

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES SILVESTRES DE MARACUJAZEIRO COM RESISTÊNCIA MÚLTIPLA A DOENÇAS COM BASE EM MARCADORES RAPD

Fábio Gelape Faleiro¹, Nilton Tadeu Vilela Junqueira¹, Graciele Belon²,
Thiago Alves Borges³, José de Ribamar Nazareno dos Anjos¹, José Ricardo Peixoto³,
Marcelo Fideles Braga¹, Dayane Garcia Santos⁴

¹Embrapa Cerrados, Caixa Postal 08223, CEP 73310-970, Planaltina-DF; ²UPIS-Faculdades Integradas; ³Universidade de Brasília; ⁴Centro Universitário do Triângulo

* e-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br

INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* é composto de 24 subgêneros e 465 espécies, das quais de 150 a 200 são originárias do Brasil e podem ser utilizadas como alimento, remédios e ornamento. Cerca de 70 espécies produzem frutos comestíveis (Cunha et al., 2002). Em 2000, a espécie *P. edulis* f. *flavicarpa* ocupava, no Brasil, uma área de aproximadamente 33.400 ha com uma produção de 330,8 mil toneladas e produtividade de 9,9 t/ha (FrutiSéries, 2002). Nos últimos anos tem-se observado uma redução na produtividade, o que se deve, principalmente, à ocorrência de doenças nessa cultura. Dentre essas, destaca-se a morte precoce do maracujazeiro (agente causal não identificado), virose do endurecimento do fruto (PWV), bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*) Fusariose (*Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae*), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), verrugose (*Cladosporium* spp.) (Junqueira et al., 2003).

O uso de cultivares resistentes associado a outras técnicas de manejo integrado é a medida mais eficaz, econômica e ecológica de controle de doenças. A busca e a caracterização de fontes de resistência a doenças é o primeiro passo para a implementação e o sucesso de programas de melhoramento. Estudos preliminares têm mostrado que existe pouca variabilidade genética entre as cultivares atuais para a resistência a doenças (Junqueira et al., 2003).

Por sua vez, espécies silvestres do gênero *Passiflora* (*P. laurifolia*, *P. nitida*, *P. tenuifolia*, *P. mucronata*, *P. giberti*, *P. Amethystina*, *P. quadrangularis*, *P. setacea*, *P. coccinea*, *P. caerulea*, entre outras) têm apresentado, com base em estudos preliminares, variabilidade para resistência às principais doenças do maracujazeiro (Cunha et al., 2002). Na Figura 1 ilustra-se algumas destas espécies. Estudos preliminares mostram que espécies silvestres de maracujazeiro têm elevado potencial para utilização como fontes de resistência a doenças em programas de melhoramento genético e como porta-enxertos. Uma caracterização genética detalhada de tais espécies é uma etapa básica para subsidiar tais utilizações.

OBJETIVO

Utilizar marcadores RAPD para caracterizar a diversidade genética de espécies silvestres de maracujazeiro, comparando-as com variedades comerciais e complementando as informações disponíveis de morfologia, características agronômicas e de resistência a doenças.

RESULTADOS

Foram obtidos 247 marcadores RAPD, sendo que não foram identificadas marcas monomórficas. As distâncias genéticas entre os 13 acessos variaram entre 0,080 e 0,953 (Tabela 1). O elevado número de bandas polimórficas e altos índices de distância genética evidenciam a alta diversidade genética entre os acessos de maracujazeiro analisados, o que está de acordo com os resultados obtidos por Crochemore (2002).

Menores distâncias genéticas foram verificadas entre acessos da mesma espécie. As distâncias genéticas entre os dois cultivares de *P. edulis flavicarpa* e os dois acessos de *P. nitida* foram de 0,124 e 0,080, respectivamente. O acesso de *P. nitida* identificado em Rondonópolis (*P. nitida* longo) apresentou distâncias genéticas altas (>0,430) em relação aos outros dois acessos de *P. nitida*, o que respalda a origem genética do formato do fruto (alongado) e das bordas foliares (lisas) diferentes dos acessos de *P. nitida* de Alto Paraíso e Corumbá. Com base nos marcadores foi possível inferir sobre a origem genética de um possível híbrido entre *Passiflora laurifolia* e *P. nitida* longo (Figura 2). O acesso 13 (*Passiflora* spp.) mostrou-se muito diferente das demais espécies analisadas neste trabalho (Tabela 1 e Figura 2), o que indica que tal acesso pertença a uma espécie diferente das analisadas.

A dispersão gráfica baseada nas distâncias genéticas e a análise de agrupamento, considerando um ponto de corte no dendrograma a 0,4 de distância genética relativa (Figura 3) ilustra o agrupamento dos acessos da mesma espécie (com exceção do acesso *P. nitida* longo), a maior proximidade genética entre o acesso 4 (F1?) e o acesso 3 (*P. laurifolia*) e a alta diversidade genética entre as espécies silvestres de maracujá em comparação com a espécie comercial *P. edulis flavicarpa*.

CONCLUSÕES

Os marcadores moleculares demonstraram uma alta diversidade genética das espécies silvestres de maracujazeiro analisadas, o que é muito interessante para subsidiar futuros trabalhos de melhoramento genético visando a ampliação da base genética da resistência e também de produção de mudas por enxertia visando a resistência a fungos de solo e à morte precoce do maracujazeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Nos materiais genéticos analisados no presente trabalho foram analisados 13 acessos de maracujazeiro, envolvendo oito diferentes espécies (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 pela técnica de 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 da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Para obtenção dos marcadores RAPD foram utilizados 9 *primers* decâmeros: OPD-07, OPD-08, OPD-16, OPE-18, OPF-01, OPG-08, OPG-17, OPH-12 e OPH-16. As amplificações foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte sequência: 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 35 °C e 90 segundos a 72 °C. Depois dos 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de seis minutos a 72 °C, e finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C. Depois da 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 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. A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar a análise de agrupamento por dendrograma e dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do Programa SAS e do Programa Statistica.

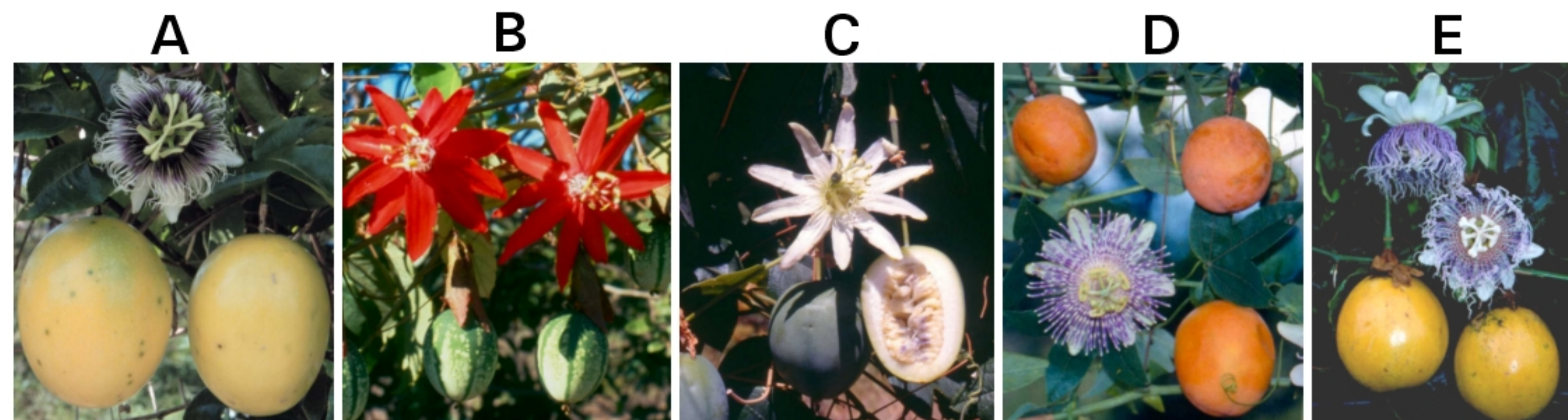


Figura 1. Ilustrações da espécie comercial *Passiflora edulis* (A) e das espécies silvestres *P. coccinea* (B), *P. setacea* (C), *P. giberti* (D) e *P. nitida* (E).

Tabela 1. Distâncias genéticas entre 13 acessos de maracujazeiro, calculadas com base em 247 marcadores RAPD.

Variedades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 Pef cv. Gigante Amarelo	0,000	0,124	0,800	0,794	0,776	0,784	0,811	0,823	0,785	0,907	0,822	0,830	0,874
2 Pef cv. Redondão	0,124	0,000	0,784	0,745	0,748	0,772	0,733	0,822	0,786	0,815	0,786	0,792	0,833
3 P. laurifolia	0,800	0,784	0,000	0,192	0,564	0,562	0,464	0,792	0,684	0,853	0,674	0,740	0,859
4 F1?	0,794	0,745	0,192	0,000	0,537	0,515	0,379	0,813	0,723	0,850	0,613	0,776	0,856
5 P. nitida (Alto Paraíso)	0,776	0,748	0,564	0,537	0,000	0,080	0,433	0,882	0,728	0,828	0,307	0,776	0,810
6 P. nitida (Corumbá)	0,784	0,772	0,562	0,515	0,080	0,000	0,433	0,875	0,735	0,802	0,354	0,765	0,800
7 P. nitida longo (Rondonópolis)	0,811	0,733	0,464	0,379	0,433	0,433	0,000	0,756	0,643	0,967	0,556	0,741	0,953
8 P. tenuifolia (Patos de Minas)	0,823	0,822	0,792	0,813	0,882	0,875	0,756	0,000	0,803	0,759	0,882	0,763	0,896
9 P. mucronata	0,785	0,786	0,684	0,723	0,728	0,735	0,643	0,803	0,000	0,886	0,745	0,800	0,914
10 P. giberti	0,907	0,815	0,853	0,850	0,828	0,802	0,967	0,759	0,886	0,000	0,767	0,717	0,810
11 P. quadrangularis	0,822	0,786	0,674	0,613	0,307	0,354	0,556	0,882	0,745	0,767	0,000	0,705	0,868
12 P. amethystina	0,830	0,792	0,740	0,776	0,776	0,765	0,741	0,763	0,800	0,717	0,705	0,000	0,896
13 P. spp. ?	0,874	0,833	0,859	0,856	0,810	0,800	0,953	0,896	0,914	0,810	0,868	0,896	0,000

Pef – *Passiflora edulis flavicarpa*
P. – *Passiflora*

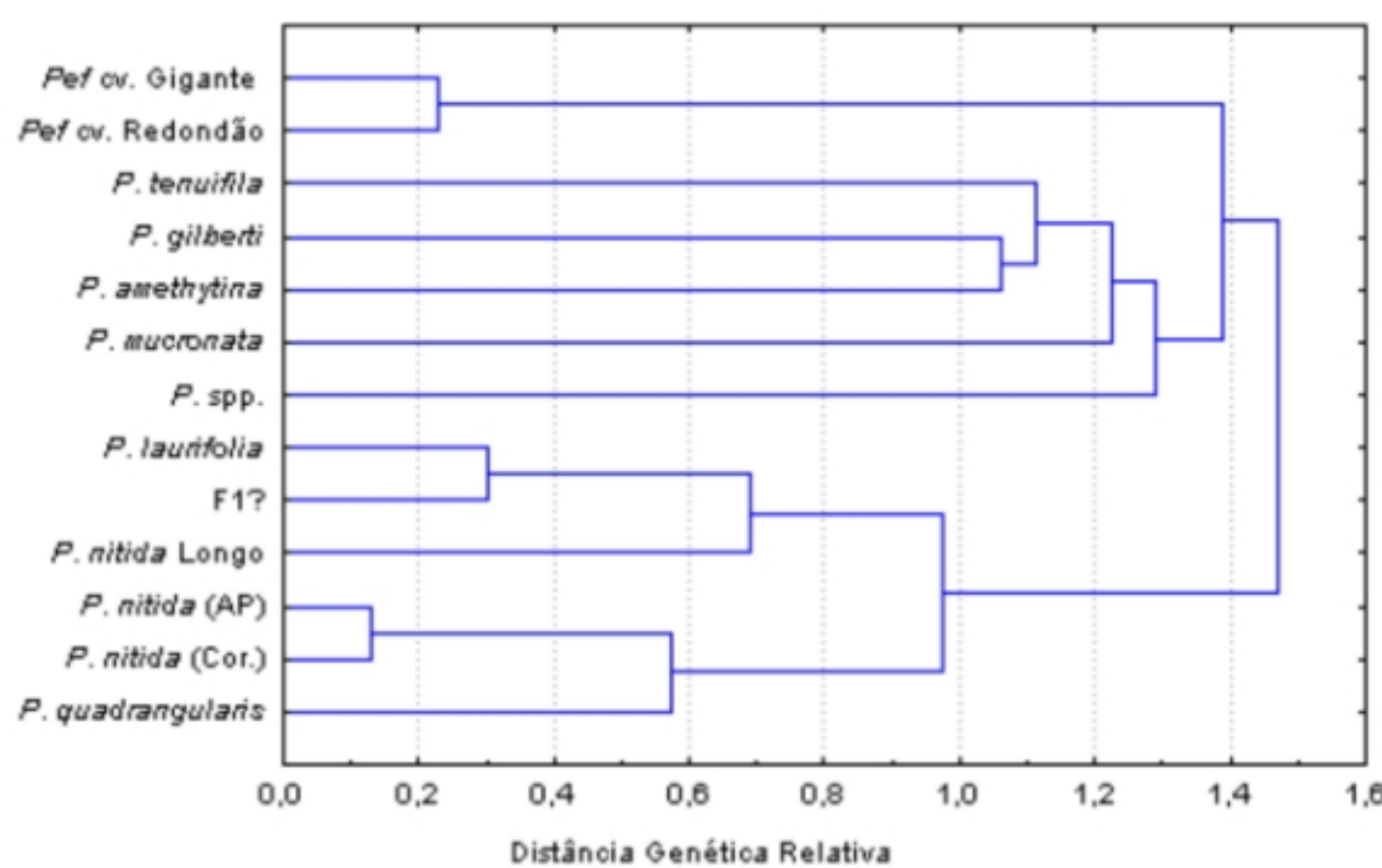


Figura 2. Análise de agrupamento de 13 acessos de maracujazeiro, baseada na matriz de distâncias genéticas. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

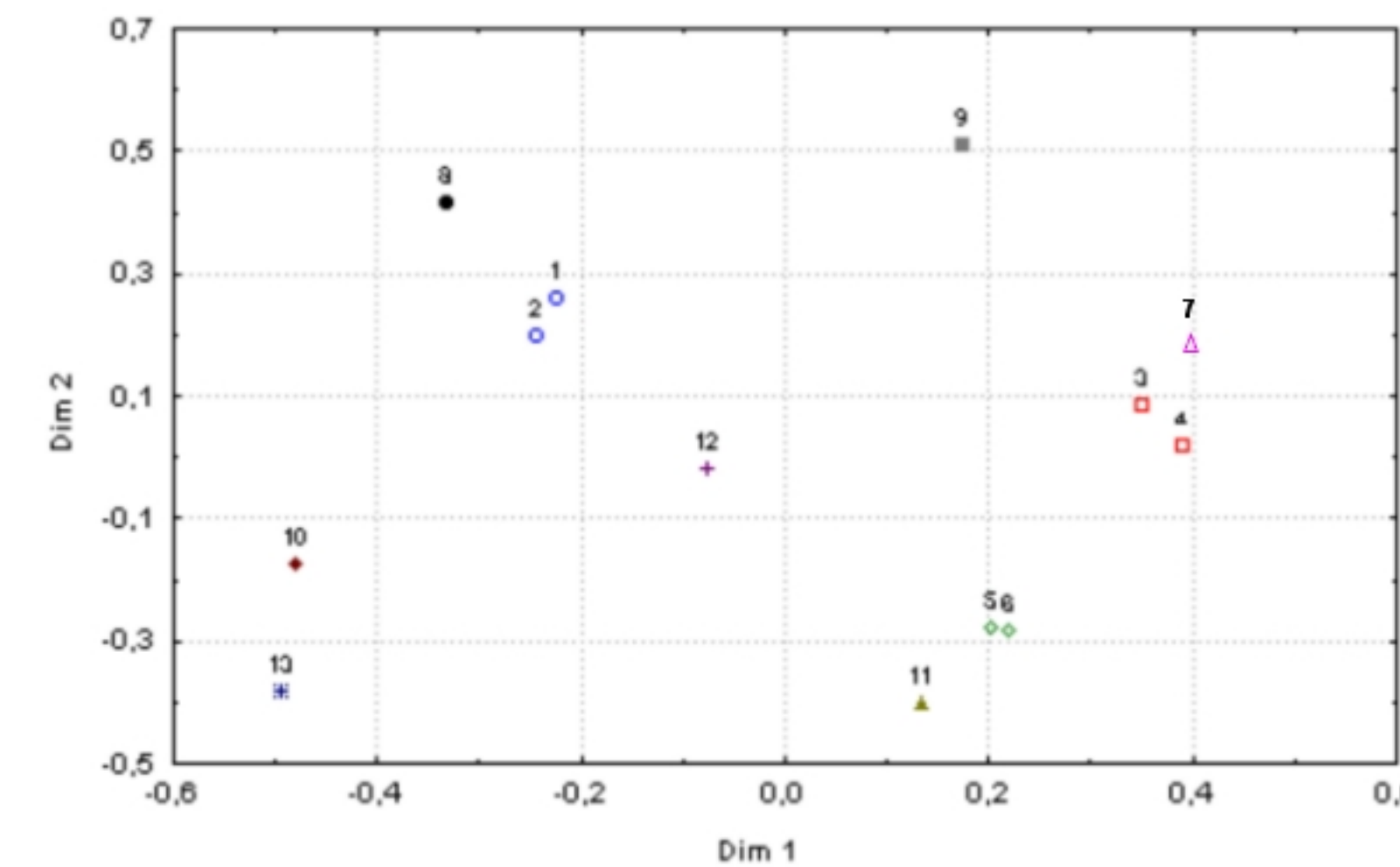


Figura 3. Dispersão gráfica de 13 acessos de maracujazeiro com base na matriz de distâncias genéticas. Os grupos de acessos foram estabelecidos a 0,4 de distância genética relativa (dendrograma).

LITERATURA CITADA

- CROCHEMORE, M. L. Diversidade genética do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, 3, 2002. Viçosa. Anais... Viçosa, 2002. P. 69-74.
- CUNHA, M. A. P.; BARBOSA, L. V.; JUNQUEIRA, N. T. V. Espécies de maracujazeiro. In: LIMA, A. A. (Ed.). *Maracujá Produção: Aspectos Técnicos*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 104p. (Frutas do Brasil, 15).
- FALEIRO, F. G.; FALEIRO, A. S. G. CORDEIRO, M. C. R. AND KARIA, C. T. 2003. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 8p. (Comunicado Técnico, 92).
- FRUTISÉRIES 2, Maracujá, Distrito Federal, Brasília, M/ISIN/DDH, março/2002. 8p.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; ANJOS, J. R. N.; SILVA, A. P. O.; CHAVES, R. C.; GOMES, A. C. Reação às doenças e produtividade de onze cultivares de maracujá-azedo cultivadas sem agrotóxico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 38, n. 8, p. 1006-1010, 2003.