



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
BACHARELADO EM BIOLOGIA

**JULIANA LELES COSTA**

**MARCADORES ISSR: DIVERSIDADE GENÉTICA E  
CORRELAÇÃO COM HETEROSE EM GENÓTIPOS DE  
*Passiflora edulis* Sims**

**Cruz das Almas  
2010**

**JULIANA LELES COSTA**

**MARCADORES ISSR: DIVERSIDADE GENÉTICA E  
CORRELAÇÃO COM HETEROSE EM GENÓTIPOS DE  
*Passiflora edulis* Sims**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), apresentado ao curso de graduação em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Biologia.

Orientadora: Profa. Msc. Edna Lobo Machado

Co-orientador: Dr. Eder Jorge de Oliveira

**Cruz das Almas - BA**

**Dezembro de 2010**

JULIANA LELES COSTA

**MARCADORES ISSR: DIVERSIDADE GENÉTICA E CORRELAÇÃO  
COM HETEROSE EM GENÓTIPOS DE *Passiflora edulis* Sims**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), apresentada como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Aprovada em 13 de dezembro de 2010.

**Banca Examinadora**



---

Edna Lobo Machado – Orientadora  
Professora Assistente do CCAAB



---

Eder Jorge de Oliveira – Co-orientador  
Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura



---

Onildo Nunes de Jesus  
Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura

## **DEDICO**

À minha família, Braulino, Anoilve e Virgílio pelo amor e felicidade ofertada.  
À minha madrinha e avó, Dinha Dú, pelos seus ensinamentos e exemplo de vida.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha existência e por ter me dado a capacidade para concretização desta etapa da minha vida;

À Nossa Senhora pela divina proteção;

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela minha formação profissional;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de Iniciação Científica;

Ao Dr. Eder Jorge de Oliveira, pela orientação recebida, apoio e ensinamentos transmitidos, fundamentais na minha formação;

À Embrapa Mandioca e Fruticultura pela concessão do espaço e recursos financeiros para execução do trabalho;

Aos técnicos, Sr. Epaminondas e Sr. Raimundo, do Laboratório de Biologia Molecular pelo suporte técnico e transmissão do conhecimento;

Aos amigos da equipe de trabalho (Mamão e Maracujá) pela ajuda na coleta e execução do trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Virologia pelo carinho e amizade;

À mestrandia Cláudia pela parceria na execução do experimento e na interpretação dos resultados;

Ao Dr. Onildo pelos conhecimentos compartilhados e ajuda nos momentos de dúvidas;

À Professora Edna pelos ensinamentos, incentivos na pesquisa e orientação no TCC;

À Coordenação do curso de Biologia pela prontidão na resolução dos “problemas” acadêmicos;

Aos mestres pelo conhecimento científico e incentivo na minha formação profissional;

Aos amigos de curso pelo carinho, amizade e momentos de descontração;

Aos amigos de república, Lê, Cléo, Du Gás, Bola, Messias, Diêgo, Binho, Rose, Taiana e Micael, pelo afeto, confiança e ajuda na superação dos desafios;

À república feminina de Mutuípe pelo constante apoio nos momentos mais difíceis;

Aos amigos riachenses, que mesmo distante, compartilharam alegrias e tristezas;

À Nilo pelo carinho e paciência;

À todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho,

O meu sincero AGRADECIMENTO.

## RESUMO

### **Marcadores ISSR: diversidade genética e correlação com heterose em genótipos de *Passiflora edulis* Sims**

Este trabalho teve como objetivo: i) estimar a divergência genética com uso de marcadores ISSR em 63 acessos de maracujá amarelo pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético de Maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura; ii) avaliar a capacidade geral e específica de combinação para características produtivas em híbridos simples da série GP09; iii) correlacionar distância genética obtida por ISSR e heterose. Os resultados obtidos permitiram concluir que os marcadores ISSR mostraram consistentes na avaliação da variabilidade genética, detectando ampla divergência genética entre os 63 acessos analisados, bem como a separação entre genótipos melhorados e não melhorados. Tais resultados podem auxiliar na definição de estratégias mais eficientes a serem utilizadas no programa de melhoramento de maracujá amarelo como no direcionamento dos cruzamentos entre os genótipos mais contrastantes. Os trinta híbridos resultantes do dialelo parcial apresentaram diferenças significativas para as variáveis número de frutos, peso do fruto, produtividade, rendimento e sólidos solúveis totais. Não foi observada correlação significativa entre distância genética vs heterose e capacidade específica de combinação para as características e iniciadores ISSR analisados.

**Palavras-chave:** *Passiflora edulis* Sims, ISSR, divergência genética, heterose

## **ABSTRACT**

### **ISSR markers: genetic diversity and correlation with heterosis in *Passiflora edulis* Sims**

The main objective of this study was: i) estimate the genetic diversity using ISSR markers in 63 accessions from breeding program of passion fruit belonging to Embrapa Cassava & Passion Fruit; ii) estimate the general and specific combining ability of yield traits in simple hybrids from GP09 series iii) to correlate genetic distance obtained by ISSR and heterosis. As a result, ISSR markers showed high reliability when used to evaluate the genetic variability of passion fruit. High divergence was observed among the 63 accessions analyzed, as well as genotypes separation between improved and unimproved genotypes. These results could be useful to define strategies more efficient to be used in breeding program of passion fruit, such as on the crosses choice among the most contrasting genotypes. Thirty hybrids from the partial diallel showed significant differences for number of fruits, fruit weight, yield, pulp yield and total soluble solids. There was no significant correlation between genetic distance x heterosis and specific combining ability for the traits and ISSR analyzed.

**Keywords:** *Passiflora edulis* Sims, ISSR, genetic divergence, heterosis



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Padrão de amplificação do Iniciador DiGA3'T. M: Marcador de peso molecular 100 pb (Bio Labs), amostras 1 a 40) Genótipos de maracujazeiro de acordo com a ordem da tabela 1..... 25
- Figura 2:** Dendrograma obtido pelo método *neighbor-joining*, a partir da dissimilaridade genética entre 63 acessos de maracujazeiro, utilizando marcadores ISSR. Os grupos avaliados estão identificados com a bolinha vermelha (BAG); triângulos azuis (meios irmãos) e verde (híbridos). Dm: dissimilaridade média por grupo;  $r_c$ : correlação cofenética..... 28

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Relação dos acessos de Maracujá pertencentes ao BAG- Maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.....	22
<b>Tabela 2:</b> Condições de reação e amplificação dos Iniciadores de ISSR.....	24
<b>Tabela 3:</b> Características dos 23 Iniciadores utilizados na análise de diversidade genética no maracujazeiro. *R = A, G; Y = C, T.....	26
<b>Tabela 4:</b> Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância, média geral, média dos genitores, média dos cruzamentos e coeficiente de variação experimental (CV%), para os caracteres agronômicos....	36
<b>Tabela 5:</b> Valores médios obtidos para número de frutos, peso do fruto, produtividade, rendimento e sólidos solúveis totais de parentais e 30 híbridos do dialelo parcial, heterose (H), estimativa da capacidade específica de combinação ( $\hat{S}_{ij}$ ) e valores de divergência genética (DG) obtida por ISSR.....	37
<b>Tabela 6:</b> Estimativas dos efeitos da capacidade geral de combinação ( $\hat{g}_i$ ) de 11 parentais de maracujá amarelo e a variável número de fruto (NF).....	40
<b>Tabela 7:</b> Estimativas de coeficientes de correlação entre número de frutos (NF), peso do fruto (PF), produtividade (PROD), rendimento (REND) e sólidos solúveis totais (SST), heterose em relação à média dos genitores (H) e capacidade específica de combinação ( $\hat{S}_{ij}$ ) com distância genética obtida por ISSR.....	41

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2.REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
<b>3.CAPÍTULO I: DIVERSIDADE GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE <i>Passiflora edulis</i> Sims COM O USO DE MARCADORES ISSR.....</b>	<b>20</b>
3.1.INTRODUÇÃO.....	20
3.2.MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
3.4.CONCLUSÕES.....	30
<b>4.CAPÍTULO II: CORRELAÇÃO ENTRE HETEROSE E DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE MARACUJÁ AMARELO.....</b>	<b>31</b>
3.1.INTRODUÇÃO.....	31
3.2.MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.3.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
3.4.CONCLUSÕES.....	41
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro pertence à família *Passifloraceae* e ao gênero *Passiflora*. O Brasil é o principal produtor de maracujá do mundo e o centro de origem dessa espécie.

O programa de melhoramento genético de maracujazeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura conta com aproximadamente 175 acessos sendo um dos maiores bancos ativos de germoplasma de maracujazeiro (BAG-Maracujá) do Brasil. Apesar do número de acessos disponíveis, o uso efetivo dos mesmos é baixo em função da falta de caracterização e conhecimento do comportamento genético desses materiais em combinações híbridas. A caracterização e avaliação são indispensáveis nos trabalhos de manutenção de germoplasma (Moraes, 2005).

Os marcadores moleculares, por acessar informações contida no DNA, tornam-se ferramentas poderosas para o conhecimento da variabilidade disponível. Por meio da análise molecular é possível analisar e utilizar a distância genética entre indivíduos como uma ferramenta importante em programas de melhoramento, por servir de ligação entre ações de conservação e utilização de recursos genéticos disponíveis. Além disso, a estimativa da distância genética pode ajudar na organização do germoplasma, auxiliar na escolha de genitores, definição de cruzamentos e incorporação de genes de germoplasma exótico (Vieira et al., 2007).

Para que se tenha sucesso em um programa de melhoramento genético, é necessário ter uma população segregante que associe média e variabilidade alta (Bison et al., 2009). Uma das metodologias para identificação de potenciais genitores, para formação de uma população de melhoramento, é por meio do uso de cruzamentos dialelos que permitem identificar a população mais promissora além de ajudar a obter informações a respeito do controle genético do caráter (Cruz et al., 2004). Um estudo *a priori* da diversidade genética entre os indivíduos possibilita a identificação das combinações híbridas mais favoráveis. Porém, nem sempre as informações de dissimilaridade resultam em combinações híbridas vantajosas em todas as espécies (Guimarães et al., 2007).

Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi caracterizar alguns acessos de germoplasma do BAG-Maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura, bem como uma população de melhoramento com o uso de marcadores ISSR. Além disso, as

correlações entre divergência genética e heterose dos híbridos desenvolvidos pelo programa de melhoramento genético foram estimadas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A cultura do maracujazeiro e sua importância econômica

O termo maracujá é uma denominação indígena, de origem tupi, que significa 'alimento em forma de cuia'. Os maracujás pertencem à família *Passifloraceae* e, estão largamente distribuídas pelos trópicos – América, Ásia e África (Oliveira et al., 1988).

Esta família é formada por 630 espécies distribuídas em 18 gêneros (Vanderplank, 1996). No Brasil são encontrados os gêneros *Dilkea* e *Passiflora* (Lopes, 1994). O gênero *Passiflora* é o mais importante economicamente e compreende o maior número de espécies, cerca de 465 espécies, das quais de 150 a 200 são originárias do Brasil cujo maior centro de distribuição geográfica localiza-se no Centro-Norte (Lopes, 1991).

De acordo com Cunha et al. (2002), cerca de 70 espécies produzem frutos comestíveis e mais de 50 apresentam potencial comercial (Vieira & Carneiro, 2004). Oliveira & Ruggiero (2005) ressaltam o potencial agrônomo de espécies silvestres, como *P. nitida* e *P. setacea*, considerando a extrema importância no desenvolvimento de pesquisas visando o maior conhecimento do germoplasma de maracujazeiro silvestre.

Espécies silvestres de maracujazeiro têm apresentado grande potencial para uso em programas de melhoramento genético e como porta-enxertos, além de serem alternativas para diversificar os sistemas produtivos com novos alimentos funcionais para consumo *in natura* (maracujá-doce) e para uso como plantas ornamentais principalmente em países do hemisfério norte (Junqueira et al., 2005; Peixoto, 2005). Com relação ao potencial como alimentos funcionais e como plantas medicinais, Costa & Tupinambá (2005) relatam o grande potencial das espécies silvestres de maracujazeiro e a carência de estudos nesta área.

As flores de maracujazeiro apresentam mecanismos que dificultam a auto polinização, como a presença dos estigmas no ápice do androginóforo, numa posição superior as anteras e por isso são essencialmente alógamas e assim,

dependentes de polinização cruzada para formação de frutos (Moraes, 2005). Esta natureza reprodutiva leva a existência de uma ampla variabilidade intra e interespecíficas.

Apesar da ampla variabilidade genética inter e intra-específica, o cultivo do maracujazeiro em escala comercial teve início na década de 70, com a espécie *Passiflora edulis* (maracujá-amarelo) e, na década de 80 a cultura adquiriu expressão econômica pelo incentivo da agroindústria que estimulou o mercado do produto processado na forma de suco (Rizzi et al., 1998). No Brasil, as espécies com maior expressão comercial são a *Passiflora edulis* (maracujá amarelo ou azedo e maracujá roxo) e a *Passiflora alata* (maracujá doce) (Inglez de Sousa & Melletti, 1997).

O maracujá amarelo é o mais cultivado no Brasil por ser adaptado ao clima tropical. O fruto amadurece em 80 dias após a polinização da flor, tem formato ovóide (alguns oblongos), peso de 70-130g (Meletti, 2005). O fruto maduro possui casca fina, cor amarelo canário, polpa ácida, suco amarelo a amarelo alaranjado. A planta tem produção entre 12-15 t.ha<sup>-1</sup>, mas tem potencial para produções de 30-35t/ha (Meletti, 2005). A produção de maracujá amarelo ocupa 95 % dos pomares brasileiros, no qual, a cultura se caracteriza por ser uma atividade desenvolvida em pequenas propriedades, com tamanho entre três a cinco hectares e mão-de-obra proveniente da agricultura familiar, o que representa uma alternativa de renda para os pequenos produtores (Moraes, 2005).

Por outro lado, a variedade roxa é mais indicada para regiões de altitude maior e climas frios. Os frutos são ovóides ou globosos, coloração purpúrea quando maduros, peso de 60 a 100 gramas, com rendimento e qualidade do suco semelhante ao maracujá amarelo (Meletti, 2005). Porém, o suco do maracujá roxo possui maior concentração de açúcar, maior teor em sólidos solúveis totais, menor acidez (suco mais "doce") e maior potencialidade de produção 30-40 t.ha<sup>-1</sup>. Devido a suas características comerciais desejáveis o mercado internacional é bastante receptivo ao maracujá-roxo *in natura* (Meletti, 2005).

Em termos nacionais, a produção está em torno de 684.376 toneladas, ocupando uma área de 49.112 hectares. Os estados produtores são os estados do Pará, Bahia, Sergipe, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (IBGE, 2008). Apesar do destaque da produção brasileira, a produtividade nacional ainda é muito

baixa, devido entre outros fatores, a falta de variedades mais produtivas e de manejo adequado.

## **2.2 Melhoria Genética na cultura do maracujazeiro**

O melhoramento do maracujazeiro constitui-se, desde seu início, em campo de pesquisa aberto e promissor, mas foi na década de 90 que se observou o incremento dos trabalhos com o lançamento das primeiras cultivares e consolidação de equipes multidisciplinares (Meletti et al., 2005).

Apesar, dos avanços das fronteiras agrícolas a cultura enfrenta alguns problemas referentes à produtividade e qualidade dos frutos, uma vez que, faltam variedades resistentes as principais moléstias que atacam a cultura, como à virose do endurecimento dos frutos (PWV), antracnose, septoriose, verrugose, fusariose e bacteriose, gerando um entrave no sistema de produção (Oliveira, 2006).

O Brasil, por ser centro de origem de um grande número de espécies de maracujá e maior centro de distribuição geográfica do gênero *Passiflora* possui uma variabilidade natural que extremamente importante para ações de melhoramento (Meletti et al., 2000). Entretanto, os trabalhos de caracterização e avaliação, indispensáveis aos trabalhos de fitomelhoramento, devem ser priorizados para o uso efetivo do germoplasma no desenvolvimento de novos produtos.

O Brasil possui as maiores coleções de germoplasma de *Passiflora* do mundo, mas ainda são necessários trabalhos em relação ao resgate, à conservação e caracterização de germoplasma. Segundo Cunha (1998) e Faleiro et al. (2006) aumentar a variabilidade genética existente nas coleções, conservar e avaliar o germoplasma e utilizá-los em programas de melhoramento ou de forma direta no mercado são prioridades da pesquisa relacionada a recursos genéticos do maracujá.

Os programas de melhoramento visam essencialmente obter e selecionar novos genótipos que apresentem bons atributos agronômicos como alta produtividade, bom peso do fruto e rendimento de polpa. Além desses caracteres é essencial que os novos materiais apresentem também resistência/tolerância as principais doenças que prejudicam a cultura. Apesar de existirem vários métodos de seleção de indivíduos superiores, a hibridação intraespecifica tem mostrado os resultados mais promissores. No que confere a melhoramento para resistência às doenças os programas de melhoramento podem explorar as espécies selvagens



como fonte de resistência. Esses genes são introduzidos nas espécies cultivadas por hibridação interespecífica (Cunha e Cardoso, 2010).

Nos últimos anos, com os avanços da biotecnologia, novas ferramentas estão sendo desenvolvidas para tornar mais eficientes os programas de melhoramento e diminuir o tempo no desenvolvimento de novas variedades (Faleiro et al., 2006), a exemplo do uso de marcadores moleculares para seleção assistida, mapeamento genético e identificação de QTLs.

### **2.3 Marcadores ISSR e estudo de diversidade genética**

Com os avanços da biotecnologia, sobretudo o desenvolvimento dos marcadores de DNA, têm permitido estudar e caracterizar a variabilidade genética em diferentes níveis (Oliveira, 2006). Os marcadores moleculares têm sido utilizados como ferramentas auxiliares indispensáveis nas diferentes etapas do melhoramento genético, desde a caracterização do germoplasma até as etapas finalísticas de desenvolvimento e seleção de plantas melhoradas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Dentre as classes de marcadores moleculares existentes, o marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) constitui-se em uma técnica simples, rápida e eficiente desenvolvido a partir da necessidade de explorar repetições de microssatélites abundantes no genoma eucarioto sem a utilização de sequenciamento do DNA (Zietkiewicz et al., 1994). O princípio da técnica está baseado na reação de PCR (*Reaction Chain Polymerase*) e envolvem ampliações de segmentos de DNA, presente entre duas regiões idênticas de microssatélites orientadas em direções opostas (Zietkiewicz et al., 1994).

Os produtos amplificáveis são geralmente de 200-2000 pb (pares bases) de comprimento e apresentam alta reprodutibilidade, possivelmente devido ao uso de iniciadores longos e de alta temperatura de anelamento. A limitação dessa classe de marcadores está relacionada ao fato de serem dominantes que impossibilita estabelecer relações alélicas entre os indivíduos.

Os marcadores ISSR têm sido utilizados para estimar a diversidade genética em nível inter e intra-específico em uma ampla variedade de espécies. Além disso, também tem sido utilizados em estudos de DNA "fingerprinting", seleção assistida,

filogenia, formação de grupos heteróticos e mapeamento genético (Zietkiewicz et al., 1994).

O estudo da diversidade é o processo pelo qual a variação entre populações, entre grupos ou entre indivíduos de um mesmo grupo é avaliada por meio de um método específico ou pela combinação de métodos (Pereira et al., 2009). Os dados normalmente envolvem um número grande de mensurações baseados em dados morfológicos e de passaporte, dados bioquímicos, citológicos e em técnicas baseadas no polimorfismo de DNA como os marcadores moleculares que permitem a diferenciação mais realística dos genótipos (Pereira et al., 2009).

Normalmente, para usar a diversidade genética existente nas coleções, o melhorista precisa manipular o germoplasma disponível, buscando genótipos que, através de metodologias adequadas, possam gerar materiais genéticos superiores (Ganga et al., 2004). Várias pesquisas têm sido realizadas utilizando marcadores moleculares para estimar a diversidade genética existente nas coleções de *P. edulis*. Viana et al. (2003), utilizou marcadores RAPD para estimar a distância genética em genótipos de maracujá amarelo e entre espécies de *Passifloras* nativas para uso nos programas de melhoramento. Enquanto que, Bellon et al. (2007), avaliou a divergência com marcadores RAPD em genótipos comerciais e silvestres de *P. edulis*, a fim de direcionar os cruzamentos para uso no mercado de consumo *in natura*, ornamental e medicinal.

## 2.4 Predição do comportamento de híbridos

Uma das principais tarefas dos programas de melhoramento é a seleção de genitores com constituição gênica superior para serem utilizadas em programas visando à obtenção de híbridos ou populações segregantes. A dificuldade nesta escolha está relacionada à baixa capacidade em prever a intensidade e de que forma o efeito gênico de cada genitor é manifestado em sua progênie. Na escolha das combinações híbridas, o melhorista dispõe de algumas técnicas, destacando-se entre elas os cruzamentos dialélicos, que permitem a identificação de genitores baseado em seus próprios valores genéticos e, principalmente, nas suas

capacidades de se combinarem em híbridos e produzir populações segregantes promissoras (Matei, 2010).

A predição da heterose por meio de distâncias genéticas moleculares é uma alternativa promissora para identificação de parentais uma vez que, a heterose é resultante da divergência genética entre genitores e da ocorrência de efeitos de dominância sendo assim, uma maior distância entre genitores poderá resultar em maior vigor híbrido (Colombari Filho et al., 2010).

O uso desta estimativa, além de possibilitar a identificação de grupos heteróticos (Guimarães et al., 2007) também contribuem para minimizar os gastos e tempo necessários para a realização de combinações híbridas muitas vezes desnecessárias (Rinaldi et al., 2007). Aliado a isso, o conhecimento das relações genéticas entre os materiais de melhoramento poderá ajudar a prevenir o risco da uniformidade em germoplasma elite e assegurar ganhos em seleções futuras (Oliveira et al., 2004).

### 3. CAPÍTULO I: DIVERSIDADE GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE *Passiflora edulis* Sims COM O USO DE MARCADORES ISSR

#### 3.1 Introdução

A família *Passifloraceae* é composta por 630 espécies, distribuídas nas regiões tropicais da América, Ásia e África (Vanderplank, 1996). O gênero *Passiflora* originou na América do Sul com distribuição geográfica no centro e norte do Brasil (Lopes, 1991). As espécies deste gênero têm grande valor medicinal, ornamental e, sobretudo, comercial, dentre as quais a espécie *Passiflora edulis* Sims (maracujá amarelo), tem destaque na produção, ocupando cerca de 95% da produção no Brasil (Moraes, 2005).

A variabilidade genética presente nesta espécie torna-se uma ferramenta valiosa para ações de melhoramento. Para tal, é necessário o desenvolvimento de trabalhos de caracterização e avaliação para posterior seleção dos genótipos com caracteres de interesse (Faleiro et al., 2006).

Para fins de caracterização são reconhecidos os descritores morfo-agronômicos, izoenzimáticos e moleculares. Este último, por acessar a variabilidade diretamente em nível de DNA, não sofrer influência do ambiente, ser em grande número e não depender da fase de desenvolvimento das plantas são ideais para conhecimento da variabilidade disponível.

Para a espécie *P. edulis* já foram desenvolvidos alguns trabalhos envolvendo a aplicação de diversos tipos de marcadores moleculares como RAPD - *Random Amplified Polymorphism DNA* - (Viana et al., 2003; Bellon et al., 2007), AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism* - (Ganga et al., 2004), SSR - *Simple Sequence Repeats* - (Oliveira et al., 2005) e ISSR - *Inter Simple Sequence Repeats* - (Santos et al., 2009).

Dentre os marcadores citados, o ISSR por ser de natureza simples e explorar o polimorfismo entre dois motivos de microssatélites, que são abundantes no genoma, torna-se uma ferramenta valiosa para estudos de caracterização para formação de grupos heteróticos, *fingerprinting*, seleção assistida e mapeamento genético. Este marcador têm sido utilizado com sucesso em pesquisas relacionadas

às análises de diversidade genética em diversas fruteiras como laranja trifoliata (Fang et al., 1997), citros (Fang & Roose, 1997), banana diplóide (Godwin et al., 1997) e uva (Moreno et al., 1998; Wu et al., 2009).

A utilização destes marcadores para caracterização de acessos do banco de germoplasma de maracujazeiro trará informações valiosas a respeito do relacionamento a nível molecular entre os diversos acessos que compõem o banco de germoplasma e assim, os melhoristas poderão manejar e conservar os recursos genéticos para uso nos programas de melhoramento desta cultura.

Sendo assim, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de determinar a variabilidade genética presente em acessos do banco de germoplasma e em acessos melhorados do programa de melhoramento genético do maracujazeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), com o uso de marcadores ISSR.

## 3.2 Material e Métodos

### 3.2.1 Coleta das amostras e extração do DNA

Foram coletadas 63 acessos de maracujazeiro, sendo 31 do banco ativo de germoplasma (BAG-Embrapa) e 32 (1 cultivar, 12 híbridos e 19 progênes de meios irmão) provenientes do programa de melhoramento genético de maracujazeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas – BA (Tabela 1).

O DNA dos acessos foi extraído utilizando-se o protocolo com CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Doyle & Doyle (1987), com algumas modificações, conforme o anexo 1. Para diminuir o número de acessos analisados e estando os acessos representados por mais de 10 plantas no banco foi feita um *pool* de DNA de cada um dos 63 acessos analisados.

A quantificação foi feita em gel de agarose 1,0% (p/v) corado com brometo de etídeo (1,0 mg/mL) utilizando como padrão uma série de concentrações do fago Lambda (Invitrogen). A estimativa da concentração de DNA nas amostras foi feita visualmente com base na intensidade das bandas. Posteriormente, o DNA foi diluído para a concentração final de trabalho (10ng/  $\mu\text{L}^{-1}$ ).

**Tabela 1:** Relação dos acessos de Maracujá pertencentes ao BAG- Maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.

<b>Amostra</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Nome Comum</b>	<b>Procedência</b>
1	GP09-11	Maracujá amarelo	Seleção Massal*
2	GP09-06	Maracujá amarelo	Seleção Massal*
3	GP09-02	Maracujá amarelo	Seleção Massal*
4	GP09-04	Maracujá amarelo	Seleção Massal*
5	GP09-07	Maracujá amarelo	Seleção Massal*
6	GP09-08	Maracujá amarelo	Seleção Massal*
7	GP09-03	Maracujá amarelo	Seleção Massal*
8	GP09-10	Maracujá amarelo	Seleção Massal*
9	GP09-09	Maracujá amarelo	Seleção Massal*
10	GP09-01	Maracujá amarelo	Seleção Massal*
11	GP09-05	Maracujá amarelo	Seleção Massal*
12	BGM007	Miúdo de Lavras	UNESP Jaboticabal
13	BGM017	Maracujá roxo	UNESP Jaboticabal
14	BGM022	Roxinho do Kenya	CNPMF
15	BGM023		CENARGEN
16	BGM028	Maracujá amarelo	
17	BGM033	Híbrido	IAPAR
18	BGM041	Maracujá amarelo	CENARGEN
19	BGM044	cv Roxo Austrália	CENARGEN
20	BGM051	Maracujá amarelo	CENARGEN
21	BGM064		
22	BGM076		
23	BGM092		
24	BGM116		Instituto Plantarum
25	BGM140	Maracujá-chino	CNPMF
26	BGM168		Instituto Plantarum
27	BGM185	Maracujá amarelo	ESALQ-USP
28	BGM208	Maracujá roxo	ESALQ-USP
29	BGM222	Maracujá comum	CEASA Rio Vermelho - BA
30	BGM229	Maracujá comum	IAC
31	BGM311	Maracujá amarelo	CNPMF
32	BRS GA	Maracujá amarelo	Cultivar melhorada
33	A17	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente**
34	B19	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente**
35	B20	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente**
36	C02	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente**
37	G16	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente**
38	H02	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente**

39	I02	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente <sup>**</sup>
40	I08	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente <sup>**</sup>
41	J18	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente <sup>**</sup>
Continuação...			
<b>Amostra</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Nome Comum</b>	<b>Procedência</b>
42	J20	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente <sup>**</sup>
43	K07	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente <sup>**</sup>
44	K08	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente <sup>**</sup>
45	K20	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente <sup>**</sup>
46	L03	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente <sup>**</sup>
47	L06	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente <sup>**</sup>
48	L07	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente <sup>**</sup>
49	L21	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente <sup>**</sup>
50	M17	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente <sup>**</sup>
51	M20	Maracujá amarelo	Seleção Recorrente <sup>**</sup>
52	HS209-01	Maracujá amarelo	Híbridos <sup>***</sup>
53	HS209-02	Maracujá amarelo	Híbridos <sup>***</sup>
54	HS209-03	Maracujá amarelo	Híbridos <sup>***</sup>
55	HS209-04	Maracujá amarelo	Híbridos <sup>***</sup>
56	HS209-05	Maracujá amarelo	Híbridos <sup>***</sup>
57	HS209-06	Maracujá amarelo	Híbridos <sup>***</sup>
58	HS209-07	Maracujá amarelo	Híbridos <sup>***</sup>
59	HS209-08	Maracujá amarelo	Híbridos <sup>***</sup>
60	HS209-09	Maracujá amarelo	Híbridos <sup>***</sup>
61	HS209-10	Maracujá amarelo	Híbridos <sup>***</sup>
62	HS209-11	Maracujá amarelo	Híbridos <sup>***</sup>
63	HS209-12	Maracujá amarelo	Híbridos <sup>***</sup>

\*: Parentais provenientes de seleção massal em acessos de germoplasma do BAG-Maracujá.

\*\* : Variedades oriundas de um programa de seleção recorrente entre e dentro de progênies de meios irmãos, obtidas da população original "Cajuba".

\*\*\* : Híbridos oriundos de cruzamento em dialelo parcial entre parentais com alta performance agrônômica, sobretudo para produtividades e qualidade de frutos.

### 3.2.2 Genotipagem dos marcadores ISSR

A reação de amplificação foi feita no volume final de 15 uL contendo 10 ng de DNA, tampão de PCR 1X (Invitrogen), 1,5 mM (Mix 1) ou 2,5 mM (Mix 3) de MgCl<sub>2</sub>

(Tabela 2), 200  $\mu$ M de dNTP mix, 0,3  $\mu$ M de cada iniciador, 1U da Taq DNA Polimerase.

O programa de amplificação foi realizado no termociclador *Applied Biosystems* e consistiu de um ciclo de desnaturação a 94 °C por 5 min; 35 ciclos a 94 °C por 40s, 45 ou 48 °C por 40s (Tabela 2), 72 °C por 60s; e extensão final a 72 °C por 5min.

Foram utilizados vinte e três iniciadores de ISSR (Tabela 2). A eletroforese foi realizada em gel 2% de agarose e coloração com brometo de etídeo, visualizados sob luz UV. O tamanho dos fragmentos foi determinado com marcador de peso molecular 100 pb (BioLabs).

**Tabela 2:** Condições de reação e amplificação dos Iniciadores de ISSR.

Nome do <i>primer</i>	Ta*	MIX	Nome do <i>primer</i>	Ta*	MIX
DiCA3'G	48	1	TriAAC 3'RC	45	3
DiCA3'RG	48	1	TriAAG 3'RC	48	1
DiCA3'YG	48	1	TriACG 3'RC	48	1
DiGA3'C	48	1	TriAGA 3'RC	48	1
DiGA3'RC	48	1	TriTGG 3'RC	48	1
DiGA3'T	48	1	TriCGA 3'RC	48	1
TriCAC3'RC	48	1	TriCGC 3'RC	48	1
TriCAC3'YC	48	1	TriGAC 3'RC	48	1
TriCAC5'CY	48	1	TriGCA 3'RC	48	1
TriCAG3'RC	45	1	TriGCC 3'RC	48	3
TriGTG3'YC	48	1	TriGGA 3'RC	48	1
TriTGT3'YC	48	3			

Ta\*: Temperatura de anelamento do iniciador.

### 3.2.3 Análise dos dados

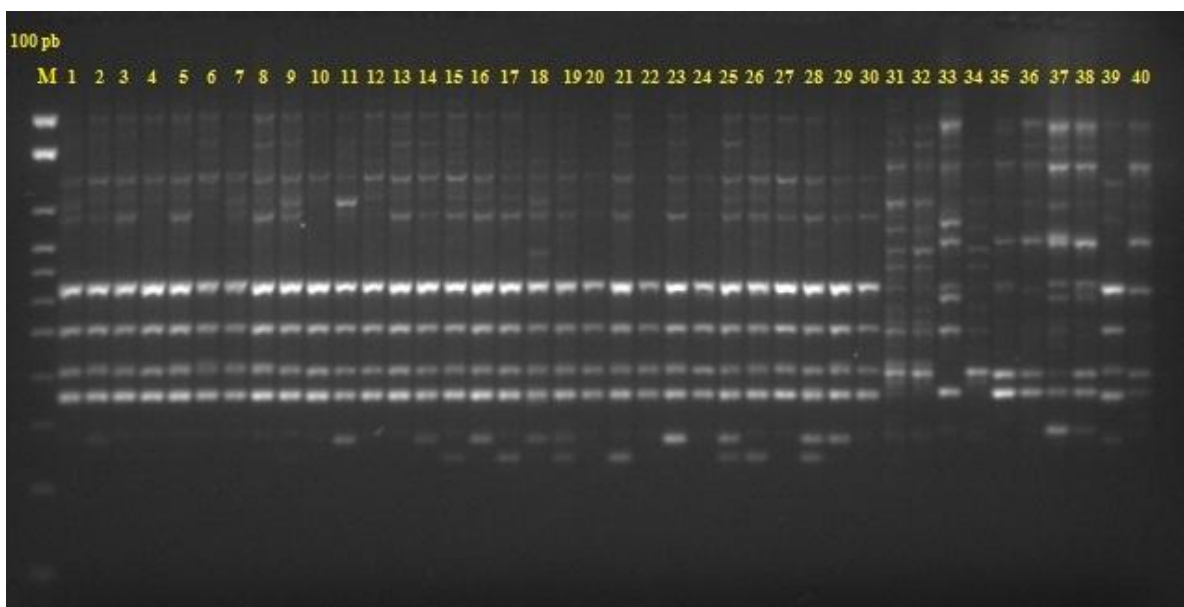
Os marcadores ISSR foram convertidos em dados binários, onde se atribui um para presença e zero para ausência de bandas. Os marcadores que se mostraram polimórficos foram submetidos a uma análise de diversidade utilizando o coeficiente de dissimilaridade “*Simple Matching*” no programa Genes (Cruz, 2008). Na matriz de dissimilaridade foi utilizado o *software* Mega 4.1 (Tamura et al., 2007) para obtenção do dendrograma utilizando como método de agrupamento o *neighbor*



*joining*. O ajuste entre a matriz de distâncias e dendrograma foi verificado através de correlação cofenética ( $r_c$ ).

### 3.3 Resultados e Discussão

Foram utilizados 23 iniciadores ISSR para a caracterização de 63 acessos de maracujazeiro. Dos 23 iniciadores testados, 22 iniciadores detectaram polimorfismo nos acessos analisados. O número de bandas variou de 3 a 23 para os iniciadores TriTGG 3'RC e DiGA3'RC, respectivamente (Tabela 3). O iniciador TriGCC 3'RC foi monomórfico nos acessos testados. Os marcadores geraram um total de 326 bandas, sendo que 320 foram polimórficas (média de 13,9 bandas por iniciador) com o tamanho dos fragmentos variando entre 220 a 2300 pb (Figura 1).



**Figura 1:** Padrão de amplificação do Iniciador DiGA3'T. M: Marcador de peso molecular 100 pb (Bio Labs), amostras 1 a 40 de acordo com a ordem da tabela 1.

Estes resultados comprovam o alto conteúdo informativo deste marcador (Tabela 3). Resultado semelhante foi observado por Moreno et al. (1998) caracterizando 12 acessos de videira por meio de marcadores ISSR, em que a média foi 13,8 bandas por iniciador.

**Tabela 3:** Características dos 23 Iniciadores utilizados na análise de diversidade genética no maracujazeiro. \*R = A, G; Y = C, T

Iniciador	Sequência do Iniciador	Nº Total de Bandas	Nº de Bandas Polimórficas	Porcentagem de Polimorfismo
DiCA3'G	CACACACACACACACAG	20	20	100,00
DiCA3'RG	CACACACACACACACARG	14	14	100,00
DiCA3'YG	CACACACACACACACAYG	15	15	100,00
DiGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	15	15	100,00
DiGA3'RC	GAGAGAGAGAGAGAGARC	23	23	100,00
DiGA3'T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	19	19	100,00
TriCAC5'CY	CYCACACCACCACCAC	21	21	100,00
TriCAG3'RC	CAGCAGCAGCAGCAGRC	6	6	100,00
TriGTG3'YC	GTGGTGGTGGTGGTYC	15	14	93,33
TriTGT3'YC	TGTTGTTGTTGTTGTYC	11	11	100,00
TriAAC 3'RC	AACAACAACAACRC	13	13	100,00
TriAAG 3'RC	AAGAAGAAGAAGRC	13	13	100,00
TriACG 3'RC	ACGACGACGACGRC	16	16	100,00
TriAGA 3'RC	AGAAGAAGAAGARC	10	10	100,00
TriTGG 3'RC	TGGTGGTGGTGGTGGRC	3	1	33,33
TriCGA 3'RC	CGACGACGACGARC	15	15	100,00
TriCGC 3'RC	CGCCGCCGCCGCCRC	14	11	78,57
TriGAC 3'RC	GACGACGACGACRC	7	3	42,86
TriGCA 3'RC	GCAGCAGCAGCAGRC	13	13	100,00
TriGCC 3'RC	GCCGCCGCCGCCRC	6	0	0,00
TriGGA 3'RC	GGAGGAGGAGGAGRC	19	19	100,00

O alto polimorfismo e a baixa porcentagem de marcadores monomórficos também foi evidenciado no trabalho desenvolvido por Bellon et al. (2007) para a cultura do maracujazeiro utilizando 13 *primers* de RAPD. Segundo estes autores, a elevada porcentagem de marcadores polimórficos pode estar associada com alta variabilidade genética intra-específica de *P. edulis*. No entanto, Viana et al., (2003), estudando a diversidade genética entre 21 genótipos comerciais de maracujá amarelo, por meio 36 iniciadores de RAPD, observou baixo polimorfismo, mesmo com grande variações morfológicas observadas em condições de campo.

Um estudo realizado por Wu et al. (2009) com 15 iniciadores de ISSR com genótipos pertencentes ao gênero *Vitis* produziu um total de 100 bandas das quais 91 bandas foram polimórficas. Estes autores argumentam que, apesar de ISSR não

ser o melhor marcador para filogenia taxonômica, o alto número de bandas polimórficas possibilitou o agrupamento por origem geográfica.

Neste trabalho, observou-se que as repetições de dinucleotídeos foram as que apresentaram maior polimorfismo que os de trinucleotídeos com média de 17,66 e 11,82 alelos por *primer*, respectivamente. Segundo Reedy et al. (2002), os dinucleotídeos são mais freqüentes que os tri e tetranucleotídeos e as repetições AG são as mais abundantes no genoma das plantas. O oposto foi verificado no trabalho desenvolvido por Santos et al. (2011 – no prelo), com espécies do gênero *Passiflora*, em que os trinucleotídeos foram mais polimórficos que os dinucleotídeos com média de 15,5 e 10,5 alelos por iniciador, respectivamente.

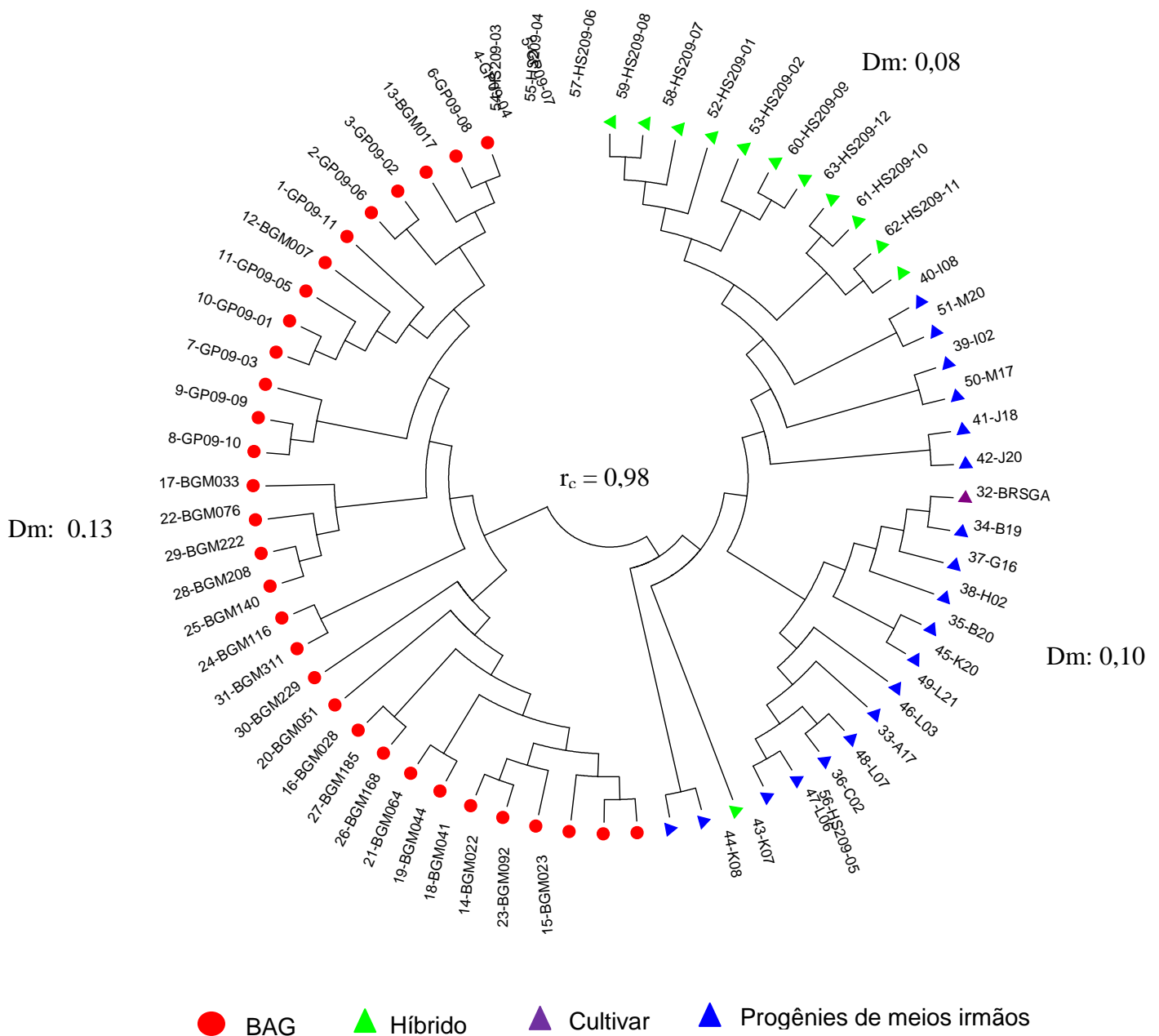
Observou-se alta correlação cofenética (0,98) indicando que o dendograma apresenta um bom ajuste em relação aos dados da matriz de dissimilaridade (Figura 2). A amplitude da matriz de dissimilaridade foi de 0,049 a 0,407. A análise visual dos dados permitiu a separação dos acessos em dois grandes grupos: Um constituído por acessos que compõem o banco de germoplasma (BGM e GP) e o outro representado pelos híbridos, cultivar e progênies de meios irmãos provenientes do programa de melhoramento (Figura 2).

Os acessos do banco de germoplasma apresentaram a maior dissimilaridade média (0,13) e foram agrupados em diferentes subgrupos. A grande variabilidade genética deste grupo evidencia a ampla base genética da espécie, abrindo boas perspectivas para uso no melhoramento, uma vez que, essa diversidade poderá ser explorada para obtenção de novos híbridos ou para organização do germoplasma em grupos heteróticos.

Já os acessos oriundos do programa de melhoramento foram agrupados em três subgrupos, um grupo representado por acessos de progênies de meios irmãos, híbridos da série HS e o BRS GA. Os acessos provenientes das progênies de meios irmãos (primeiro ciclo de seleção recorrente) foram os mais heterogêneos deste grupo com dissimilaridade média de 0,10. O subgrupo mais divergente, dentro das progênies de meios irmãos, foi representado pelos acessos K07 e K08.

Essa heterogeneidade entre os indivíduos das progênies de meios irmãos poderá ser de grande utilidade para seleção dos indivíduos que irão compor os novos ciclos de recombinação na seleção recorrente.

O acesso Gigante Amarelo (BRS GA) é um híbrido melhorado e lançado pela Embrapa Cerrados, em parceria com a Embrapa Mandioca e Fruticultura. Este híbrido agrupou-se com as progênes de meios irmãos obtidos pelo programa de melhoramento da Embrapa Mandioca e Fruticultura, com dissimilaridade média entre os genótipos das progênes de meios irmãos de 0,11. Uma alta similaridade (0,92) foi observada entre o BRS GA e a progênie B19, indicando que podem compartilhar de *pool* gênicos.



**Figura 2:** Dendrograma obtido pelo método *neighbor-joining*, a partir da dissimilaridade genética entre 63 acessos de maracujazeiro, utilizando marcadores

ISSR. Os grupos avaliados estão identificados com a bolinha vermelha (BAG); triângulos azuis (meios irmãos), roxo (cultivar melhorada) e verde (híbridos). Dm: dissimilaridade média por grupo;  $r_c$ : correlação cofenética.

Os híbridos da série HS possuem menor variabilidade (dissimilaridade média de 0,08). Esta menor variabilidade é esperada em virtude de compartilhar genitores em comuns. Contudo, o híbrido HS209-05 foi o mais divergente entre estes, com dissimilaridade genética média entre os demais de 0,09 justificando sua alocação separada dos demais no dendrograma (Figura 2).

De forma geral, foi evidenciado que há diversidade genética entre os acessos, devido entre outros fatores ao sistema de auto-incompatibilidade que favorece a polinização cruzada e, conseqüentemente, o fluxo gênico entre os genótipos distintos, justificando portanto, o alto polimorfismo encontrado.

Por outro lado, estudos realizado por Viana et al. (2003), utilizando diferentes acessos da espécie comercial *P. edulis*, não mostraram expressiva variabilidade genética, indicando um possível estreitamento da diversidade genética entre esses genótipos. A baixa variabilidade genética pode contribuir para a redução da resistência a estresses bióticos e abióticos.

Os programas de melhoramento genético normalmente visam o desenvolvimento de materiais superiores, principalmente com relação a caracteres de interesse agrônômico e tendem a utilizar a hibridação intra-específica para a transferência de genes de interesse (Ganga et al., 2004).

Nesse sentido, estudos de diversidade genética são essenciais nos programas de melhoramento genético a fim de conhecer o parentesco entre os genótipos e, assim direcionar os cruzamentos visando obter ganhos genéticos nas gerações segregantes.

### 3.4 Conclusões

- Os marcadores ISSR mostraram-se ferramentas valiosas para estudo de diversidade genética dentro de *P.edulis*;
- A variabilidade presente nos acessos que compõe o BAG-Maracujá poderão auxiliar na implementação de estratégias mais eficientes a serem utilizadas no Programa de Melhoramento Genético de Maracujazeiro do CNPMF;
- Os cruzamentos podem ser direcionados, selecionando os acessos do banco mais divergentes para obtenção de alta heterose em futuras ações visando à obtenção de híbridos;
- Os genótipos K07 e K08 foram os mais divergentes entre os genótipos das progênies de meios irmãos, podendo ser utilizados nos próximos ciclos de seleção como potenciais parentais.

## 4. CAPÍTULO II: CORRELAÇÃO ENTRE HETEROSE E DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE MARACUJÁ AMARELO

### 4.1 Introdução

O Brasil é considerado um dos centros de diversidade genética do gênero *Passiflora*. A principal espécie cultivada é a *Passiflora edulis* Sims conhecida por maracujá azedo ou maracujá amarelo, uma fruteira de clima tropical com ampla distribuição geográfica. O Brasil se destaca como maior produtor mundial de maracujá, devido às excelentes condições edafoclimáticas para o seu cultivo. A partir da década de 70 com a crescente evolução da área de plantio em virtude da instalação de indústrias de beneficiamento de suco e aceitação comercial da fruta para consumo *in natura* (Matta, 2005).

Uma das maiores dificuldades apontadas pelos produtores é a limitação de cultivares com boas características agronômicas e que sejam principalmente resistentes as principais doenças da cultura. O desenvolvimento de novos híbridos torna-se uma alternativa viável para a cultura. O aumento da produção está relacionado com o potencial genético dos genitores, assim é necessário avaliar os genótipos a fim de selecionar os acessos mais divergentes e desta forma, selecionar os genótipos mais promissores diminuindo os gastos e o tempo necessário para a realização de várias combinações híbridas (Matei, 2010). Nesse sentido, é necessário conhecer o quanto os acessos são divergentes através de uma análise de diversidade.

A análise de diversidade pode ser estimada com base em dados qualitativos, quantitativos e moleculares. Os marcadores moleculares por não sofrer influência ambiental, ser altamente polimórfico e não depender do estágio de desenvolvimento da planta são ideais para este fim (Rinaldi et al., 2007).

Os cruzamentos dialélicos permitem identificar genitores baseado-se nos seus valores genéticos e na capacidade de combinação dos genótipos (Rinaldi et al., 2007) e assim, possibilitando a obtenção das estimativas da Capacidade Geral de Combinação (CGC) e Capacidade Específica de Combinação (CEC), na tentativa de se obter híbridos produtivos e com alto vigor (Guimarães et al., 2007). Porém, a seleção de genótipos contrastantes, com base na análise de diversidade em uma etapa anterior as hibridações, evitará cruzamentos desnecessários.

Na cultura do maracujazeiro não existem relatos sobre a correlação da estimativa da diversidade genética por meio de marcadores moleculares com heterose. Alguns trabalhos já foram desenvolvidos com milho (Guimarães et al., 2007; Paterniani et al. 2008), milho-pipoca (Rinaldi et al., 2007) e aveia (Lorencetti et al., 2006). De acordo com Guimarães et al., (2007), o uso de ferramentas moleculares têm grande relevância na avaliação da dissimilaridade genética entre linhagens de milho e na determinação de grupos heteróticos entre elas, pois quanto maior a distância genética entre os genitores, maior será a heterose e, conseqüentemente, a produção do híbrido. No entanto, nem sempre há correlação entre divergência genética obtida por marcadores moleculares e o desempenho do híbrido (Paterniani et al. 2008).

Assim, o objetivo deste estudo foi correlacionar a heterose, estimada por avaliações de genótipos obtidos por cruzamentos dialélicos entre dois grupos de genótipos de maracujá amarelo, com a divergência genética obtida pelo uso de marcadores moleculares ISSR.

## **4.2 Material e Métodos**

### **4.2.1 Análise dialélica**

O experimento foi conduzido em área de produção, na Zona Rural da Imbira, no município de Cruz das Almas (BA), em delineamento de blocos casualizados com três repetições, 41 tratamentos (11 parentais e 30 híbridos), com parcela de 4 plantas. O plantio foi realizado em novembro de 2009, em espaçamento de 2,6 m



entre linhas e 3,7 m entre plantas. O sistema de condução utilizado foi de espaldadeira vertical.

Os genótipos de maracujazeiro (*P. edulis* Sims) estudados são oriundos de cruzamentos entre parentais selecionados pelo Programa de Melhoramento Genético do Maracujazeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Para isso, foram realizados cruzamentos entre 11 parentais com alto potencial agrônomo, sendo o grupo I utilizando como femininos (GP09-01, GP09-02, GP09-03, GP09-04, GP09-05, GP09-06) e o grupo II como parental masculino (GP09-07, GP09-08, GP09-09, GP09-10 e GP09-11). Destes cruzamentos foram obtidas 30 combinações híbridas, segundo o dialelo parcial tipo North Carolina - delineamento II (6 x 5).

Foram avaliados os seguintes caracteres agrônomo: 1) número de frutos (NF); 2) peso médio de frutos (PF); 3) produtividade em t.ha<sup>-1</sup> (PROD); 4) rendimento (REND) e 5) sólidos solúveis totais (SST). A produtividade foi calculada com base nos três meses iniciais de colheita, sendo o cálculo estendido para 9 meses de produção da cultura. Foi realizada uma análise de variância e, posteriormente, as médias das variáveis foram comparadas pelo teste de Scott Knott (Scott Knott, 1974) a 5% de probabilidade. Para a análise dialélica parcial dos genitores e da F<sub>1</sub> foi utilizado o método Kempthorne (1966). As estimativas da heterose (H) foram realizadas através de:  $H = \bar{F}_1 - MP$ , em que  $\bar{F}_1$  = média dos híbridos simples e MP = média das linhagens parentais (FALCONER, 1981).

O modelo apresenta a decomposição da soma de quadrados de tratamentos em somas de quadrados associados à capacidade combinatória dos dialelos parciais que incluem os parentais, sendo:

$$Y_{ij} = \mu + \frac{1}{2}(d_1 + d_2) + g_i + g'_j + S_{ij} + e_{ij}$$

Em que:  $Y_{ij}$  é a média do cruzamento envolvendo o i-ésimo genitor do grupo 1 e o j-ésimo genitor do grupo 2;  $\mu$  é a média geral do dialelo;  $d_1$  e  $d_2$  são os contrastes envolvendo as médias dos grupos 1 e 2 e a média geral do dialelo;  $g_i$  é o efeito da capacidade geral de combinação do i-ésimo genitor do grupo 1;  $g'_j$  é o efeito da capacidade geral de combinação do j-ésimo genitor do grupo 2;  $S_{ij}$  o efeito da capacidade específica de combinação e  $e_{ij}$  é o erro experimental médio. Todas as análises foram efetuadas com Programa GENES (CRUZ, 2008).

#### 4.2.2 Análise molecular

O DNA dos acessos foi extraído utilizando-se o protocolo com CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Doyle & Doyle (1987), com algumas modificações, conforme o anexo 1. Para diminuir o número de acessos analisados e estando os acessos representados por mais de 10 plantas no banco foi feita um *pool* de DNA de cada um dos 11 parentais analisados.

A quantificação foi feita em gel de agarose 1,0% (p/v) corado com brometo de etídeo (1,0 mg/mL) utilizando como padrão uma série de concentrações do fago Lambda (Invitrogen). A estimativa da concentração de DNA nas amostras foi feita visualmente com base na intensidade das bandas. Posteriormente, o DNA foi diluído para a concentração final de trabalho (10ng/  $\mu\text{L}^{-1}$ ).

A reação de amplificação foi feita no volume final de 15 uL contendo 10 ng de DNA, tampão de PCR 1X (Invitrogen), 1,5 mM (Mix 1) ou 2,5 mM (Mix 3) de  $\text{MgCl}_2$  (Tabela 2), 200 uM de dNTP mix, 0,3 uM de cada iniciador, 1U da Taq DNA Polimerase.

O programa de amplificação foi realizado no termociclador *Applied Biosystems* e consistiu de um ciclo de desnaturação a 94 °C por 5 min; 35 ciclos a 94 °C por 40s, 45 ou 48 °C por 40s (Tabela 2), 72 °C por 60s; e extensão final a 72 °C por 5min.

Foram utilizados 23 iniciadores de ISSR (Tabela 2). A eletroforese foi feita em gel 2% de agarose e a coloração com brometo de etídeo, visualizados sob luz UV. O tamanho dos fragmentos foi determinado com marcador de peso molecular 100 pb (Bio Labs).

Os marcadores ISSR foram convertidos em dados binários, onde se atribui um para presença e zero para ausência de bandas. Os marcadores que se mostraram polimórficos foram submetidos a uma análise de diversidade utilizando o coeficiente de dissimilaridade “*Simple Matching*” no programa Genes (Cruz, 2008). Na matriz de dissimilaridade foi utilizado o *software* Mega 4.1 (Tamura et al., 2007) para obtenção do dendrograma utilizando como método de agrupamento o *neighbor joining*. O ajuste entre a matriz de distâncias e dendrograma foi verificado através de correlação cofenética ( $r_c$ ).

Foram também estimadas as correlações simples entre número de frutos (NF); peso médio de frutos (PF); produtividade em  $\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}$  (PROD); rendimento

(REND) e sólidos solúveis totais (SST), heterose (H) e capacidade específica de combinação (CEC) com a distância genética (DG) obtida por ISSR. A significância da correlação foi obtida utilizando o teste de Mantel com 5000 permutações.

### 4.3 Resultados e Discussão

O resumo da análise de variância dos cruzamentos dialélicos é apresentado na Tabela 4. Os coeficientes de variação para os caracteres número de frutos, peso do fruto, produtividade, rendimento de polpa e sólidos solúveis totais foram de 17,79%, 10,75%, 17,96%, 17,79% e 8,09%, respectivamente.

Os quadrados médios para os tratamentos foram todos significativos pelo teste F ( $P < 0,01$ ), evidenciando que os tratamentos são geneticamente contrastantes. O desdobramento dos tratamentos mostra que há diferenças significativas, exceção para rendimento de polpa. Por outro lado, os grupos de parentais não diferiram significativamente para os caracteres avaliados. Porém, a capacidade específica de combinação (CEC) foi significativa para todos os caracteres agronômicos avaliados ( $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ ) o que reflete a complementariedade de genes de efeito não aditivo em alguns loci. Efeito da capacidade geral de combinação (CGC) não foi significativo para todos os caracteres avaliados do grupo I e II, à exceção para número de frutos (Tabela 4).

De acordo com Tabela 5, as médias das variáveis número de frutos (108,11) e produtividade (22,67) foram mais expressivas para os parentais do grupo I, enquanto que, as médias das outras variáveis agronômicas analisadas foram mais relevantes nos parentais do grupo II, sendo que, para peso médio do fruto, rendimento e sólidos solúveis totais, as médias foram de 231,99, 29,32 e 13,2, respectivamente.

Os híbridos 3x5' (GP09-03xGP09-11), 5x1' (GP09-05xGP09-07) e 4x2' (GP09-04xGP09-08) se destacaram para todos os caracteres avaliados tanto em média, heterose e capacidade específica de combinação (tabela 5). As amplitudes das médias entre as variáveis agronômicas analisadas foram: 58,50 (GP09-06xGP09-07)

à 170,66 (GP09-01xGP09-09), 181,13 (GP09-02xGP09-08) à 299,76 (GP09-06xGP09-11), 14,94 (GP09-06xGP09-07) à 33,14 (GP09-03xGP09-11), 19,65 (GP09-03xGP09-10) à 35,44 (GP09-05xGP09-07) e 11,42 (GP09-01xGP09-10) à 15,16 (GP09-04xGP09-08) para número de frutos, peso médio de frutos, produtividade, rendimento e sólidos solúveis totais, respectivamente.

Entretanto, os valores da heterose individuais nos cruzamentos variaram em magnitude e sinal dependendo do caráter (Tabela 5). Dentre os caracteres avaliados, a heterose variou de -62,67 a 78,0 para número de frutos; -33,03 a 67,1 para peso do fruto; -9,28 a 14,68 para produtividade; -8,24 a 11,69 para rendimento e -1,88 a 3,11 para sólidos solúveis totais.

**Tabela 4:** Valores e significâncias dos quadrados médios da análise de variância, média geral, média dos genitores, média dos cruzamentos e coeficiente de variação experimental (CV%), para os caracteres agrônômicos.

Análise de Variância das Variáveis						
Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio				
		NF	PF	PROD	REND	SST
Blocos(B)	2	1071,64	1133,64	40,46	66,06	5,87
Tratamento(T)	40	1868,78**	2989,45**	81,89**	47,34**	3,74**
Parentais	10	1666,48**	2686,04**	93,88**	35,23 <sup>ns</sup>	7,20**
Grupo I	5	1867,27**	2282,48**	105,98**	44,77 <sup>ns</sup>	5,28**
Grupo II	4	1641,87**	3385,05**	101,75**	21,74 <sup>ns</sup>	11,39**
Grupo I vs Grupo II	1	760,96 <sup>ns</sup>	1907,77 <sup>ns</sup>	1,93 <sup>ns</sup>	41,45 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>
Parentais vs Cruz	1	30,81 <sup>ns</sup>	12431,87**	132,28**	24,93 <sup>ns</sup>	0,87 <sup>ns</sup>
Cruzamento	29	2001,92**	2768,47**	76,01**	52,30**	2,65**
CGC Grupo I	5	3177,35**	4973,91 <sup>ns</sup>	48,83 <sup>ns</sup>	51,92 <sup>ns</sup>	0,97 <sup>ns</sup>
CGC Grupo II	4	1515,77**	1762,76 <sup>ns</sup>	63,21 <sup>ns</sup>	73,96 <sup>ns</sup>	5,41 <sup>ns</sup>
CEC I x II	20	1805,29**	2418,25**	85,37**	48,06*	2,52**
Resíduo	80	346,03	668,04	18,83	23,68	1,1
Total	122					
CV(%)		17,79	10,75	17,96	17,79	8,09
Média Geral		104,55	240,27	24,16	27,35	13,01
Média Parentais		103,22	224,36	22,42	28,19	13,15
Média Cruzamento		104,85	245,8	24,78	27,07	12,91

\*; \*\*: Significativo a 5%; significativo a 1% e não significativo, respectivamente pelo teste F.



**Tabela 5:** Valores médios obtidos para número de frutos, peso do fruto, produtividade, rendimento e sólidos solúveis totais de parentais e 30 híbridos do dialelo parcial, heterose (H), estimativa da capacidade específica de combinação ( $\hat{S}_{ij}$ ) e valores de divergência genética (DG) obtida por ISSR.

T	Parentais e Híbridos	Origem	Número de Frutos (NF)			Peso do Fruto (PF)			Produtividade (t.ha-1)			Rendimento			Sólidos Solúveis Totais			DG ISSR
			Média NF	H	$\hat{S}_{ij}$	Média PF	H	$\hat{S}_{ij}$	Média PROD	H	$\hat{S}_{ij}$	Média REND	H	$\hat{S}_{ij}$	Média SST	H	$\hat{S}_{ij}$	
1 (1)	GP09-01		108,00c	-	-	164,35b	-	-	17,18b	-	-	28,99a	-	-	13,47a	-	-	-
2 (2)	GP09-02		113,33b	-	-	221,40b	-	-	24,46a	-	-	30,88a	-	-	12,8b	-	-	-
3 (3)	GP09-03		152,00a	-	-	218,40b	-	-	32,28a	-	-	25,80b	-	-	12,34b	-	-	-
4 (4)	GP09-04		89,00c	-	-	231,03b	-	-	20,03b	-	-	26,77b	-	-	15,01a	-	-	-
5 (5)	GP09-05		80,00c	-	-	219,80b	-	-	16,64b	-	-	20,19b	-	-	11,16b	-	-	-
6 (6)	GP09-06		106,33c	-	-	245,40b	-	-	25,43a	-	-	29,79a	-	-	13,88a	-	-	-
<b>Média G I(i)</b>			<b>108,11</b>			<b>216,73</b>			<b>22,67</b>			<b>27,07</b>			<b>13,11</b>			
7 (1')	GP09-07		94,00c	-	-	227,48b	-	-	20,55b	-	-	27,32b	-	-	12,95b	-	-	-
8 (2')	GP09-08		136,33b	-	-	206,93b	-	-	27,58a	-	-	33,70a	-	-	15,13a	-	-	-
9 (3')	GP09-09		77,33c	-	-	213,77b	-	-	16,20b	-	-	28,44a	-	-	13,82a	-	-	-
10 (4')	GP09-10		82,00c	-	-	221,33b	-	-	17,56b	-	-	29,99a	-	-	10,01b	-	-	-
11 (5')	GP09-11		102,00c	-	-	290,46a	-	-	29,01a	-	-	27,17b	-	-	14,1a	-	-	-
<b>Média G II(j)</b>			<b>98,33</b>			<b>231,99</b>			<b>22,18</b>			<b>29,32</b>			<b>13,2</b>			
12	1x1'	GP09-01 x GP09-07	122,33b	21,33	7,86	209,93b	14,01	-10,93	24,99a	-6,12	1,46	26,79b	-1,36	-3,17	13,6a	0,39	0,51	0,1089
13	2x1'	GP09-02 x GP09-07	77,33c	-26,33	-18,19	263,33a	38,88	18,84	19,79b	-2,72	-2,77	29,59a	0,48	-2,53	12,78b	-0,09	-0,79	0,0621
14	3x1'	GP09-03 x GP09-07	60,33c	-62,67	-28,26	290,05a	67,1	27,16	17,13b	-9,28	-5,34	33,68a	7,12	1,7	13,98a	1,34	1	0,0948
15	4x1'	GP09-04 x GP09-07	97,66c	6,17	7,67	237,65b	8,39	-25,83	22,62b	2,32	-0,38	32,83a	5,79	1,87	12,72b	-1,26	-0,32	0,0495
16	5x1'	GP09-05 x GP09-07	125,33b	38,33	43,3	254,86a	31,22	0,7	31,22a	12,63	11,02	35,44a	11,69	5,86	12,4b	0,34	-0,51	0,1115
17	6x1'	GP09-06 x GP09-07	58,50c	-41,66	-12,39	261,60 b	25,15	-9,93	14,94b	-8,04	-3,97	23,39b	-5,17	-3,73	13,00b	-0,41	0,11	0,0848
18	1x2'	GP09-01 x GP09-08	87,66c	-34,49	-50,95	238,08a	53,16	38,25	20,49b	1,89	-7,35	23,75b	-7,59	-3,54	12,72a	-1,58	-1,08	0,1167
19	2x2'	GP09-02 x GP09-08	139,33b	14,5	19,63	181,13b	-33,03	-43,03	27,74a	1,73	0,85	27,93a	-4,35	-1,51	13,96a	0	0,33	0,0906
20	3x2'	GP09-03 x GP09-08	128,66b	-15,49	15,9	228,93b	16,26	-13,63	28,22a	-1,71	1,4	30,33a	0,58	1,02	14,62a	0,8	0,91	0,1219
21	4x2'	GP09-04 x GP09-08	120,00b	7,33	5,83	262,93a	43,95	19,76	30,54a	6,74	3,21	32,48a	2,24	4,18	15,16a	0,09	1,39	0,0883
22	5x2'	GP09-05 x GP09-08	86,50c	-21,66	19,69	223,65b	10,28	-10,19	18,45b	-3,66	-6,08	23,14b	-3,8	-3,76	12,43b	-0,71	-1,2	0,1387
23	6x2'	GP09-06 x GP09-08	124,33b	3	29,26	260,06a	33,9	8,85	31,22a	4,72	7,97	28,06a	-3,69	3,6	13,92a	-0,58	0,31	0,1145
24	1x3'	GP09-01 x GP09-09	170,66a	78	36,84	189,73b	0,66	-21,64	31,23a	14,54	4,22	24,84b	-3,86	0,19	13,54a	-0,1	0,88	0,0883

Tabela 5: Cont...

T	Parentais e Híbridos	Origem	Número de Frutos (NF)			Peso do Fruto (PF)			Produtividade (t.ha-1)			Rendimento			Sólidos Solúveis Totais			DG ISSR
			Média NF	H	$\hat{S}_{ij}$	Média PF	H	$\hat{S}_{ij}$	Média PROD	H	$\hat{S}_{ij}$	Média REND	H	$\hat{S}_{ij}$	Média SST	H	$\hat{S}_{ij}$	
25	2x3'	GP09-02 x GP09-09	103,00c	7,67	-11,88	252,26a	34,68	17,27	25,09a	4,76	-0,95	28,43a	-1,23	1,6	13,94a	0,63	0,71	0,0938
26	3x3'	GP09-03 x GP09-09	97,33c	-17,33	-10,62	209,53b	-6,56	-43,86	20,04b	-4,2	-5,92	29,14a	2,03	2,47	12,44b	-0,65	-0,19	0,1000
27	4x3'	GP09-04 x GP09-09	118,00b	34,83	8,64	285,80a	63,39	31,8	32,79a	14,68	6,31	23,84b	-3,76	-1,81	12,21b	-0,22	-0,48	0,0978
28	5x3'	GP09-05 x GP09-09	80,66c	2	-20,71	280,83a	64,04	36,15	21,99b	5,57	-1,69	20,56b	-3,76	-3,71	12,29b	-0,2	-0,27	0,1129
29	6x3'	GP09-06 x GP09-09	88,00c	-3,83	-2,25	242,33b	12,74	-19,71	20,44b	-0,36	-1,95	23,07b	-6,04	1,26	11,97b	-1,88	-0,56	0,1010
30	1x4'	GP09-01 x GP09-10	129,00b	34	1,95	215,60b	22,76	3,21	26,99a	9,62	0,94	28,66a	-0,82	2,96	11,42b	-0,31	-0,87	0,1197
31	2x4'	GP09-02 x GP09-10	105,00c	7,33	-3,11	257,20a	35,83	21,18	26,45a	5,44	1,35	34,16a	3,72	6,29	13,68a	2,27	0,87	0,1090
32	3x4'	GP09-03 x GP09-10	104,00c	-13	2,82	283,40a	63,53	28,99	28,91a	3,99	3,89	19,65b	-8,24	-8,07	11,46b	0,29	-0,73	0,1186
33	4x4'	GP09-04 x GP09-10	114,66b	29,17	12,08	211,86b	-14,31	-43,14	23,79b	5	-1,73	24,53b	-3,84	-2,16	11,46b	-1,04	-0,8	0,1165
34	5x4'	GP09-05 x GP09-10	87,66c	6,67	-6,94	237,30b	16,73	-8,39	20,09b	2,99	-2,64	26,74b	1,64	1,41	13,70a	3,11	1,56	0,1457
35	6x4'	GP09-06 x GP09-10	76,66c	-17,49	-6,8	261,20a	27,83	-1,86	19,62b	-1,86	-1,82	22,42b	-7,46	-0,43	12,09b	0,14	-0,01	0,1384
36	1x5'	GP09-01 x GP09-11	135,66b	30,33	4,28	217,53b	-9,88	-8,9	28,92a	5,82	0,71	29,72a	1,63	3,56	13,53a	-0,26	0,63	0,1126
37	2x5'	GP09-02 x GP09-11	126,00b	18	13,55	235,80b	-20,13	-14,25	28,78a	2,04	1,52	24,47b	-4,56	-3,85	12,93b	-0,52	-0,45	0,1229
38	3x5'	GP09-03 x GP09-11	125,66b	-1,66	20,15	269,80a	15,36	1,34	33,14a	2,49	5,97	31,04a	4,56	2,87	11,80b	-1,43	-0,99	0,1570
39	4x5'	GP09-04 x GP09-11	72,66c	-23,16	-34,24	286,46a	25,72	17,41	20,29b	-4,23	-7,4	25,07b	-1,9	-2,08	13,09b	-1,47	0,22	0,1229
40	5x5'	GP09-05 x GP09-11	103,00c	11,66	4,05	241,46b	-13,66	-18,26	24,29a	1,46	-0,59	25,98b	2,29	0,2	13,16a	0,52	0,43	0,1195
41	6x5'	GP09-06 x GP09-11	80,00c	-24,5	-7,81	299,76a	31,83	22,66	23,39b	-3,83	-0,21	22,62b	-5,87	-0,69	12,85b	-1,14	0,15	0,1071
<b>Média cruz. (ij)</b>			<b>104,85</b>			<b>245,8</b>			<b>24,78</b>			<b>27,07</b>			<b>12,91</b>			
<b>Média Geral</b>			<b>104,55</b>			<b>240,27</b>			<b>24,16</b>			<b>27,35</b>			<b>13,01</b>			
<b>Dms (5%)</b>			<b>61,59</b>			<b>85,58</b>			<b>14,37</b>			<b>16,11</b>			<b>3,48</b>			
<b>CV (%)</b>			<b>17,79</b>			<b>10,75</b>			<b>17,96</b>			<b>17,79</b>			<b>8,09</b>			

As estimativas de capacidade específica de combinação (CEC) foram mais expressivas do que  $\hat{g}_i$ , porém as médias das variáveis não apresentam associação entre os cruzamentos, uma vez que, os cruzamentos 5x1' (GP09-05 x GP09-07) apresentou maior valor de  $\hat{S}_{ij}$  (43,3) e NF médio de 125,33, enquanto que o cruzamento 1x3' (GP09-01 x GP09-09) apresentou a maior média para NF 170,66 e  $\hat{S}_{ij}$  de 36,84.

Para peso de frutos o cruzamento 1x2' (GP09-01x GP09-08) apresentou  $\hat{S}_{ij}$  de 38,25 e média de 238,08, enquanto que 6x5' (GP09-05xGP09-11) apresentou maior média para esta variável 299,76 e  $\hat{S}_{ij}$  de 22,66.

No caso da produtividade, o cruzamento 5x1' (GP09-05xGP09-07) mostrou maior valor para  $\hat{S}_{ij}$  (11,02) com média 31,22, enquanto o cruzamento 3x5' (GP09-03xGP09-11) apresentou média de 33,14 e  $\hat{S}_{ij}$  de 5,97. Para rendimento de polpa 2 x 4' (GP09-02xGP09-10) apresentou maior valor de  $\hat{S}_{ij}$  (6,29) com destaque no valor da média de 34,16. Em relação aos SST o cruzamento 5x4' (GP09-05xGP09-10) apresentou maior  $\hat{S}_{ij}$  (1,56) e média de 13,7° brix, enquanto que 3x2' (GP09-04x GP09-08) obteve a maior média (15,16) com  $\hat{S}_{ij}$  de 1,39.

Segundo Toro (2006), nem sempre os híbridos com maior heterose apresentam as médias superiores. Isso é devido ao fato de que a superioridade de um híbrido simples depende tanto da quantidade dos loci em heterozigose quanto da média dos genitores. Alguns genitores ruins podem produzir híbridos com valores expressivos de heterose, porém, as suas médias ainda serão baixas em relação à média de todos os cruzamentos.

Na Tabela 6 estão descritas as médias das variáveis e as estimativas de capacidade geral de combinação ( $\hat{g}_i$ ) dos genitores para o caráter número de frutos. De maneira geral, a maioria dos parentais apresentou valores positivos e de magnitude variável com destaque para os genitores GP09-01 (grupo 1) e o GP09-09 (grupo 2) com valores de capacidade geral de combinação de 24,26 e 15,32, respectivamente. Evidenciando a presença de efeitos aditivos no controle genético para esta variável.



**Tabela 6:** Estimativas dos efeitos da capacidade geral de combinação ( $\hat{g}_i$ ) de 11 parentais de maracujá amarelo e a variável número de fruto (NF).

<b>Genitores</b>	<b>NF</b>	<b><math>\hat{g}_i</math></b>
Grupo I		
1 GP09-01	108,00 c	24,26
2 GP09-02	113,33 b	2,66
3 GP09-03	152,00 a	-23,6
4 GP09-04	89,00 c	9,3
5 GP09-05	80,00 c	5,83
6 GP09-06	106,33 c	-18,46
<b>DP (<math>g_i</math>)</b>		<b>6,57</b>
Grupo II		
1' GP09-07	94,00 c	-12,37
2' GP09-08	136,33 b	-9,37
3' GP09-09	77,33 c	15,32
4' GP09-10	82,00 c	6,21
5' GP09-11	102,66 c	0,21
<b>DP (<math>g_i</math>)</b>		<b>6,2</b>

As maiores estimativas dos efeitos da capacidade específica de combinação estão relacionadas com as interações dos efeitos não aditivos resultantes da complementação gênica entre os parentais, o que possibilita antever respostas de ganho genético com a exploração da heterose (Costa, 2006).

No presente trabalho não houve correlação significativa entre a diversidade genética, obtidos através de marcadores ISSR, com heterose, capacidade específica de combinação ( $\hat{S}_{ij}$ ) e médias das variáveis, conforme apresentado na Tabela 7. Moser et al. (1994), sugerem que o uso de marcadores morfo-agronômicos podem ser mais úteis para a predição do comportamento de híbridos do que marcadores neutros, a exemplo de alguns tipos de marcadores moleculares. Essa afirmação corrobora os resultados obtidos com o maracujazeiro amarelo, em que os marcadores moleculares ISSR não foram capazes de analisar variações de DNA associadas à heterose para características de importância agrônômica para a cultura.

**Tabela 7:** Estimativas de coeficientes de correlação entre número de frutos (NF), peso do fruto (PF), produtividade (PROD), rendimento (REND) e sólidos solúveis totais (SST), heterose em relação à média dos genitores (H) e capacidade específica de combinação ( $\hat{S}_{ij}$ ) com distância genética obtida por ISSR.

Dialelo									
	ISSR		ISSR		ISSR		ISSR		ISSR
<b>NF</b>	0,04 <sup>ns</sup>	<b>PF</b>	0,05 <sup>ns</sup>	<b>PROD</b>	0,11 <sup>ns</sup>	<b>REND</b>	-0,25 <sup>ns</sup>	<b>SST</b>	-0,24 <sup>ns</sup>
<b>H</b>	-0,01 <sup>ns</sup>	<b>H</b>	-0,07 <sup>ns</sup>	<b>H</b>	0,00 <sup>ns</sup>	<b>H</b>	-0,13 <sup>ns</sup>	<b>H</b>	0,11 <sup>ns</sup>
<b><math>\hat{S}_{ij}</math></b>	0,08 <sup>ns</sup>	<b><math>\hat{S}_{ij}</math></b>	0,04 <sup>ns</sup>	<b><math>\hat{S}_{ij}</math></b>	0,03 <sup>ns</sup>	<b><math>\hat{S}_{ij}</math></b>	-0,03 <sup>ns</sup>	<b><math>\hat{S}_{ij}</math></b>	-0,11 <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup>: não significante pela estatística de Mantel.

Estudos realizados com aveia por Lorencetti et al. (2006) e linhagens de milho por Paterniani et al. (2008) apresentaram resultados semelhantes à este trabalho, uma vez que, a distância genética obtida por marcadores dominantes e co-dominantes não se correlacionaram com os caracteres morfológicos analisados.

#### 4.4 Conclusões

- Há predominância de efeitos não aditivos para as variáveis analisadas no local de estudo, uma vez que, as estimativas da capacidade específica de combinação foram significantes para todos os caracteres agrônômicos avaliados;
- Apenas a variável número de frutos apresentou efeitos aditivos no controle genético;
- As distâncias genéticas obtidas por ISSR não foram correlacionadas com a heterose dos híbridos, o que não permite prever o comportamento dos híbridos.

## REFERÊNCIAS

- BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SANTOS, E. C.; BRAGA, M. F.; GUIMARÃES, C. T. Variabilidade genética de acessos comerciais e silvestres de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v.29, n.1, p. 124-127. 2007.
- BISON, O.; RAMALHO, M. A P.; REZENDE, G. D. S. P.; AGUIAR, A. M.; RESENDE, M. D. V. Dialelo parcial entre clones de *Eucalyptus camaldulensis* e clones de *E. urophylla*, *E. grandis* e *E. saligna*. **Revista Árvore**, v.33, p.395-402. 2009.
- COLOMBARI FILHO, J.M.;GERALDI, I.O.; BARONA,M.A.A.. Heterose e distâncias genéticas moleculares para a produção de grãos em soja. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, p.940-945, 2010.
- COSTA, A.M.; TUPINAMBÁ, D.D. **O maracujá e suas propriedades medicinais – estado da arte**. In: Faleiro, F.G.; Junqueira, N.T.V.; Braga, M.F. (Eds.) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina,DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 475-506.
- COSTA, M. N. **Análise dialélica das capacidades geral e específica de combinação utilizando técnicas uni e multivariadas de divergência genética em mamoneira (*Ricinus communis* L.)**. 2006. 132p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2006.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 480p.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes: Diversidade Genética**. Viçosa: Editora UFV, 2008. 278p.
- CUNHA, M.A.P. Melhoramento genético vegetal no Nordeste: grandes linhas e estratégias de atuação. In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 13., 1998. Feira de Santana, BA. **Anais...** Feira de Santana:SBG/UEFS, 1998. p.232-258.
- CUNHA, M.A.P.; BARBOSA, L.V.; JUNQUEIRA, N.T.V. Espécies de maracujazeiro. In: LIMA, A. (Ed.). **Maracujá Produção: Aspectos Técnicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 104p. (Frutas do Brasil; 15).
- CUNHA, M.A.P.;CARDOSO,C.E.L.Variabilidade genética e melhoramento do maracujá. In: Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro. Disponível em <<http://www.cpatia.embrapa.br:8080/catalogo/livrorg/maracuja.pdf>>. Acessado em novembro de 2010.
- DOYLE, J.J.; DOYLE,J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987.

FALCONER, D. S. **Introdução à genética quantitativa**. Trad. SILVA, M. A.; SILVA, J. C., Viçosa, MG: UFV, 1981. 279p.

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

FANG, D. Q.; ROOSE, M. L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p.408-417. 1997.

FANG, D. Q.; ROOSE, M. L.; KRUEGER, R. R.; FEDERICI, C .T. Fingerprinting pf trifoliolate orange germoplasm accessions with isozymes, RFLPs and inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p.211-219. 1997.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 1998. 220p.

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 fAFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v.26, p.494-498. 2004.

GODWIN, I. D.; AITKEN, E. A. B.; SMITH, L. W. Application of inter-simple sequence (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, v.18, p.1524-1528. 1997.

GUIMARÃES, P. S.; PATERNIANI, R. R. L.; SOUZA, A. P.; LABORDA, P. R.; OLIVEIRA, K. M. Correlação da heterose de híbridos de milho com divergência genética entre linhagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 6, p. 811-816. 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – Produção Agrícola Municipal, 2008. Acessado em novembro de 2010.

INGLEZ DE SOUSA, J. S; MELETTI, L. M. M. **Maracujá: espécies, variedades e cultivo**. Piracicaba: ESALQ, 1997. 179 p. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 3).

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

KEMPTHORNE, O. **An introduction to the genetic statistics**. New York: J. Willey, 1966. 545 p.

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, 1991. p. 201-209.

LOPES, S.C. Citogenética do maracujá, *Passiflora* spp. In: SÃO JOSÉ, A. R. **Maracujá, produção e mercado.** Vitória da Conquista, BA: UESB, 1994. p.19-23.

LORENCETTI, C.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; VALÉRIO, I. P.; BENIN, G.; ZIMMER, P. D.; VIEIRA, E. A. Distância genética e sua associação com heterose e desempenho de híbridos em aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.4, p.591-598. 2006.

MATTA, F.P. **Mapeamento de QRL para *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em maracujá-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.).** 2005. 230p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2005.

MATEI, G. **Implicações da capacidade de combinação e da distância genética na seleção de genitores de trigo (*Triticum aestivum* L.).** 2010. 77p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2010.

MELETTI, L.M.M.; SANTOS, R.R.; MINAMI, K.. Melhoramento do maracujazeiro-amarelo: obtenção do cultivar ‘composto IAC-27’. **Scientia Agricola**, v.57, n.3, p.491-498, 2000.

MELETTI, L.M.M. Maracujá-roxo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 194 – 348. 2005.

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. (Eds.) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 55-78.

MORAES, M. C. **Mapas de ligação e mapeamento de QTL (“Quantitative Trait Loci”) em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.).** 2005. 141p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2005.

MORENO, S.; MARTIN, J. P.; ORTIZ, J. M. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germoplasm. **Euphytica**, v.101, p.117-125. 1998.

MOSER, H.; LEE, M. RFLP variation and genealogical distance, multivariate distance, heterosis, and genetic variation in oats. **Theoretical and Applied Genetics**, v.87, p.947-956. 1994.

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

OLIVEIRA, K.M; LABORDA, P. R.; GARCIA, A. A. F.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; SOUZA, A. P. Evaluating genetic relationships between tropical maize inbred lines by means of AFLP profiling. **Hereditas**, v.140, p.24-33. 2004.

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

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.5, p.331-333. 2005.

OLIVEIRA, E.J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. 2006. 152f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2006.

PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; GUIMARÃES, P. S.; LUDERS, R. R.; GALLO, P. B.; SOUZA, A. P.; LABORDA, P. R.; OLIVEIRA, K. M. Capacidade combinatória, divergência genética entre linhagens de milho e correlação com heterose. **Bragantia**. Campinas, v.67, p.639-648. 2008.

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

PEREIRA, M. G.; PEREIRA, T. N. S.; COSTA, F. R. **Marcadores moleculares no pré-melhoramento**. In: Borém, A.; Caixeta, E. T. (Eds.) Marcadores moleculares. Viçosa, MG, 2009. p. 103-128.

REEDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v.128, p.9-17. 2002.

RINALDI, D. A.; PÍPOLO, V. C.; GERAGE, A. C.; RUAS, C. F.; FONSECA JÚNIOR, N. S.; SOUZA, A.; SOUZA, S. G. H.; GARBUGLIO, D. D. Correlação entre heterose e divergência genética estimadas por cruzamentos dialélicos e marcadores moleculares RAPD em populações de milho-pipoca. **Bragantia**, v.66, n.2, p.183-192. 2007.

RIZZI, L. C.; RABELO, L. R.; MORINI FILHO, W.; SAVAZAKI, E. T.; KAVATI, R. **Cultura do maracujá azedo**. Campinas, SP: CATI, 1998. 54p. (Boletim Técnico, 235).

SANTOS, L. F.; OLIVEIRA, E. J.; COSTA, J. L. Variabilidade genética de acessos de maracujazeiro com o uso de marcadores ISSR. In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 5, 2009, Guarapari – ES, **Anais...**Guarapari: SESC. 2009.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, v. 30, n. 2, p. 507-512. 1974.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596–1599. 2007.

TORO, E. A. T. **Avaliação de linhagens de arroz (*Oryza sativa* L.) suscetíveis e tolerantes a baixas temperaturas em cruzamentos dialélicos parciais**. 2006. 144f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2006.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. Massachusetts: MIT Press, 1996. 224p.

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

VIEIRA, M.L.C.; CARNEIRO, M.C. ***Passiflora* spp. Passionfruit**. In: LITZ, R. (Ed) *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*. Oxford: CABI Publishing, pp. 436-453. 2004.

VIEIRA, E. A.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; MARTINS, L. F.; BENIN, G.; SILVA, J. A. G.; KOPP, M. M.; HARTWIG, I.; CARVALHO, M. F.; VALÉRIO, I. P. Associação da distância genética em trigo estimada a partir de caracteres morfológicos, caracteres fenológicos e dos componentes do rendimento de grãos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, p.161-168. 2007.

WU, Z-L.; FANG, L-Y.; WANG, J.; SHEN, Y-J. Analysis of genetic diversity of *Vitis* by using ISSR markers. **Acta Hort**, v.827, p.125-130. 2009.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v.20, p.176-183. 1994.

## ANEXO I

### PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA EM TECIDO VEGETAL (MINI-PREP)

(Doyle & Doyle, 1987, com modificações)

#### SOLUÇÃO TAMPÃO DE EXTRAÇÃO

SOLUÇÕES/REAGENTES/CONC. FINAL	V. FINAL 10 mL	
CTAB a 10%	2,0 %	2,0 mL
NaCl a 5 M	1,4 M	2,8 mL
Tris HCl a 1M pH 8,0	0,1 M	1,0 mL
EDTA a 0,5 M	20 mM	400 µL
2-mercaptoetanol	0,4 %	40 µL
PVP (Polivinilpirrolidona)	1,0 %	0,1 g
H <sub>2</sub> O de milli-Q		3,76 mL

1. Coletar as amostras de folhas de plantas, de preferência jovens e saudáveis, evitando áreas atacadas por pragas e doenças. De modo geral deve-se lavar as folhas em água corrente, usando sempre que necessário detergente. Enxaguar com água destilada e secar com papel toalha.
2. Macerar 300 mg do tecido vegetal em almofariz na presença de nitrogênio líquido ou diretamente no tubo usando um micro-pistilo.
3. Transferir a amostra para tubo de eppendorf de 2 mL e adicionar 700 µL da solução tampão de extração a 65°C. Homogeneizar suavemente, pôr inversão, durante 5 minutos.
4. Incubar os tubos em banho-maria a 65°C por 45 minutos, e homogeneizar a cada 15 minutos.
5. Retirar do banho-maria.
6. Adicionar 700 µL de clorofórmio: álcool Isoamílico (24:1), e homogeneizar suavemente.



7. Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm.
8. Coletar o sobrenadante e transferir para novos tubos.
9. Adicionar 700  $\mu$ L de clorofórmio: álcool Isoamílico (24:1), e homogeneizar suavemente.
10. Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm.
11. Coletar o sobrenadante e transferir para novos tubos.
12. Adicionar 450  $\mu$ L de álcool Isopropílico (gelado). Tem que ser equivalente a aproximadamente 2/3 do volume coletado. Homogeneizar suavemente, incubar a (-20°C) por 20 minutos.
13. Centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm.
14. Ressuspender o DNA isolado em 600  $\mu$ L de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e adicionar 200  $\mu$ L de acetato de amônio a 7,5 M.
15. Fechar o tubo e misturar suavemente por inversão para homogeneizar a solução. Incubar no gelo por 15 minutos.
16. Centrifugar por 15 minutos a 12.000 rpm. Transferir o sobrenadante para um novo tubo.
17. Adicionar 800  $\mu$ L de ETANOL ABSOLUTO ao sobrenadante e misture suavemente por inversão. Incube por 1 hora a -20°C.
18. Centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm.
19. Lavar o precipitado com etanol 70% gelado (v/v) (500  $\mu$ L) e centrifugar novamente nas mesmas condições anteriores por 3 minutos.
20. Secar o precipitado e dissolver em 100  $\mu$ L de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) + 1  $\mu$ L de RNase (10 mg/ml).
21. Colocar na estufa à 37°C durante 1 hora.
22. Guardar o DNA no -20°C (armazenamento).