

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DE *PASSIFLORA*, POTENCIAIS FONTES DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS, COM BASE EM MARCADORES RAPD



Mariana da Silva Paula^{1*}, Fábio Gelape Faleiro², Keize Pereira Junqueira³, Graciele Bellon², Nilton Tadeu Vilela Junqueira², Marcelo Fideles Braga², José Ricardo Peixoto¹



¹Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, 70910-900 Brasília, DF, ²Embrapa Cerrados, CP 08223, 73310-970 Planaltina-DF; ³Universidade Federal de Lavras
*Bolsista do CNPq, e-mail: marispaula@unb.br

Introdução

O gênero *Passiflora* apresenta mais de 500 espécies, é originário da América do Sul e tem no Centro-Norte do Brasil o seu maior centro de distribuição geográfica. A cultura do maracujazeiro azedo (*P. edulis*) no Brasil se expandiu em ritmo acelerado desde o início da década de 1970. Até então, o Brasil não figurava entre os maiores produtores do mundo, mas a partir dessa data, houve um grande aumento de produção, devido, principalmente, a crescente exportação de suco concentrado (São José, 1994).

Considerando a grande variabilidade do maracujazeiro, programas de melhoramento genético do maracujazeiro têm sido conduzidos visando à obtenção de variedades mais produtivas e resistentes a doenças, por meio da hibridação sexual entre as espécies cultivadas e espécies selvagens. Por ser uma espécie semipereene, o estudo de diversidade genética em *Passiflora* spp. demanda tempo. Então, o uso de marcadores moleculares é altamente promissor, já que permite um rápido estudo de variabilidade presente (Stephen et al., 1997).

Objetivo

Estudar a diversidade genética de espécies de *Passiflora*, potenciais fontes de resistência a doenças, utilizando-se marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).



Figura 1. RC3 (*P. edulis* X *P. setacea*) (A); *P. alata* (C); F1 (*P. coccinea* X *P. setacea*); *P. caerulea* (D).

Resultados

A partir dos 8 *primers* utilizados, foram gerados 194 marcadores RAPD, obtendo-se uma média de 24,2 marcadores por *primer*. A Figura 2 ilustra os produtos de amplificação gerados pelo *primer* OPD-08. Todos os marcadores se mostraram polimórficos, o que, associado à alta porcentagem de marcadores por *primer*, indicou elevada diversidade genética entre espécies do gênero *Passiflora*. Resultados semelhantes foram obtidos por Aukar et al. (2002), os quais também verificaram a presença de apenas marcadores RAPD polimórficos.

A distância genética entre os materiais avaliados variou entre 0,043 e 0,798, sendo a menor verificada entre as variedades RC-3 e MAR-12 e a maior entre *P. amethystina* e *P. edulis* (Tabela 2). Aukar et al. (2002) verificaram uma baixa média de similaridade entre a espécie *P. amethystina* e outras espécies, o que revelou a diferença genética desta espécie em relação às demais.

A análise de agrupamento com base nas distâncias genéticas mostrou a formação de um grupo contendo as variedades comerciais de maracujazeiro azedo (*P. Edulis*) (Figura 3). Ao nível de 0,30 de distância genética, não houve nenhum agrupamento entre demais espécies analisadas no presente trabalho. Estes resultados são corroborados pela análise do gráfico de dispersão (Figura 4).

Conclusões

A ampla diversidade genética verificada entre as diferentes espécies do gênero *Passiflora*, potenciais fontes de resistência a doenças, evidencia o promissor uso em programas de melhoramento genético a partir de hibridações interespecíficas e também como porta-enxerto para variedades comerciais.

Material e métodos

Foram avaliadas 4 variedades comerciais (Yellow Master FB 200, Gigante Amarelo, RC-3 e MAR-12) de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis*), uma de maracujazeiro doce (*P. alata*), um híbrido (*P. coccinea* X *P. setacea*) e 9 espécies silvestres (*P. setacea*, *P. coccinea*, *P. nitida*, *P. serratodigitata*, *P. gibertii*, *P. caerulea*, *P. amethystina*, *P. odontophylla* e *P. edulis* nativo) (Tabela 1). A Figura 1 ilustra alguns desses acessos. Folhas de cada material genético foram coletadas e extraiu-se o DNA genômico a partir do método CTAB, com modificações (Faleiro et al., 2003). Foram amplificadas amostras de DNA de cada material genético 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 desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 µM de um "primer" (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade de enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 15ng de DNA. Para a obtenção de marcadores RAPD foram utilizados 8 *primers* decâmeros: OPD (04, 07, 08, 10 e 16), OPDG-17 e OPDH (12 e 16). As amplificações foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência: 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 35°C e 90 segundos a 72°C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de seis minutos a 72°C, e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4°C. Após a amplificação, essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1mM). A separação eletroforética foi de aproximadamente, quatro horas, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre os diferentes acessos, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, utilizando-se o Programa Genes. A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar a análise de agrupamento com o auxílio do Programa Statistica, utilizando como critério de agrupamento o método UPGMA. Um gráfico de dispersão dos acessos foi estabelecido com base na matriz de distâncias genéticas pelo método das coordenadas principais.

Tabela 1. Acessos de *Passiflora* spp. analisados.

Nº	Espécie	Acesso	Código	Nº	Espécie	Acesso	Código
1	<i>P. edulis</i>	Yellow Master	-	9	<i>P. setacea</i> (Ps)	"Núcleo"	CPAC MJ-12-01
2	<i>P. edulis</i>	RC3	-	10	<i>P. nitida</i>	"Corumbá"	CPAC MJ-01-18
3	<i>P. edulis</i>	MAR-12	-	11	<i>P. amethystina</i>	"Mogi das Cruzes"	CPAC MJ-13-01
4	<i>P. edulis</i>	Gigante Amarelo	CPAC MJ-M-01	12	<i>P. caerulea</i>	"São Paulo"	CPAC MJ-14-01
5	<i>P. alata</i>	Comercial	-	13	<i>P. odontophylla</i>	"Carmópolis"	CPAC MJ-09-01
6	<i>P. serratodigitata</i>	"Belém"	CPAC MJ-11-01	14	<i>P. gibertii</i>	"Triângulo Mineiro"	CPAC MJ-22-01
7	<i>P. coccinea</i> (Pc)	"Bara do Garça"	CPAC MJ-08-02	15	<i>P. edulis</i> nativo	"Itumirim"	CPAC MJ-21-01
8	Híbrido (Pc x Ps)	Híbrido	CPAC MJ-H-01				

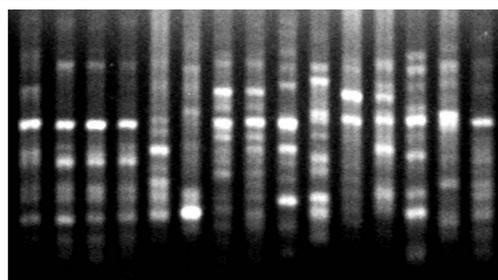


Figura 2. Produtos de amplificação de DNA genômico de 15 acessos de maracujazeiro gerados com a utilização do *primer* OPD-08..

Tabela 2. Matriz de distâncias genéticas entre 15 variedades de maracujazeiro, calculadas com base em 194 marcadores moleculares.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	-														
2	0,088	-													
3	0,101	0,043	-												
4	0,200	0,126	0,140	-											
5	0,634	0,609	0,626	0,627	-										
6	0,605	0,577	0,622	0,604	0,632	-									
7	0,522	0,576	0,597	0,593	0,614	0,681	-								
8	0,489	0,510	0,570	0,614	0,628	0,692	0,923	-							
9	0,528	0,546	0,580	0,589	0,579	0,670	0,545	0,306	-						
10	0,671	0,650	0,673	0,714	0,553	0,707	0,673	0,695	0,695	-					
11	0,610	0,604	0,630	0,683	0,631	0,738	0,649	0,617	0,632	0,638	-				
12	0,556	0,500	0,562	0,592	0,644	0,687	0,607	0,586	0,590	0,656	0,460	-			
13	0,687	0,696	0,679	0,698	0,645	0,724	0,675	0,661	0,692	0,697	0,676	0,695	-		
14	0,659	0,707	0,686	0,732	0,673	0,763	0,725	0,761	0,780	0,685	0,649	0,663	0,767	-	
15	0,425	0,450	0,432	0,489	0,609	0,699	0,640	0,640	0,636	0,704	0,798	0,727	0,684	0,765	-

Os números dos acessos correspondem àqueles da Tabela 1.

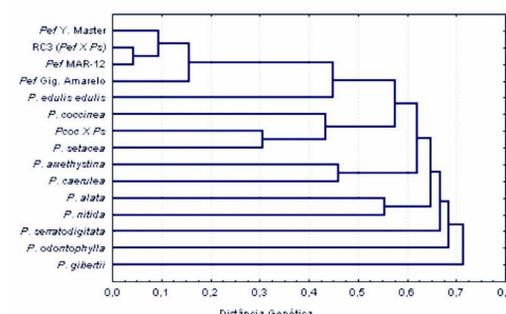


Figura 3. Análise de agrupamento de 15 acessos de maracujazeiro azedo com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 194 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

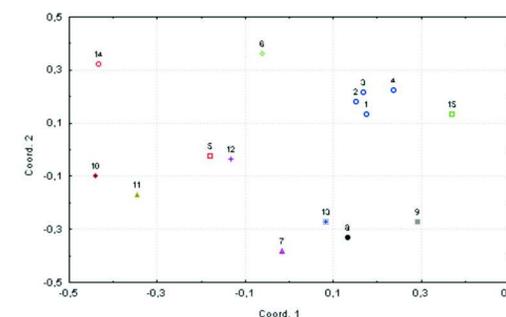


Figura 4. Dispersão gráfica de 15 acessos de maracujazeiro azedo com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 194 marcadores RAPD. Os números correspondem aos acessos da Tabela 1.

Literatura citada

- AUKAR, A.P.A.; LEMOS, E.G.M.; OLIVEIRA, J.C. Genetic variations among passion fruit species using RAPD markers. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 24, p. 738-740, 2002.
- BARBOSA, L.V. Citologia de híbridos somáticos de *Passiflora* spp obtidos por fusão de protoplastos. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998. 97p. (Tese Doutorado).
- FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.S.G.; CORDEIRO, M.C.R.; KARIA, C.T. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. (Comunicado Técnico N° 92) 6p.
- FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BELLON, G.; BORGES, T.A.; ANJOS, J.R.N.; PEIXOTO, J.R.; BRAGA, M.F.; SANTOS, D.G. Diversidade de espécies silvestres de maracujazeiro com resistência múltipla a doenças com base em marcadores RAPD. Fitopatologia Brasileira, v.29, (Supl.), p.325, 2004.
- LOPES, S.C. Citogenética do maracujá, *Passiflora* spp. In: São José, A.R. A cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p. 201-209.
- SÃO JOSÉ, A.R. A cultura do maracujazeiro: produção e mercado. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1994. 255p.
- STEPHEN, K.; MCFERSON, J.R.; WESTMAN, A.L. Using molecular markers in genebanks: identify, duplication, contamination and regeneration, Analysis, Characterization and Conservation of PGR. 1997, 16p.