

# DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS COMERCIAIS E SILVESTRES DE MARACUJAZEIRO-DOCE COM BASE EM MARCADORES RAPD



Cerrados

Graciele Bellon<sup>1\*</sup>, Fábio Gelape Faleiro<sup>1</sup>, Keize Pereira Junqueira<sup>2</sup>, Mariana da Silva Paula<sup>3</sup>, Marcelo Fideles Braga<sup>1</sup>, Nilton Tadeu Vilela Junqueira<sup>1</sup>, José Ricardo Peixoto<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Cerrados, CP 08223, 73310-970 Planaltina-DF; <sup>2</sup>Universidade Federal de Lavras;

<sup>3</sup>Universidade de Brasília; e-mail: bellon@cpac.embrapa.br

## INTRODUÇÃO

O maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis), conhecido popularmente por maracujá de refresco, maracujá de comer, maracujá-alado ou maracujá-guaçu, apresenta importância econômica como fruto para consumo *in natura*. Pode ser comercializado em embalagem especial ou vendido em unidades nos locais de maior poder aquisitivo do Brasil, mas representa uma pequena parcela, quando comparado ao maracujazeiro-azedo (Junqueira et al., 2005).

Apesar da grande importância e do potencial econômico do maracujá-doce, ainda não há nenhum cultivar comercial lançado com caracteres definidos e garantia de origem. Os plantios comerciais têm-se limitado simplesmente ao emprego de sementes botânicas.

Segundo Cunha (1998), estudos acurados e detalhados da variabilidade genética do maracujazeiro poderão indicar recursos genéticos valiosos, sejam novas espécies nos sistemas de produção ou genes de espécies silvestres ou selvagens úteis ao melhoramento das atuais espécies cultivadas.

## OBJETIVO

Estudar a variabilidade de 17 acessos de *P. alata* mantidos no banco de germoplasma da Embrapa Cerrados utilizando-se marcadores moleculares RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA")

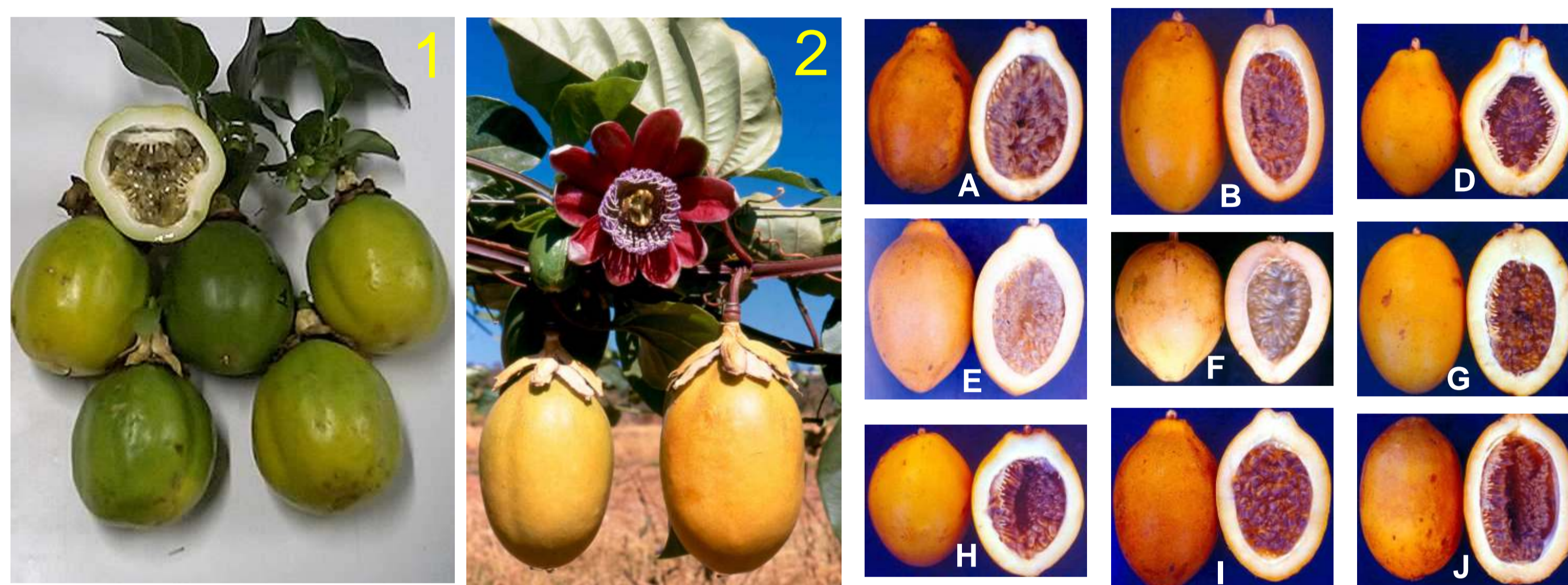


Figura 1. Maracujazeiro-doce silvestre (1), comercial (2) e diferentes formatos de frutos (Tipo A, D, E, F, G, I, J).

## RESULTADOS

Os 11 *primers* decâmeros geraram um total de 140 marcadores RAPD, perfazendo uma média de 12,7 marcadores por *primer*. Do total de marcadores, considerando-se apenas os acessos de *P. alata*, observou-se 87 (62,12%) bandas polimórficas, evidenciando a grande variabilidade intraespecífica (Tabela 2). A Figura 2 ilustra os produtos de amplificação gerados com a utilização do *primer* OPF-14.

A análise de agrupamento realizada com base nas distâncias genéticas, permitiu subdividir os 19 acessos em, pelo menos, sete grupos de similaridade genética, considerando o ponto de corte a uma distância genética de 0,15 (Figura 3).

O maior grupo foi formado por 9 acessos, todos comerciais. A similaridade desse grupo é explicada pela mesma origem genética dos acessos. Entretanto, observa-se uma variabilidade genética dentro do grupo, a qual pode ser explicada pela seleção prévia dos acessos com base no formato dos frutos (Tipos A, D, E, F, G, I e J). As distâncias genéticas dentro do grupo variaram entre 0,086 e 0,171 (Dados não apresentados). As menores distâncias foram verificadas entre os acessos "Filha Tipo A" e "Filha Tipo D" e entre "Filha Tipo I" e "Filha Tipo J", sendo de 0,086 e 0,101, respectivamente.

Os demais grupos formados foram constituídos especialmente por acessos silvestres, com notável variabilidade genética entre os aqueles procedentes de regiões geográficas distintas. Os acessos "Mato Grosso do Sul" e "Brinco" foram os mais divergentes dos *P. alata*. O acesso que mais se distanciou geneticamente dos demais foi o *P. edulis* GA-2, utilizado como "out group". A espécie *P. quadrangularis*, também utilizada como "out group", apresentou-se mais próxima geneticamente dos acessos de *P. alata* quando comparada ao *P. edulis* GA-2. A Figura 4 ilustra os resultados discutidos acima.

## CONCLUSÕES

Observou-se a existência de elevada variabilidade genética entre acessos de *P. alata*, sendo que os acessos silvestres foram os que mais contribuíram para a ampliação da base genética dos materiais estudados. Nesse sentido, há uma boa perspectiva para o aproveitamento de tal variabilidade genética em programas de melhoramento genético. A similaridade genética verificada entre a espécie *P. quadrangularis* e a *P. alata* é um indicativo da existência de compatibilidade genética, o que permitiria a utilização de cruzamentos interespecíficos para ampliar ainda mais a base genética do maracujá-doce.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 17 acessos de maracujá-doce (9 comerciais e 8 silvestres) com diferentes formatos de frutos (Figura 1). Um acesso de *P. quadrangularis* e um de *P. edulis* foram utilizados como "out group" (Tabela 1). Folhas de cada acesso foram coletadas e o DNA genômico extraído utilizando o método do CTAB, com 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  $\mu$ L, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 100  $\mu$ M de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4  $\mu$ M de um "primer" (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Para obtenção dos marcadores RAPD foram utilizados 16 *primers* decâmeros: OPD (04, 07, 08 e 16), OPE (18 e 20), OPF (01, 14), OPG (08), OPH (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, foram adicionados, a cada amostra, 3  $\mu$ L de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre os diferentes acessos, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei & Li, utilizando-se o Programa Genes (Cruz, 1997). A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar a análise de agrupamento, por meio de dendrograma com o auxílio do Programa Statistica (Statsoft Inc., 1999), utilizando o método do UPGMA como critério de agrupamento. Um gráfico de dispersão em 3D dos acessos foi estabelecido com base no método das coordenadas principais.

Tabela 1. Acessos de maracujazeiro analisados.

Nº	Espécie	Acesso	Estado	Código	Nº	Espécie	Acesso	Estado	Código
1	<i>Passiflora alata</i> Curtis	"Avó - Tipo I"	DF	CPAC MJ-02-01	11	<i>Passiflora alata</i> Curtis	"4 nectários"	DF	CPAC MJ-02-12
2	<i>Passiflora alata</i> Curtis	"Avó - Tipo J"	DF	CPAC MJ-02-02	12	<i>Passiflora alata</i> Curtis	"Alto Paraíso"	GO	CPAC MJ-02-13
3	<i>Passiflora alata</i> Curtis	"Filha - Tipo A"	DF	CPAC MJ-02-03	13	<i>Passiflora alata</i> Curtis	"Santa Catarina"	SC	CPAC MJ-02-14
4	<i>Passiflora alata</i> Curtis	"Filha - Tipo D"	DF	CPAC MJ-02-04	14	<i>Passiflora alata</i> Curtis	"Mato Grosso do Sul"	MS	CPAC MJ-02-18
5	<i>Passiflora alata</i> Curtis	"Filha - Tipo E"	DF	CPAC MJ-02-05	15	<i>Passiflora alata</i> Curtis	"Silvestre 1"	DF	CPAC MJ-02-16
6	<i>Passiflora alata</i> Curtis	"Filha - Tipo F"	DF	CPAC MJ-02-06	16	<i>Passiflora alata</i> Curtis	"Silvestre 2"	DF	CPAC MJ-02-17
7	<i>Passiflora alata</i> Curtis	"Filha - Tipo G"	DF	CPAC MJ-02-07	17	<i>Passiflora alata</i> Curtis	"Cerradão"	DF	CPAC MJ-02-15
8	<i>Passiflora alata</i> Curtis	"Filha - Tipo I"	DF	CPAC MJ-02-08	18	<i>Passiflora quadrangularis</i>	"Comunidade Krahô"	TO	CPAC MJ-07-01
9	<i>Passiflora alata</i> Curtis	"Filha - Tipo J"	DF	CPAC MJ-02-09	19	<i>Passiflora edulis</i>	"GA-2"	DF	CPAC MJ-2-02
10	<i>Passiflora alata</i> Curtis	"Brinco"	BA	CPAC MJ-02-10					

Tabela 2. *Primers* utilizados para obtenção dos marcadores RAPD para acessos de *Passiflora alata* e respectivos número de bandas polimórficas e monomórficas.

Primer	Seqüência 5' 3'	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas monomórficas
OPD-04	TCTGGTGAGG	8	11
OPD-07	TTGGCACGGG	12	2
OPD-08	GTGTGCCCA	2	5
OPD-16	AGGGCGTAAG	7	5
OPE-18	GGACTGCAGA	4	6
OPE-20	AACGGTGACC	4	5
OPF-01	ACGGATCCTG	6	5
OPF-14	TGCTGCAGGT	11	6
OPG-08	TCACGTCCAC	9	1
OPH-12	ACGGCATGT	12	5
OPH-16	TCTCAGCTGG	12	2
TOTAL		87	53

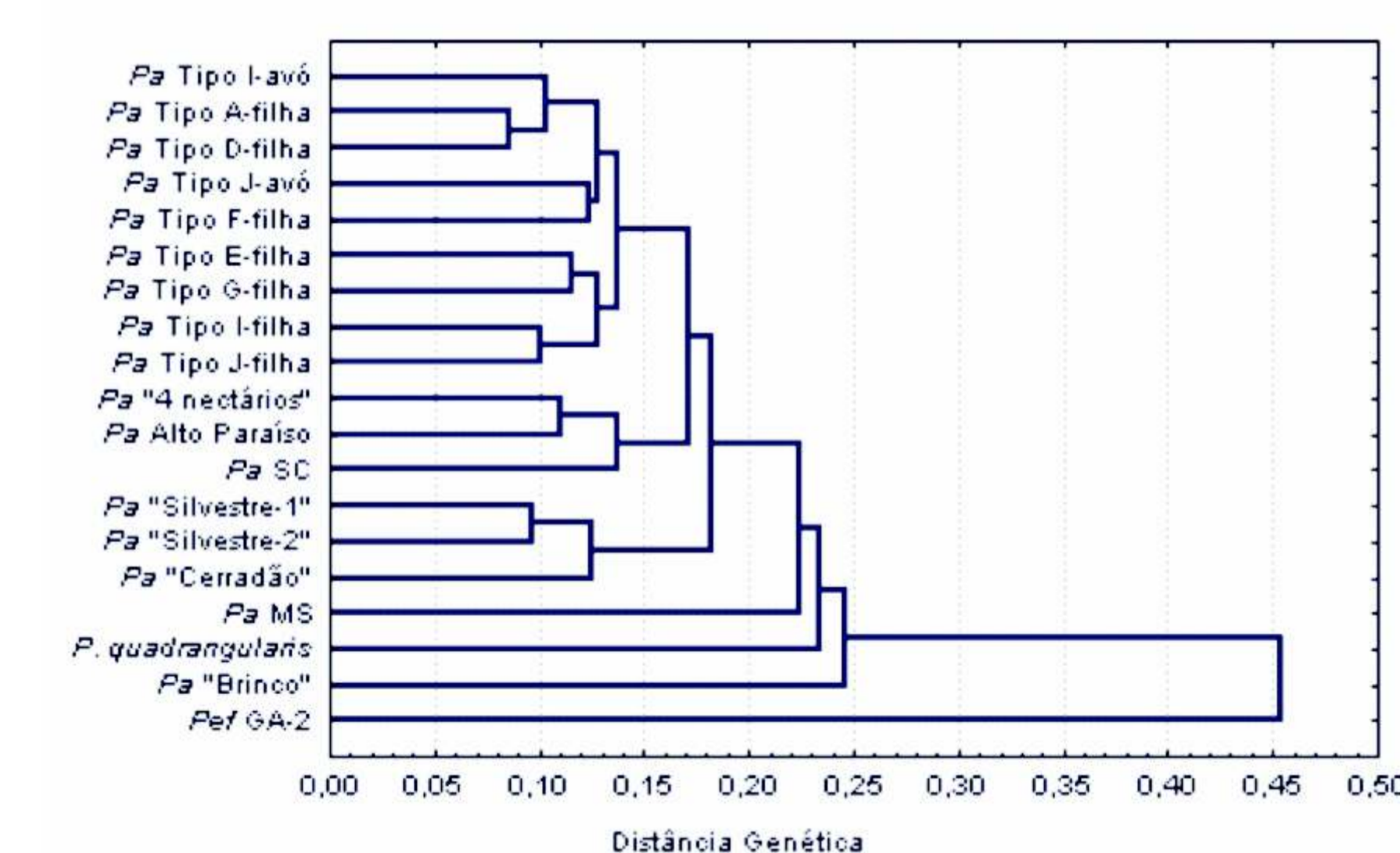


Figura 3. Análise de agrupamento de 19 acessos de maracujazeiro com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 140 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

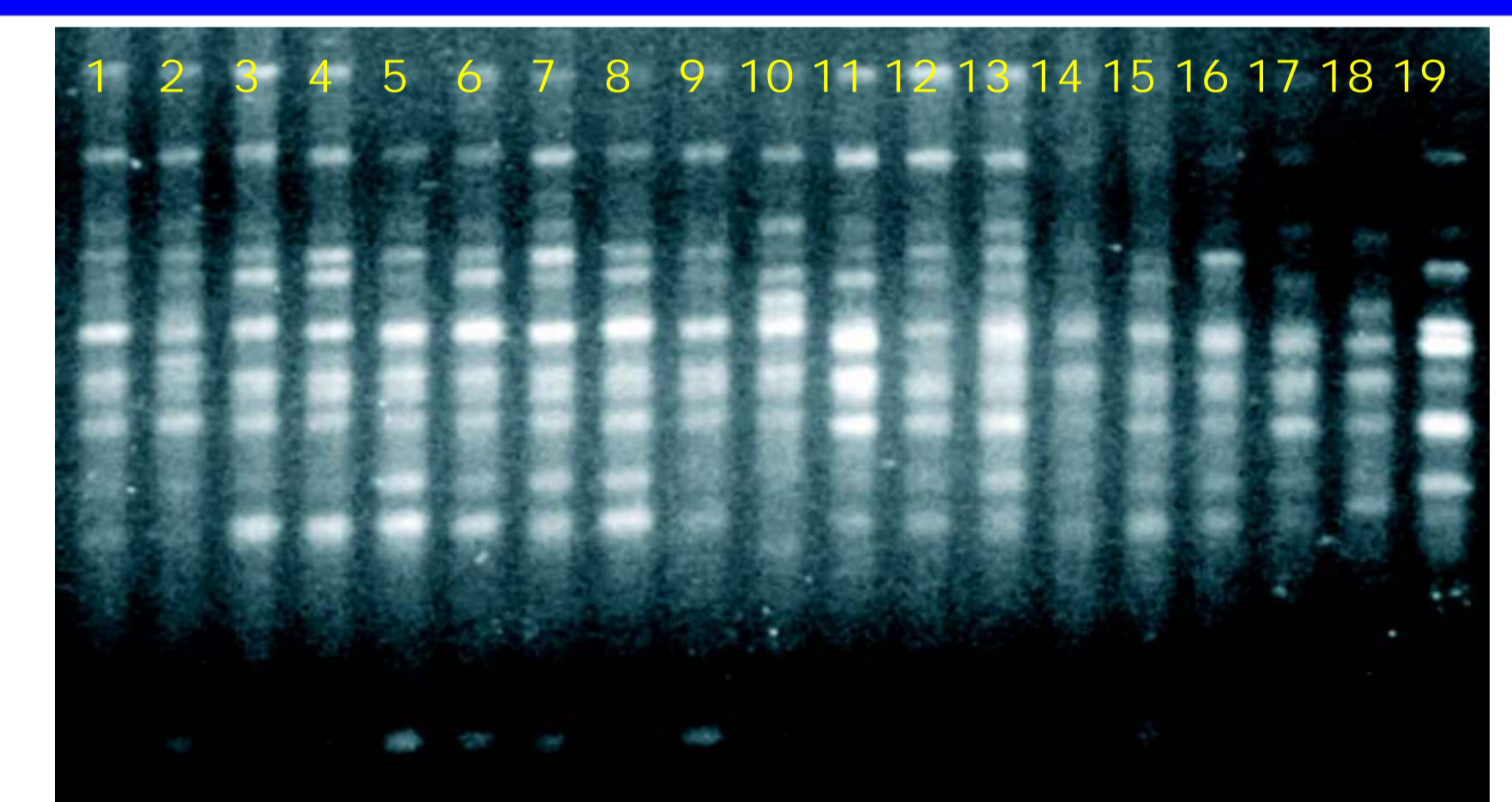


Figura 2. Produto da amplificação do DNA genômico de 19 acessos de maracujazeiro com uso de *primer* decâmero OPF-14.

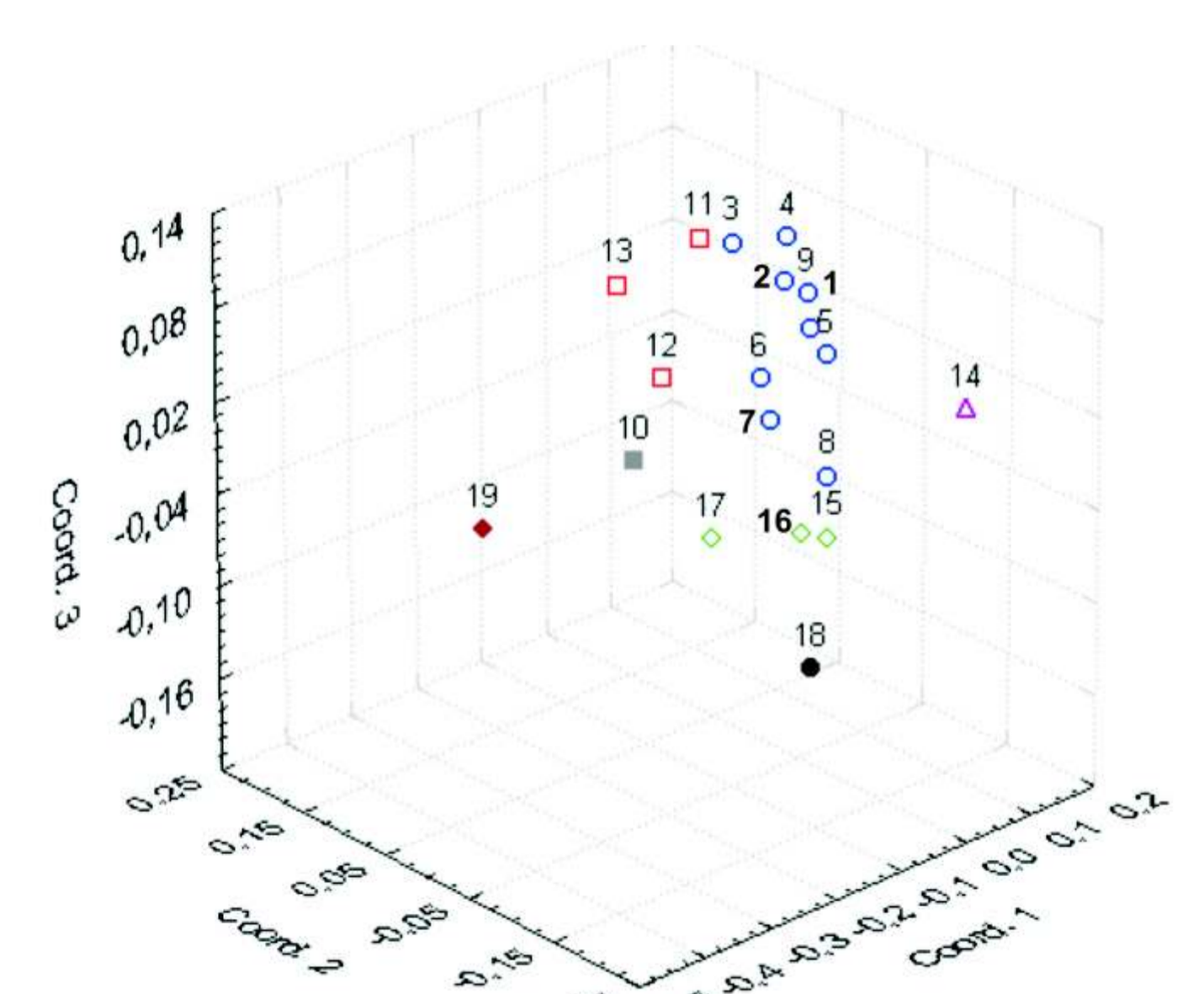


Figura 4. Dispersão gráfica em 3D de 19 acessos de maracujazeiro com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 140 marcadores RAPD. Os números correspondem aos acessos da Tabela 1.

## LITERATURA CITADA

- CRUZ, C.D. Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV. 1997. 442p.
- CUNHA, M.A.P. Prioridades de pesquisa por subárea e objetivo. In: REUNIÃO TÉCNICA: PESQUISA EM MARACUJAZEIRO NO BRASIL, 1997, Cruz das Almas, BA: EMBRAPA/CNPMPF, 1998. p.11-14 (EMBRAPA-CNPMPF. Documentos, 77).
- 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.
- JUNQUEIRA, N.T.V.; PEIXOTO, J.R.; BRANCHER, A.; JUNQUEIRA, K.P.; FIALHO, J. de F. Melhoramento genético do maracujazeiro: In: Maracujá-doce: Tecnologia de produção e pós-colheita, mercado. Ivo Manica et al. Porto alegre. Editora cinco continentes, 2005, cap. 4, pág. 39 a 46.
- STATSOFT INC. Statistica for Windows [Computer program manual] Tulsa, OK. StatSoft Inc. 2300 East 14<sup>th</sup> Street, Tulsa. 1999.