

VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE *Passiflora tenuifolia* KILLIP DE TRÊS GERAÇÕES DE MELHORAMENTO COM BASE EM MARCADORES RAPD

Bernardo Coutinho de Almeida¹, Fábio Gelape Faleiro², Graciele Bellon³, João Gilberto Alves Villela¹, Nilton Tadeu Vilela Junqueira², Ana Maria Costa², Tadeu Gracioli Guimarães², João Batista dos Santos²

¹ Bolsistas de IC/Estagiários, CNPq/Embrapa Cerrados/UnB, bernardo.coutinho@cpac.embrapa.br

² Embrapa Cerrados, CP 08223, 73310-970 Planaltina DF, ffaleiro@cpac.embrapa.br

³ Bolsista DTI/Estagiária, CNPq/Embrapa Cerrados

INTRODUÇÃO

Passiflora tenuifolia é uma espécie silvestre de maracujá que tem recebido atenção especial da pesquisa devido ao seu potencial uso como planta medicinal. Para otimizar o sistema de produção desta espécie, trabalhos de melhoramento genético visando produtividade e maior tamanho dos frutos são essenciais. A variabilidade genética é a base do sucesso de programas de melhoramento e sua avaliação e monitoramento nos diferentes ciclos de seleção é de grande importância visando à obtenção de ganhos genéticos.

OBJETIVO

Avaliar a variabilidade genética de nove acessos de *Passiflora tenuifolia* de três gerações de melhoramento, utilizando marcadores moleculares RAPD, para descobrir a possibilidade de ganhos de seleção nas próximas gerações.



Passiflora tenuifolia Killip

RESULTADOS

Os 8 primers utilizados geraram um total de 120 marcadores RAPD. A Figura 1 ilustra os produtos de amplificação gerados com a utilização do primer OPH-04. Considerando apenas os acessos de *P. tenuifolia*, foram obtidos 105 marcadores dos quais 75,2% foram polimórficos, evidenciando a existência de variabilidade genética e a eficiência da técnica de RAPD na detecção da variabilidade genética presente nos genótipos estudados. Dentre os primers utilizados, o que evidenciou o maior número de bandas polimórficas foi o OPF-14 (16 bandas polimórficas). Os primers que evidenciaram o menor número de bandas polimórficas foram o OPH-12 e OPH-19 (ambos com 09 bandas polimórficas) (Tabela 1).

As distâncias genéticas entre os acessos de maracujá variaram de 0,037 a 0,567 e, considerando apenas *P. tenuifolia*, de 0,037 a 0,372 (Tabela 2). A menor distância foi obtida entre as plantas 2 e 6 da 3ª geração de melhoramento e a maior entre a planta 1 da 3ª geração de melhoramento e a planta do BAG da 1ª geração de melhoramento.

A análise de agrupamento mostrou uma redução da base genética a cada geração de melhoramento, o que aconteceu devido à seleção das melhores plantas com relação a maiores produtividades e tamanho de frutos. Analisando-se as distâncias genéticas e a análise de agrupamento, verifica-se que ainda existe variabilidade genética entre as plantas da 3ª geração de melhoramento, indicando a possibilidade de ganhos de seleção na próxima geração.

CONCLUSÕES

Os marcadores RAPD mostraram a variabilidade genética entre acessos de *Passiflora tenuifolia* diferenciando claramente os acessos das 3 gerações de melhoramento. Os resultados evidenciam uma redução da base genética a cada ciclo de seleção, entretanto mostram uma variabilidade genética entre as plantas da 3ª geração, indicando a possibilidade de ganhos genéticos na próxima geração.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 9 acessos de *Passiflora tenuifolia* de 3 gerações diferentes de melhoramento. Um acesso de *Passiflora edulis* foi utilizado como outgroup.

O DNA genômico dos acessos foram extraídos a partir de folhas por meio do método do CTAB, com modificações (Faleiro et al., 2003). As amostras de DNA de cada acesso foram amplificadas para obtenção de marcadores RAPD. As reações de amplificação foram realizadas 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 desoxirribonucleotídeos (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 8 primers decâmeros (Tabela 2). Foi utilizado um 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. Após os 40 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de seis minutos a 72°C, e posteriormente, a temperatura foi reduzida para 4°C. Após a amplificação, foram adicionadas, 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 produtos das reações de amplificação (marcadores RAPD), foram classificados conforme presença (1) e ausência (0) e convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foi estimada a dissimilaridade genética entre os diferentes acessos, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei & Li (1979), utilizando-se o Programa Genes (Cruz, 1997). Com base na matriz de similaridade foi construído um dendrograma por meio do método de agrupamento da distância média (UPGMA), com auxílio do programa Statistica (Statsoft Inc, 1999).

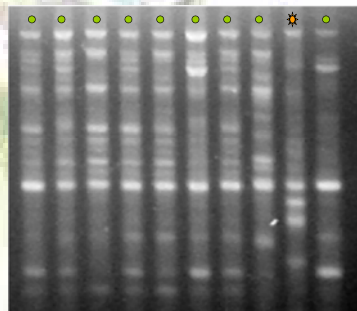


Figura 1. Produtos de amplificação de DNA genômico de 9 acessos de *Passiflora tenuifolia* e 1 acesso de *Passiflora edulis* (outgroup), utilizando o primer OPH-04. A seta

Tabela 1. Primers utilizados para obtenção dos marcadores RAPD e respectivos número de bandas polimórficas e monomórficas.

Primer	Sequência 5'→3'	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas monomórficas
OPF-14	TGCTGCAGGT	16	3
OPG-05	CTGAGACGGA	12	1
OPG-08	TCACGTCCAC	13	3
OPG-15	ACTGGGACTC	10	4
OPH-04	GGAAGTCGCC	12	4
OPH-12	ACGCGCATGT	9	2
OPH-14	ACCAGGTTGG	13	5
OPH-19	CTGACCAGCC	9	4
		94	25

Tabela 2. Matriz de dissimilaridade entre 9 acessos de *P. tenuifolia*, calculada com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, utilizando-se 120 marcadores RAPD

Acessos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 <i>P. tenuifolia</i> PL1 - 3ª geração melhoramento									
2 <i>P. tenuifolia</i> PL2 - 3ª geração melhoramento	0.181								
3 <i>P. tenuifolia</i> PL3 - 3ª geração melhoramento	0.174	0.043							
4 <i>P. tenuifolia</i> PL4 - 3ª geração melhoramento	0.182	0.075	0.057						
5 <i>P. tenuifolia</i> PL5 - 3ª geração melhoramento	0.182	0.107	0.084	0.052					
6 <i>P. tenuifolia</i> PL6 - 3ª geração melhoramento	0.183	0.037	0.068	0.060	0.076				
7 <i>P. tenuifolia</i> PL7 - 3ª geração melhoramento	0.159	0.114	0.125	0.137	0.113	0.108			
8 <i>P. tenuifolia</i> - BAG - 1ª geração melhoramento	0.372	0.282	0.275	0.200	0.314	0.291	0.274		
9 <i>P. tenuifolia</i> - CPAC MU-30-01 2ª geração melhoramento	0.258	0.208	0.220	0.174	0.212	0.194	0.182	0.372	
10 <i>P. edulis</i>	0.513	0.461	0.469	0.469	0.515	0.488	0.493	0.471	0.557

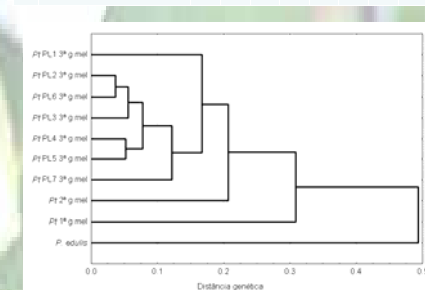


Figura 2. Análise de agrupamento de 9 acessos de *P. tenuifolia*, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas com base no complemento do coeficiente de dissimilaridade de Nei e Li, utilizando-se 120 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- 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: CPAC, 2003. 6p.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. Cerrado, espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa - CPAC. Distrito Federal, p. 464, 1998.
- CRUZ, C.D. Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 1997. 442p.
- STATSOFT INC. Statistica for Windows [Computer program manual] Tulsa, OK. StatSoft Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa, 1999.