. 2005.

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. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p.619-639. 2005.

BRAGA, M.F.; SILVA, J.R.S.; RUGGIERO, C.; BARROS, A.M.; VASCONCELOS, M.A.S.; BATISTA, A.D.; DUTRA, G.A.P. & PEIXOTO, M. Demandas para as pesquisas visando à exploração diversificada. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. & BRAGA, M.F. Maracujá: demandas para a pesquisa. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p.37-40. 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. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p.475-506. 2005.

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

DHAWAN, K.; DHAWAN, S. & SHARMA, A. *Passiflora* a review update. Journal of Ethnopharmacology 94:1-23. 2004.

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, (Comunicado Técnico N°92) 6 p. 2003.

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. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p.187-210 2005a.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; BELLON, G.; LAGE, D.A.C.; FERREIRA, U.O.C. & SANTOS, J.B. Caracterização molecular e morfológica da espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* silvestre no cerrado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 2005, Passo Fundo. **Anais**. CD-ROM (Artigo 7398), 2005b.

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

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

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. & BRAGA, M.F. Pesquisa e desenvolvimento do maracujá no Brasil. In: SILVA, A.G.; ALBUQUERQUE, A.C.S.; MANZANO, N.T.; SILVA, R.C. & RUSSELL, N.C. (Eds.). Agricultura Tropical: Quatro Décadas de Inovações Tecnológicas, Institucionais e Políticas. 1 ed. Brasília: Embrapa, p. 411-416 2008.

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

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

GANGA, R. M. D.; RUGGIERO, C.; LEMOS E.G.M.; GRILI, G. V. G.; GONÇALVES, M. M.; CHAGAS, E. A. & WICKERT, E. Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares AFLP. Revista Brasileira de Fruticultura, vol. 26, n. 3, 494-498 p., dez. 2004.

GOMES, E.W.F.; WILLADINO, L.; MARTINS, L.S.S.; SILVA, S. de O. & CAMARA, T. R. Variabilidade genética de genótipos de bananeira (*Musa* spp.) submetidos ao estresse salino. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental 9: 171-177. 2005.

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

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

JUNQUEIRA, N.T.V.; FALEIRO, F.G.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R.; BORGES, R.S.; ARAÚJO, S.C.B.; ANJOS, J.R.N.; TUPINAMBÁ, D.D.; ANDRADE, S.R.M.; COSTA, A.M.; LIMA, A.A.; LARANJEIRA, F.F.; POLTRONIERE, L.S.; VASCONCELLOS, M.A.S.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, K.P.; LAGE, D.A.C.; SANTOS, E.C.; VAZ, C.F.; SOUZA, L.S.; SILVA, D.G.P. & LIMA, C.A. BRS Ouro Vermelho: híbrido de maracujazeiro-azedo com maior quantidade de vitamina C. (Embrapa Cerrados, Folder Técnico).2008.

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

LOPES, S.C. Citogenética do maracujá, *Passiflora* spp. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. (Eds.) A cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEP, 201-209p. 1991.

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

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

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. p.55-78. 2005.

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

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

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. p.457-463. 2005.

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

STEPHEN, K.; MCFERSON, J.R. & WESTMAN, A.L. Using molecular markers in genebanks: identify, duplication, contamination and regeneration, Analysis, Characterization and Conservation of PGR. 16p. 1997.

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

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

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

CAPÍTULO 4

RESISTÊNCIA DE ACESSOS COMERCIAIS E SILVESTRES DE *PASSIFLORA* A *MELOIDOGYNE INCOGNITA* EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO.

RESUMO

Tem-se que a etapa básica de todo programa de melhoramento genético é a identificação de fontes de resistência. Com esse intuito, buscou-se nesse trabalho avaliar a reação de diferentes espécies e acessos de *Passiflora*, incluindo espécies comerciais e silvestres, a uma população do nematóide de galhas sob condições de casa de vegetação. Nove genótipos de maracujazeiros foram avaliados para resistência a *Meloidogyne incognita* em condições de casa de vegetação da Estação Experimental de Biologia da Universidade Brasília, seguindo o delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições. Os genótipos avaliados foram G1= *P. capsularis*, G2= *P. setacea*, G3= *P. nitida*, G4= *P. alata* (N), G5= *P. alata* (J), G6= BRS Sol do Cerrado, G7= BRS Gigante amarelo, G8= BRS Ouro vermelho e G9= maracujá azedo obtido no comércio local. Cada parcela foi constituída de uma planta/vaso, contendo solo esterilizado. Após 96 dias do plantio das mudas, as plantas foram inoculadas com 2200 juvenis (J2)/ovos do nematóide. Após 62 dias da inoculação foram avaliados as seguintes variáveis: comprimento e diâmetro da parte aérea, número de folhas, peso fresco da parte aérea, peso seco da parte aérea, peso fresco da raiz, número de galhas por planta, número de massas de ovos por planta, número de ovos por massa de ovos, número total de nematóides no solo e na raiz e o fator de reprodução. Todos os genótipos, de acordo com o fator de reprodução comportaram como resistentes nas condições do experimento, embora existam diferenças entre os genótipos com base em outras características relacionadas à resistência.

ABSTRACT

A basic step in a breeding program is the identification of sources of resistance. With this objective, in this study it was evaluated the reaction of nine different commercial and wild species of *Passiflora*. to a population of the root-knot nematode (*M. incognita*) under greenhouse conditions. The assay was carried out in the Biology Experimental Station of the University of Brasília, following a completely randomised design, with 10 replications and nine genotypes: G1= *P. capsularis*, G2= *P. setacea*, G3= *P. alata* (J), G4= BRS Sol do Cerrado, G5= BRS Ouro vermelho, G6= Gigante amarelo (GA2), G7= *P. alata* (N), G8= *P. nitida*, and G9= Commercial. The experiment unit was one plant per pot. Each seedling was planted in a pot filled with 2 l of soil sterilized. Ninety-six days after planting, the plants were inoculated with 2200 J2/eggs of the nematode. . Sixty-two days after inoculation the experiment was evaluated as follows: length and diameter of stem; number of leaves, fresh shoot weight; dry shoot weight, fresh root weight, number of galls per plant, number of egg mass per plant, number of eggs per egg mass, total number of nematodes in soil and roots, and the factor of reproduction. According to the factor of reproduction, all plant genotypes reacted as resistant under the conditions of this experiment. Although, differences between genotypes had been observed for other characters related to resistance.

1- INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* é originário da América do Sul e tem no centro-norte do Brasil, o maior centro de distribuição geográfica (Lopes, 1991).

O Brasil é atualmente, o maior produtor e consumidor mundial de maracujá (Faleiro *et al.*, 2008). A importância do cultivo do maracujazeiro no Brasil deu-se a partir da década de 70. A produtividade média no Brasil é baixa tendo como causas a baixa qualidade genética dos materiais utilizados nos plantios, uma vez que muitos produtores retiram as sementes dos frutos dos seus próprios pomares. Esse sistema de produção de mudas resulta na elevada variabilidade dos pomares, sendo os problemas ampliados com a auto-incompatibilidade do maracujá e conseqüentes problemas relacionados à endogamia. Outro fator que caracteriza o baixo nível tecnológico na produção do maracujazeiro-azedo no Brasil é a baixa produtividade em decorrência dos problemas fitossanitários, em que os patógenos de solo estão entre os mais importantes economicamente.

De acordo com Junqueira *et al.* (2002; 2005) espécies silvestres de *Passiflora* têm apresentado resistência a doenças provocadas por patógenos de solo e com isso, a sua utilização como porta-enxerto seria uma alternativa de controle de doenças provocadas por nematóides.

Muitos são os registros sobre o ataque do nematóide de galhas em espécies de *Passiflora* (McSorley, 1981; Klein *et al.*, 1984; Cohn & Duncan, 1990). Resultados baseados em índice de massas de ovos e número de galhas mostraram a suscetibilidade de *P. edulis* (nativo) ao nematóide de galhas (Ponte *et al.*, 1976). Diferentemente verificado por Kirby (1978), plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener inoculadas com *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood e *M. javanica* (Treub) Chitwood apresentaram galhas, porém não foi evidenciada a reprodução do nematóide. Segundo Klein *et al.* (1984), as espécies *P. serratodigitata* L., *P. maliformis* L. e *P. alata* Curtis mostraram-se suscetíveis, enquanto *P. caerulea* L. e *P. edulis*, como resistentes. No que tange às espécies silvestres, Silva Júnior *et al.* (1988) verificaram em seus estudos que *P. macrocarpa* Mast. mostrou-se resistente a *M. incognita*. No estudo realizado por Paula (2006), foi verificado que *M. incognita* e *M. javanica* de maneira geral, reduziram o desenvolvimento vegetativo das plantas das espécies de *Passiflora*, exceto em alguns casos, nos quais houve estímulo ao desenvolvimento de plantas inoculadas com *M. javanica*. Além disso, verificou que as espécies comerciais, *P. setacea*, *P. odontophylla* Harms ex Geaziou, *P. edulis* nativo e o híbrido *P. coccinea* Aubl. vs. *P. setacea*

se comportaram como resistentes a *M. incognita*. Também observou que todas as espécies estudadas comportaram-se como resistentes a *M. javanica*.

Assim, outros estudos se fazem necessários para buscar fontes adicionais de resistência nas diferentes espécies de maracujazeiro.

Neste trabalho, objetivou-se verificar a reação de diferentes espécies de *Passiflora*, incluindo três silvestres, dois acessos de maracujá-doce e quatro de maracujá azedo, incluindo três híbridos recentemente lançados pela Embrapa Cerrados e parceiros e um acesso obtido no comércio local, quanto a ação de uma população de nematóides de galhas radiculares (*M. incognita*).

2-MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília, no período de janeiro a julho de 2008. A população do nematóide usada como inóculo foi oriunda de solo do município de Santos Dumont (MG), trazido para a Embrapa Cerrados, onde foi cultivado a espécie de *P. capsularis* que apresentou sintomas marcantes de infecção (Figura 4.1A). Posteriormente o nematóide foi identificado como *M. incognita* por meio do padrão perineal (Figura 4.1B) e do perfil de esterase do nematóide (Figura 4.1C). Em seguida, foi retirada de algumas fêmeas suas respectivas massas de ovos que foram transferidas para vasos distintos para a multiplicação do inóculo puro a partir de uma única fêmea. O inóculo permaneceu nas plantas de tomate cv. Santa Clara por 96 dias.

Sementes de nove genótipos de maracujazeiros silvestres e comerciais foram usadas para a obtenção das mudas (Quadro 4.1).

Decorridos então, 96 dias do plantio, as plantas foram inoculadas com inóculo preparado a partir da metodologia de Hussey & Barker (1973), modificada por Bonetti (1981). As raízes de tomateiro com galhas foram cortadas em pedaços de aproximadamente 0,5 cm de comprimento e trituradas em liquidificador por 30 segundos. Em seguida, a suspensão foi vertida em peneira de 60 mesh e depois em peneira de 500 mesh, que foi lavada em água corrente. Os ovos/juvenis retidos na última peneira foram recolhidos e contados para estimar as quantidades que seriam colocadas em cada uma das plantas de maracujazeiro.

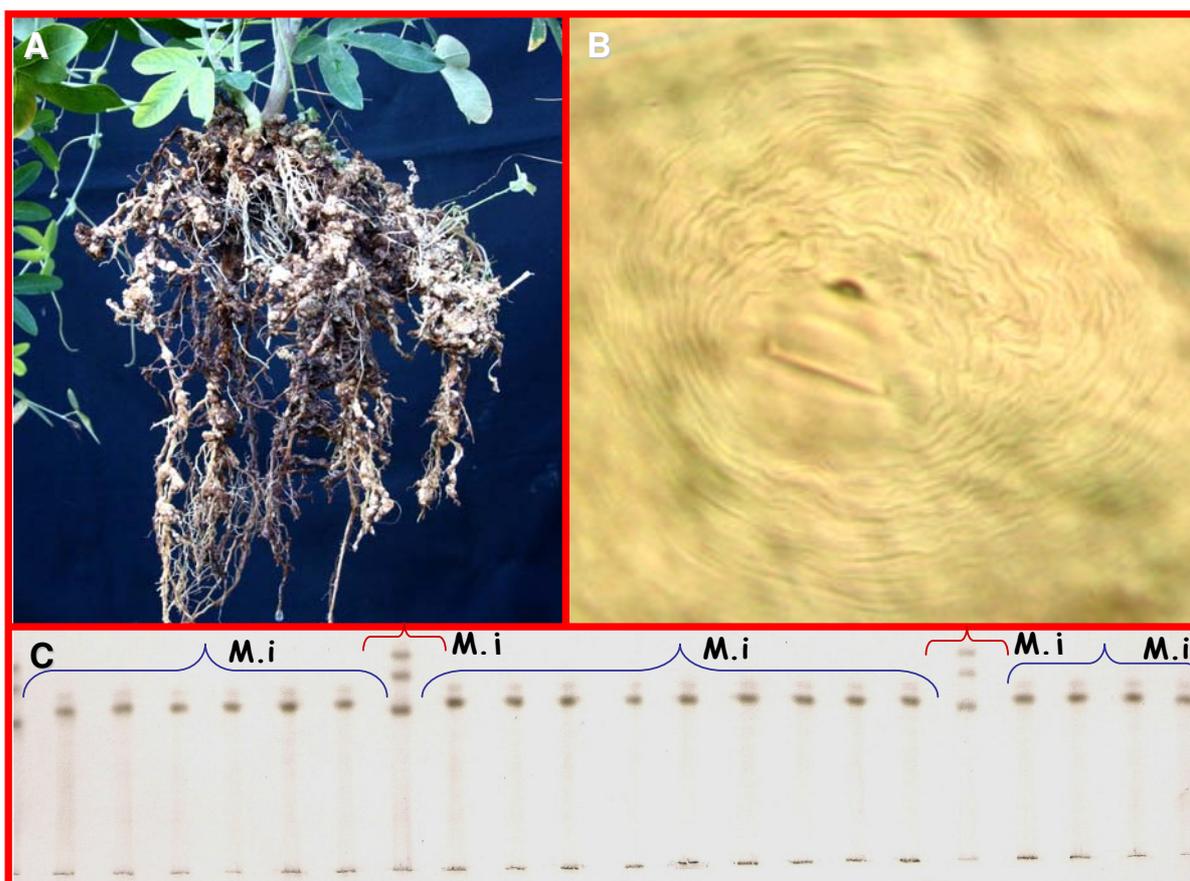


Figura 4.1 - A- Galhas causadas por *Meloidogyne incognita* em *Passiflora capsularis*;
 B - impressão perineal; C - gel de eletroforese evidenciando o perfil de esterase do nematóide.

Quadro 4.1 - Genótipos de *Passiflora* avaliados.

Genótipos	
G1 - <i>P. capsularis</i>	Silvestre
G2 - <i>P. setacea</i>	Silvestre
G3 - <i>P. nitida</i>	Silvestre
G4 - <i>P. alata</i> (N)	Maracujá - doce
G5 - <i>P. alata</i> (J)	Maracujá - doce
G6 - BRS Sol do Cerrado	Híbrido de maracujazeiro azedo comercial
G7 - BRS Ouro vermelho	Híbrido de maracujazeiro azedo comercial
G8 - BRS Gigante amarelo	Híbrido de maracujazeiro azedo comercial
G9 - Comercial	Maracujá azedo comercial

A inoculação das plantas de maracujazeiro com *M. incognita* foi feita utilizando-se aproximadamente 2.200 ovos/juvenis por planta de maracujazeiro (Figura 4.2 A).

O experimento foi conduzido utilizando o delineamento inteiramente casualizado. Cada um dos genótipos teve 10 plantas inoculadas e 4 plantas não inoculadas (controle). As plantas foram mantidas em casa de vegetação sob temperatura que variou de 18 a 29 °C e umidade, de 30 a 90%.



Figura 4.2 - **A** -Momento da inoculação dos nematóides; **B**- Avaliação das plantas em casa de vegetação.

O experimento foi avaliado 62 dias após a inoculação (Figura 4.2B) e as variáveis utilizadas para a avaliação foram: comprimento da parte aérea, número de folhas, diâmetro, peso fresco da parte aérea, peso seco da parte aérea, peso fresco da raiz, número de galhas por planta, número de massas de ovos por planta, número de ovos/massa de ovos, número total de nematóides no solo e na raiz e o fator de reprodução, que foi calculado dividindo-se a população final de nematóides no solo e nas raízes pela população inicial que foi utilizada na inoculação [$FR = Pf/Pi$, sendo Pf =População final e Pi = População inicial].

Para a extração dos juvenis de segundo estágio utilizou-se o método de flutuação-sedimentação-peneiramento (Flegg & Hopper, 1970). A amostra de solo foi homogeneizada e em seguida foi retirada a quantidade de 100cm^3 de solo, que foi colocada em um balde, onde adicionou-se água. Mexeu-se bem o solo com água para que os torrões se desfizessem, liberando-se assim os nematóides para a suspensão, que permaneceu em repouso por um minuto. Então, verteu-se a suspensão através de uma peneira de malha de 60 mesh e depois através de uma peneira de 400 mesh. Recolheram-se os nematóides em pequenos volumes de suspensão que foram centrifugados de acordo com o método de Jenkins (1964). Utilizou-se a

rotação de 3000 rpm por cinco minutos, descartou-se o sobrenadante, e aos sedimentos que ficaram no fundo do tubo da centrífuga contendo nematóides adicionou-se solução de sacarose (456g para 1L de solução) e centrifugou-se novamente a uma velocidade de 1500 rpm por um minuto. Recolheu-se então, o sobrenadante, que foi vertido e lavado em peneira de 400 mesh de onde se recolheu cerca de 20 ml de suspensão que continha os nematóides.

Reduziu-se o volume e adicionou-se à suspensão, volume equivalente do fixador de Golden 2X (16 partes de formalina, 4 partes de glicerina e 80 partes de água). Assim, obtendo-se uma alíquota de 10 ml de suspensão contendo nematóides e o fixador. Em lâmina de Peters foram contados três vezes os J2 e os ovos em 1 ml de suspensão, sendo dessa forma contados 30% da amostra.

Sob uma lupa com epi-iluminação foi contado o número de galhas por sistema radicular.

Para verificar a presença de massas de ovos por galha na superfície das raízes, utilizou-se a coloração das mesmas com fucsina ácida. As raízes foram mergulhadas em solução de fucsina ácida, ficando imersas por aproximadamente 10 minutos e depois lavadas em água corrente. Com isso, as massas de ovos tornaram-se com coloração avermelhada, facilitando sua contagem.

Para a extração de ovos, utilizou-se a metodologia de Hussey & Barker (1973), modificada por Bonetti (1981). Os ovos em suspensão, obtidos após a extração, foram guardados em frascos com fixador Golden 1X para posterior contagem. Cada amostra foi contada três vezes em câmara de Peters a partir de uma alíquota de 1 ml dessa suspensão.

As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do *software* SISVAR (Ferreira, 2000). Os dados foram submetidos a análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 – RESULTADOS

Com os dados da tabela 4.1 e 4.2 foi possível perceber que os genótipos G4, G5 e G9 tiveram todas as médias das variáveis (comprimento da parte aérea, diâmetro do caule, número de folhas, peso fresco da parte aérea, peso seco da parte aérea, peso fresco da raiz) aumentados das plantas inoculadas quando comparado com as médias das plantas não inoculadas. O acesso de *P. capsularis* apresentou médias menores em todas as variáveis das plantas inoculadas quando comparadas com as plantas controle, exceto para o diâmetro, que não houve diferença

estatística. Este genótipo foi o que sofreu mais com o nematóide inoculado. O nematóide utilizado nas inoculações foi isolado deste acesso e por isso pode ter certa especificidade.

Para o acesso de *P. setacea*, apenas no comprimento da parte aérea que plantas inoculadas apresentam médias maiores em todas as outras variáveis não houve diferenças estatisticamente.

O genótipo BRS Ouro Vermelho apresentou as médias referentes ao número de folhas menor nas plantas inoculadas quando comparado com as plantas não inoculadas, no entanto, todas as outras variáveis apresentaram médias maiores nas plantas inoculadas quando comparados com as plantas não inoculadas. Tais resultados podem ratificar a possibilidade da existência de tolerância ou a necessidade de o experimento permanecer mais tempo na casa de vegetação antes das avaliações.

Tabela 4.1-Valores de comprimento da parte aérea (cm), diâmetro (cm) e número de folhas de plantas de *Passiflora* inoculadas com *Meloidogyne incognita* e de plantas não inoculadas.

Genótipos	Comp. parte aérea (inoculadas)	Comp. (controle)	Diâmetro (inoculadas)	Diâmetro (controle)	Nº folhas (inoc.)	Nº folhas (controle)
G1	74,00 e	115,50 g	0,10 a	0,10 a	33,62d	57,50 e
G2	16,50 abc	10,25 ab	0,11 ab	0,10 a	12,5 c	10,50 abc
G3	5,37 a	4,50 a	0,20 cde	0,17 bcd	6,0 ab	7,50 abc
G4	10,12 ab	5,33 a	0,26 fg	0,10 a	9,5 abc	4,33 a
G5	8,37 ab	5,75 a	0,20 cde	0,15 abc	8,75 abc	7,00 abc
G6	17,12 abc	23,74 bc	0,25 efg	0,25 efg	6,62 abc	6,25 ab
G7	41,5 d	12,75 abc	0,23 efg	0,22 def	6,50 abc	4,50 a
G8	23,12 bc	19,50 abc	0,28 g	0,22 def	8,00 abc	8,50 abc
G9	92,75 f	27,50 cd	0,35 h	0,22 def	11,12 bc	7,50 abc

G1= *P. capsularis*, G2= *P. setacea*, G3= *nitida*, G4= *P. alata* (N), G5= *P. alata* (J), G6= BRS Sol do Cerrado, G7= BRS Gigante amarelo, G8= BRS Ouro vermelho e G9= maracujá azedo local.

**Letras minúsculas nas linhas não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% probabilidade.

Com base nas características reprodutivas dos nematóides, (Tabela 4.3), observou-se que o acesso de *P. setacea* apresentou o menor número de galhas e, os acessos de *P. alata* (N), *P. nitida*, *P. capsularis* e o maracujá azedo do comércio local o maior número de galhas. O número de massas de ovos nos genótipos G2, G5, G6, G8 e G9 foi significativamente menor, sendo que G1 apresentou o maior valor. Em relação ao número de ovos/massa de ovos, os genótipos *P. capsularis* e *P. nitida* apresentaram os maiores valores, enquanto que G4, G7, G8, e G9 apresentaram os menores. No que tange o número total de nematóides tem-se que os

genótipos G1 e G2 apresentaram os maiores valores e os outros genótipos foram estatisticamente iguais. Considerando o fator de reprodução, embora, G1 e G2 tenham apresentado as maiores médias sendo significativamente diferentes dos outros genótipos, todos os genótipos apresentaram valores inferiores a 1. (Tabela 4.3).

Tabela 4.2-Valores de peso fresco da parte aérea, peso seco da parte aérea e peso fresco de raiz de *Passiflora* spp. inoculadas com *Meloidogyne incognita* e de plantas não inoculadas.

Genótipos	P. fresco p. aérea (g)	P. fresco (controle) (g)	Peso seco da p. aérea (g)	P. seco (controle)(g)	P. fresco da raiz (g)	P. fresco (controle) (g)
G1	6,00 f**	19,83 h	1,92 e	4,87 f	2,23 d	7,00 f
G2	0,68 ab	0,32 a	0,17 a	0,09 a	0,39 a	0,12 a
G3	2,46 abcde	1,45 abc	0,35 ab	0,35 ab	0,31 a	0,25 a
G4	4,88 ef	0,65 ab	1,55 de	0,12 a	1,95 cd	0,17 a
G5	3,31 bcdef	0,98 abc	0,79 abcd	0,22 a	0,79 ab	0,19 a
G6	3,62 cdef	3,44 bcdef	1,14 bcde	0,76 abcd	1,51 bcd	0,76 ab
G7	5,56 f	1,97 abcd	2,04 e	0,61 abc	2,24 d	0,96 abc
G8	4,65 def	1,97 abcd	1,47 cde	0,76 abcd	2,19 d	0,95 abc
G9	14,74 g	5,71 f	5,11 f	1,44 cde	5,81 e	2,39 d

G1= *P. capsularis*, G2= *P. setacea*, G3= *nitida*, G4= *P. alata* (N), G5= *P. alata* (J), G6= BRS Sol do Cerrado, G7= BRS Gigante amarelo, G8= BRS Ouro vermelho e G9= maracujá azedo local.

**Letras minúsculas nas linhas não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% probabilidade.

Tabela 4.3 - Reação de nove genótipos de maracujazeiro a *Meloidogyne incognita* após 62 dias da inoculação em casa de vegetação.

Genótipos	Nº de galhas	Nº de massas de ovos	Nº de ovos/massa	Nº total de nema	FR(%)
G1- <i>P. capsularis</i>	7,01cde*	7,83d	4,81c	211,29ab	0,10ab
G2- <i>P. setacea</i>	2,39a	2,01a	3,01b	232,54b	0,10b
G3- <i>P. nitida</i>	7,51de	3,26bc	3,52bc	102,38ab	0,05ab
G4- <i>P. alata</i> (N)	8,22e	3,71a	1,00a	1,00a	0,00a
G5- <i>P. alata</i> (J)	6,50bcd	2,07a	1,95ab	110,39ab	0,50ab
G6 - BRS Sol do Cerrado	4,96b	2,44ab	2,96b	96,02ab	0,05ab
G7 - BRS Gigante Amarelo	5,57bc	3,11bc	1,19a	52,00ab	0,02ab
G8 - BRS Ouro vermelho	5,00b	2,07a	1,00a	0,00a	0,00a
G9 - Comercial	7,01cde	2,49ab	1,00a	20,00ab	0,01ab
CV%	17,48	17,01	47,84	167,08	164,66

**Letras minúsculas nas linhas não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% probabilidade.

4- DISCUSSÃO

Segundo Hussey (1985) os efeitos de nematóides do gênero *Meloidogyne* sobre o crescimento das plantas, em geral, são variados e complexos. De maneira geral, pode-se dizer que esses efeitos relacionam-se à alteração na absorção e translocação de água e nutrientes, desta forma podendo retardar o crescimento da raiz e com isso, contribuir para a redução do crescimento da planta. Com base em estudos anteriores com nematóides do gênero *Meloidogyne*, alguns autores como Rossi & Montaldi (2004) e Ahuja *et al.* (1985), verificaram redução de peso seco e peso fresco de parte aérea, em plantas de rabanete em decorrência da presença de nematóides de galhas radiculares. Assim como, Loveys & Bird (1973) avaliaram a reação de plântulas de tomate a partir da infecção de juvenis de *M. javanica* e observaram que houve decréscimo na área foliar das plântulas e de massa fresca. Já Wallace (1974), avaliando a reação de plântulas de tomate inoculadas com *M. javanica* percebeu que os nematóides e as galhas formadas por eles prestavam o papel de dreno nas raízes e conseqüentemente afetando o crescimento da parte aérea. Por outro lado, o incremento nos valores das variáveis de desenvolvimento das plantas pode ser explicado pelo estímulo à formação abundante de raízes laterais, o que favoreceria a absorção de maior quantidade de nutrientes (Christie, 1959).

Sharma *et al* (2001), avaliaram o crescimento de um híbrido de *P. edulis f. flavicarpa* (EC-2) sob o efeito de *M. javanica* e perceberam que houve redução do tamanho de plantas inoculadas em relação às não-inoculadas, assim como diminuição do peso de matéria fresca e do peso de matéria seca da parte aérea das plantas em todos os níveis de inóculo testados. El-Moor (2002), estudando a reação de progênies de *Passiflora edulis f. flavicarpa* a nematóides do gênero *Meloidogyne*, verificou que houve diferenças significativas entre plantas inoculadas e não inoculadas considerando as variáveis comprimento de planta, número de galhas por planta, peso seco e fresco da parte aérea. No presente estudo, *P. capsularis* foi o único genótipo que apresentou valores reduzidos de comprimento e diâmetro de planta, número de folhas, peso fresco de raiz e, peso fresco e seco de parte aérea nas plantas inoculadas quando comparadas às não inoculadas, coincidindo com o maior número de galhas e de massa de ovos por sistema radicular, apesar de ter se comportado como genótipo resistente, quando se considerou o fator de reprodução, expressando de certa forma uma reação de intolerância, uma vez que o nematóide não se multiplicou satisfatoriamente, nem a planta manteve desenvolvimento comparável ao controle. Como observado por Kirby (1978), plantas de *P. edulis f. flavicarpa* Degener inoculadas com *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, 1949 e

M. javanica (Treub) Chitwood, 1949 apresentaram galhas, porém não foi evidenciada a reprodução do nematóide.

Paula (2006), verificou que *M. incognita* e *M. javanica* de maneira geral, reduziram o desenvolvimento vegetativo das plantas das espécies de *Passiflora*, exceto para alguns genótipos, para os quais houve estímulo ao desenvolvimento de plantas inoculadas com *M. javanica*. Além disso, verificou que as espécies comerciais, *P. setacea*, *P. odontophylla*, *P. edulis* nativo e o híbrido *P. coccinea* vs. *P. setacea* se comportaram como resistentes a *M. incognita*. Também observou que todas as espécies estudadas comportaram-se como resistentes a *M. javanica*.

Santos *et al.* (2002) ao avaliar a reação de genótipos de maracujazeiro azedo ao nematóide de galhas, verificaram que houve pouca formação de galhas por planta. Sharma *et al.* (2005) avaliaram a reação de espécies de *Passiflora* a *M. incognita* em casa-de-vegetação incluindo *P. caerulea*, *P. giberti* N.E. Brown e *P. nítida* Kunth, e verificaram que das três espécies acima somente *P. nítida* apresentou fator de reprodução superior a 1. De acordo com os critérios de Canto-Saenz (1985), que consideram resistentes os genótipos que apresentam fator de reprodução inferior a 1, as espécies aqui estudadas mostraram-se resistentes a *M. incognita*. Diante dos resultados obtidos pode-se dizer que até onde foi conduzido o experimento a maioria dos genótipos reagiu positivamente na presença dos nematóides e não permitiu a multiplicação do mesmo. É importante salientar que alguns fatores podem ter interferido nos resultados do experimento tais como: duração do experimento (62 dias); condução do experimento em época fria do ano (abril-junho); quantidade de inóculo que foi relativamente baixa (2.200 juvenis/ ovos) por planta quando comparado com Paula (2006) que inoculou 5.000 juvenis/ovos por planta e a duração do experimento foi de 90.

Referindo-se aos aspectos nematológicos os resultados mostraram que de maneira geral, a quantidade de ovos por massa de ovos foi pequena, o que sugere que os nematóides não tiveram uma multiplicação eficiente e que a planta permaneceu com o seu vigor mesmo na presença do nematóide.

5 – CONCLUSÕES

As espécies, *P. capsularis*, *P. nitida*, *P. setacea*, *P. alata* (J), os híbridos BRS Sol do Cerrado, BRS Ouro vermelho e BRS Gigante amarelo, *P. alata* (N) e o genótipo Comercial comportam-se como resistentes ao nematóide *M. incognita*.

A espécie *P. capsularis* mesmo não permitindo multiplicação adequada do nematóide apresentou sintomas radiculares e perda de vigor da parte aérea na presença de *M. incognita*.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJUHA, S. & MUCHOPADHYAYA, M.C. Effect of nematode population of *Meloidogyne incognita* on their reproduction and growth of radish and carrot. Bulletin of Entomology 26 (2): 214-217. 1985.

BONETTI, S. I. Inter-relacionamento de micronutrientes com o parasitismo de *Meloidogyne exigua* em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Viçosa: UFV, (Dissertação de Mestrado). 74p. 1981.

CANTO-SAENZ, M. The nature of resistance to *Meloidogyne incognita*. In: BARKER, K. R.; CARTER, C. C. & SASSER, J. N. (Eds.). An advanced treatise on *Meloidogyne*. Raleigh: Department of Plant Pathology. p.255-231. 1985.

CHRISTIE, J. R. Plant nematodes: their bionomics and control. Gainesville, Florida: University of Florida. 25p. 1959.

COHN, E. & DUNCAN, L.W. Nematode parasites of subtropical and tropical fruit trees. In: LUC, M. R.; SIKORA, A. & BRIDGE, J. (Eds.). Plant-parasite nematodes in subtropical and tropical agriculture. Walingford: CAB International. p. 347-362. 1990.

EL-MOOR, R. D. Melhoramento genético do maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg) visando a resistência ao nematóide de galhas do gênero *Meloidogyne* spp. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 78p. (Dissertação de Mestrado). 2002.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. & BRAGA, M.F. Pesquisa e desenvolvimento do maracujá no Brasil. In: SILVA, A.G.; ALBUQUERQUE, A.C.S.; MANZANO, N.T.; SILVA, R.C. & RUSSELL, N.C. (Eds.). Agricultura Tropical: Quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. Brasília: Embrapa. 2008.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. Anais. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos. p. 255-258. 2000.

FLEG, J. J. M. & HOPPER, D. J. Extraction of free-living stages from soil. In: SOUTHEY, J. F. (Ed) Laboratory methods for work with plants and soil nematodes. Commonwealth Agricultural Bureaux. Herts Technology Bulletin 2: 5-22. 1970.

HUSSEY, R. S. & BAKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including new technique. Plant Disease Reporter 57: 1025-1028. 1973.

HUSSEY, R. S. Host-parasite relationships and associated physiological changes. In: SASSER, J.N.; CARTER, C.C. (Eds.) An advanced treatise on *Meloidogyne*. Raleigh: North Carolina State University graphics v.1: p.143-154. 1985.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter 48: 62. 1964.

JUNQUEIRA, N.T.V.; CHAVES, R.C.; MANICA, I.; PEIXOTO, J. R.; PEREIRA, A.V. & FIALHO, J.F. Propagação do maracujazeiro-azedo por enxertia em estacas herbáceas enraizadas de espécies de passifloras nativas. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Número 39, 15p. Embrapa. 2002.

KIRBY, M.F. Reniform and root-knot nematodes on passionfruit in Fiji. Nematropica 8:21-25. 1978.

KLEIN, A.L.; FERRAZ, L. C. C. B. & OLIVEIRA, J. C. Comportamento de diferentes maracujazeiros em relação ao nematóide formador de galhas. Pesquisa Agropecuária Brasileira 19:207-209. 1984.

LOPES, S.C. Citogenética do maracujá, *Passiflora* spp. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R. & VAZ, R.L. (Eds.) A cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEP. p.201-209. 1991.

LOVEYS, B. R. & BIRD, A. F. The influence of nematode on photosynthesis in tomato plants. Physiological Plant Pathology 3: 525-529. 1973.

Mc SORLEY, R. Nematological problems in tropical and subtropical tree crops. Nematropica 22:103-116. 1981.

MELETTI, L.M.M. & NAGAI, V. Enraizamento de estacas de sete espécies de maracujazeiro (*Passiflora* spp.). Revista Brasileira de Fruticultura 14: 163-168.1992.

- PAULA, M.S. Diversidade genética e reação de *Passiflora* spp. a *Meloidogyne incognita* e a *Meloidogyne javanica*. (Tese de Mestrado). Brasília. Universidade de Brasília. 2006.
- PONTE, J.J.; LEMOS J.W.V.; CASTRO F.E. & MARIA, L. Comportamento de plantas frutíferas tropicais em relação a nematóides das galhas. *Fitopatologia Brasileira* 1:29-33. 1976.
- ROSSI, C. E. & MONTALDI, P. T. Root-knot nematode: cultivars reaction and damage to radish. *Horticultura Brasileira* 22: 72-75. 2004.
- SANTOS, S. T.; PEIXOTO, J.R.; RAMOS, M. L. & MATTOS, J. K. A. Reação de genótipos de maracujazeiro azedo aos nematóides de galhas do gênero *Meloidogyne* spp. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, Belém. CD_ROM, p. 1-4, 2002.
- SHARMA, R.D.; JUNQUEIRA, N.T.V. & GOMES, A.C. Pathogenicity and reproduction of *M. javanica* on yellow passionfruit hybrids. *Nematologia Brasileira* 25: 247-249. 2001.
- SHARMA, R.D.; JUNQUEIRA, N.T.V. & GOMES, A.C. Reação de espécies de *Passiflora* a nematóide-das-galhas. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISAS EM MARACUJAZIRO, 4, 2005. Planaltina, DF: EMBRAPA, Resumos... p.183-186. 2005.
- SILVA JUNIOR, P. F.; TIHOHOD, D. & OLIVEIRA, J.C. Avaliação da resistência de maracujazeiros (*Passiflora* spp.) a uma população de *Meloidogyne incognita* raça 1. *Nematologia Brasileira* 12:103-109. 1988.
- WALLACE, H. R. The influence of root-knot nematode, *M. javanica*, on photosynthesis and nutrient demand by roots of tomato plants. *Nematologica* 20: 27-33. 1974.

Oh fruto sagrado que caiu do céu!
Vegetal tesouro por onde encontrado!
Planta genuína do nobre Cerrado.
Generosa espécie espalhada ao léu
Por vales, montanhas, ladeiras e serras.
Que tanto valoriza as brasileiras terras.
É o vinho dourado do irmão que labora
Este tão amado gênero passiflora.

Geovane Alves de Andrade