

VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE MARACUJÁ-SUSPIRO COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES

**Keize Pereira Junqueira^I; Fábio Gelape Faleiro^{II}; José Darlan Ramos^{III};
Graciele Bellon^{IV}; Nilton Tadeu Vilela Junqueira^{II}; Marcelo Fideles
Braga^{II}**

RESUMO

Passiflora nítida é uma espécie silvestre amplamente distribuída pelo território brasileiro, constituindo-se em fonte de resistência a doenças foliares e de raízes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética entre acessos de *P. nítida* procedentes de diferentes tipos fitofisionômicos de Cerrado e estados brasileiros (Goiás, Distrito Federal, Tocantins, Mato Grosso e Amazonas), usando marcadores moleculares RAPD. O DNA genômico de cada acesso foi extraído, e doze iniciadores decâmeros foram utilizados para a obtenção de marcadores moleculares RAPD, que foram convertidos em matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre os acessos e realizadas análises de agrupamento e de dispersão gráfica. Foram obtidos 196 marcadores para *P. nítida*, dos quais 63,81% foram polimórficos. As distâncias genéticas entre os acessos de maracujá variaram de 0,031 a 0,614 e, considerando apenas *P. nítida*, de 0,031 a 0,417. Os marcadores moleculares demonstraram alta variabilidade genética dos acessos de *P. nítida*. Menores distâncias genéticas foram verificadas entre os acessos originados do mesmo estado. Considerando-se os acessos de um mesmo estado, menores distâncias genéticas foram verificadas entre os acessos provenientes de tipos fitofisionômicos próximos. O acesso "Manaus 2" apresentou o maior distanciamento genético em relação aos demais acessos.

Termos para indexação: RAPD, *Passiflora nítida* Kunth, origem geográfica, tipos fitofisionômicos, variabilidade intraespecífica.

INTRODUÇÃO

Passiflora nítida Kunth. é uma espécie de maracujá amplamente distribuída no território nacional. Acessos silvestres dessa espécie já foram coletados nos Estados do Amazonas, Pará, Piauí, Mato Grosso, Tocantins, Goiás, Bahia, Minas Gerais e Distrito Federal. No Cerrado, essa espécie pode ser facilmente encontrada em Matas Ciliares, Veredas, Cerradão, Cerrado *stricto sensu* e até em Matas Secas.

A espécie é relatada como rústica, tolerante à bacteriose, antracnose e a doenças causadas por patógenos do solo (Menezes et al., 1994; Oliveira et al., 1994). Dessa forma, apresenta grande potencial para ser utilizada no

melhoramento genético e como porta-enxerto para a espécie comercial de *P. edulis* f. *flavicarpa*, conforme relatado por Chaves et al. (2004). Outro potencial da espécie é a sua utilização per si, como relatado por Oliveira & Ruggiero (2005).

Por ter muita similaridade botânica com o maracujazeiro-doce (*P. alata* Curtis), acredita-se que seu potencial seja ainda maior como fonte de resistência a várias doenças dessa espécie, cujo cultivo, no Brasil, vem sendo limitado pela incidência severa da bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*), da podridão-do-pé (*Fusarium solani*), da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) e da virose do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*- CABMV e *Passion fruit woodiness virus* - PWV).

Entre os acessos de *P. nítida* mantidos na coleção da Embrapa Cerrados, oriundos de várias regiões do País, pode-se observar uma grande variabilidade fenotípica entre formatos e tamanho de frutos, espessura de casca, aroma, cor da casca e da polpa, sabor, bem como na produtividade e resistência a doenças foliares. Para complementar tais observações, objetivou-se realizar o estudo da variabilidade genética de 17 acessos de *P. nítida* mantidos no banco de germoplasma da Embrapa Cerrados por meio de marcadores moleculares RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA").

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados. Foram analisados 17 acessos de *Passiflora nítida*. Um acesso de *P. edulis* f. *flavicarpa* e um de *P. alata* foram utilizados como "outgroups" (Tabela 1 – Ver tabela em arquivos relacionados mais abaixo). Folhas em estágio intermediário de maturação foram coletadas, e o DNA genômico extraído, utilizando o método do CTAB com algumas modificações (Faleiro et al., 2003).

Amostras de DNA de cada material genético foram amplificadas para obtenção de marcadores RAPD. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 µL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3); KCl 50 mM; MgCl₂ 3 mM; 100 µM de cada um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP); 0,4 µM de um iniciador (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Foram utilizados 12 iniciadores decâmeros: OPD (04; 07; 08 e 16); OPE (18 e 20); OPF (01 e 14); OPG (08), e OPH (12; 16 e 17).

As amplificações foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência: 15 segundos a 94 °C; 30 segundos a 35 °C, e 90 segundos a 72 °C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de seis minutos a 72 °C e, finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C. Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 µl de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado

com brometo de etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 90 Volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em 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 & Li (1979), utilizando-se do Programa Genes (Cruz, 1997). A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando-se do método do UPGMA (*Unweighted pair-group arithmetic average*) como critério de agrupamento, e a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais, usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS e Statistica (Statsoft Inc., 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 12 iniciadores decâmeros geraram um total de 196 marcadores RAPD, perfazendo uma média de 16,3 marcadores por iniciador. A Figura 1 (Ver figura em arquivos relacionados mais abaixo) ilustra o produto da amplificação de amostras de DNA, gerado pelo iniciador OPD-04 e evidencia vários marcadores polimórficos presentes no acesso *Passiflora nitida* "Manaus 2" e nos "outgroups". Do total de marcadores, considerando-se apenas os acessos de *P. nitida*, 125 (72,25%) foram polimórficos (Tabela 2 – Ver tabela em arquivos relacionados mais abaixo). A alta média de marcadores por iniciador e a alta porcentagem de marcadores polimórficos dentro da espécie *P. nitida* evidenciam a presença de alta variabilidade genética intra-específica. Uma alta variabilidade genética interespecífica foi verificada ao analisar as bandas polimórficas dos acessos de *P. edulis f. flavicarpa* e *P. alata* ("outgroups") em relação aos acessos de *P. nitida*. Faleiro et al. (2004), Pio Viana et al. (2003) e Crochemore et al. (2003) já haviam relatado a alta variabilidade genética interespecífica no gênero *Passiflora*.

As distâncias genéticas entre os 19 acessos de maracujá variaram entre 0,031 e 0,614 (Tabela 3 – Ver tabela em arquivos relacionados mais abaixo), sendo que os maiores valores observados se referem a distância entre as espécies comerciais (*P. edulis f. flavicarpa* e *P. alata*) e os acessos de *P. nitida*. Considerando apenas os acessos de *P. nitida*, as distâncias genéticas variaram entre 0,031 a 0,417, com uma média de 0,209. O acesso que mais diferenciou dos demais foi o "Manaus-2" com uma distância média de 0,388.

A partir da análise de agrupamento realizada com base nas distâncias genéticas, subdividiram os 19 acessos em, pelo menos, sete grupos de similaridade genética, sendo cinco grupos dentro da espécie *Passiflora nitida* (Figura 2 – Ver figura em arquivos relacionados mais abaixo). Observou-se que os agrupamentos dos acessos de *P. nitida* se relacionaram com a origem geográfica dos mesmos. As distâncias entre os acessos e a distribuição dos

mesmos nos grupos de similaridade podem ser também observadas no gráfico de dispersão (Figura 3 – Ver figura em arquivos relacionados mais abaixo).

O maior grupo foi formado por 8 acessos, todos procedentes do Distrito Federal e Goiás. Dentro deste grupo, pode-se verificar maior similaridade entre os acessos *P. nítida* "São José" de Vereda e *P. nítida* "Jardim Botânico" de Cerradão (0,031), e entre *P. nítida* "Vale do Amanhecer" de Vereda e *P. nitida* "Silvânia" de Mata Ciliar (0,033). Dentro deste grupo, o material que mais se distanciou geneticamente foi *P. nítida* "Corumbá" de Mata Seca, que corresponde a um material originário de uma fitofisionomia mais seca. Por outro lado, os acessos procedentes de alguns tipos fitofisionômicos mais úmidos, como Mata Ciliar e Vereda, aproximaram-se mais sob o ponto de vista genético.

Também foram formados grupos envolvendo acessos de *P. nítida* procedentes de Tocantins, Mato Grosso e Amazonas, com exceção de "Manaus 2", que se distanciou muito dos acessos procedentes do Amazonas e dos demais. Tal acesso revelou distância genética de até 0,416 em relação a outro acesso da mesma espécie, *P. nítida* "Itiquira 1". Considerando-se toda a base genética do gênero *Passiflora* já estudada (Faleiro et al., 2005; Bellon et al., 2005; Paula et al., 2005), este valor é bastante elevado. Portanto, há possibilidade de tal material ser um híbrido interespecífico de *P. nítida* com outra espécie geneticamente compatível ou constituir-se em outra espécie de *Passiflora*. Assim, trabalhos mais apurados envolvendo este acesso devem ser realizados tanto envolvendo os aspectos morfoagrômicos quanto os genéticos.

CONCLUSÃO

Existe elevada variabilidade genética entre acessos de *Passiflora nítida* procedentes de diferentes estados. Dentro do mesmo estado, a variabilidade é menor, ocorrendo principalmente entre acessos procedentes de diferentes tipos fitofisionômicos. Tal variabilidade subsidia e mostra a importância de estudar os diversos acessos dessa espécie para fins de melhoramento, enxertia e utilização per se. A grande variabilidade genética intra-específica de *P. nítida* também permite concluir que não se devem fazer generalizações sobre a espécie, considerando as expressivas diferenças genéticas entre acessos, principalmente de diferentes procedências. O acesso Manaus 2 deve ser mais estudado, tendo em vista o grande distanciamento genético em relação aos demais acessos de *P. nitida*.

REFERÊNCIAS

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 nos marcadores RAPD. In:

REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISAS EM MARACUJAZEIRO, 4., 2005. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p.18-121.

CHAVES, R.C.; JUNQUEIRA, N.T.V.; MANICA, I. PEIXOTO, J.R.; PEREIRA, A.V.; FIALHO, J.F. Enxertia de maracujazeiro-azedo em estacas herbáceas enraizadas de espécies de passifloras nativas. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 120-123, 2004.

CROCHEMORE, M. L.; MOLINARI, H. B. C.; VIEIRA, L. G. E. Genetic diversity in passion fruit (*Passiflora* spp.) evaluated by RAPD markers. Brazilian Archives of biology and Technology, Curitiba, v. 46, n. 4, p. 521-527, 2003.

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

FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.S.G.; CORDEIRO, M.C.R., KARIA, C.T. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 6p. (Comunicado Técnico, 92)

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

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; BELLON, G.; PEIXOTO, J.R. Diversidade genética de variedades comerciais de maracujazeiro-azedo com base em marcadores RAPD. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISAS EM MARACUJAZEIRO, 4., 2005. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p.05-109.

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, São Paulo, v.22, n.1, p.95-104, 1994.

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

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

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

PAULA, M.S.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, K.P.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. Diversidade genética de espécies de *Passiflora*, potenciais fontes de resistência a doenças, com base em marcadores RAPD. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISAS EM MARACUJAZEIRO, 4., 2005, Planaltina: DF: Embrapa Cerrados, 2005. p.100-104.

PIO VIANA, A.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, M. M.; MALDONADO, F.; AMARAL JÚNIOR, A. T. Diversidade entre genótipos de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de

passifloras determinada por marcadores RAPD. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.25, n.3, p.489-493, 2003.
STATSOFT INC. Statistica for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, 1999.

Trabalho publicado na Revista Brasileira de Fruticultura, Vol. 29, Nº 03

I - Eng. Agr. Mestranda em Fitotecnia/Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, 37200-000 Lavras-MG. E-mail: keize@ufla.br

II - Pesquisador da Embrapa Cerrados, BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223, 73010-970 Planaltina-DF. E-mail:

ffaleiro@cpac.embrapa.br / junqueir@cpac.embrapa.br /

fideles@cpac.embrapa.br

III - Professor da Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, 37200-000 Lavras-MG. E-mail: darlan@ufla.br

IV - Eng. Agr. Mestranda em Ciências Agrárias/Universidade de Brasília, Câmpus Universitário Darcy Ribeiro, 70910-900 Brasília-DF. E-mail:

bellon@cpac.embrapa.br

Data Edição: 28/03/08

Fonte: Revista Brasileira de Fruticultura

Endereço:<http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=17067>