

# Seleção de iniciadores ISSR para estudos de diversidade genética em acessos de *Passiflora cincinnata* Mast.

*Simone Sales Souza*<sup>1</sup>; *Pedro Henrique Dias Nascimento*<sup>2</sup>; *Francisco Pinheiro de Araújo*<sup>3</sup>; *Saulo de Tarso Aidar*<sup>4</sup>; *Natoniel Franklin de Melo*<sup>5</sup>

## Resumo

O maracujá-da-caatinga (*Passiflora cincinnata* - Passifloraceae) é uma espécie de maracujá nativo com potencial de uso tanto em áreas de cultivo em condições de sequeiro quanto em cultivo irrigado. Nessa espécie, observa-se uma considerável diversidade no formato de frutos, flores e folhas, destacando-se ainda o uso por causa de suas propriedades medicinais, e da tolerância a doenças e ao déficit hídrico. O objetivo deste trabalho foi selecionar iniciadores ISSR (Sequências Simples Repetitivas Internas) para avaliar a diversidade genética em 15 acessos de *P. cincinnata*. Folhas frescas foram coletadas no BAG de Maracujá da Embrapa Semiárido e utilizadas para a extração de DNA genômico e análise do polimorfismo de bandas produzidas por iniciadores ISSR. Foram selecionados sete iniciadores polimórficos, os quais amplificaram 621 bandas com tamanhos variando entre 200-2000 pb (média de 88,7 bandas por iniciador), com um polimorfismo médio de 42,19%. Os marcadores ISSR permitiram estimar a diversidade genética e geraram informações úteis para uso no programa de melhoramento genético.

**Palavras-chave:** maracujazeiro, marcador molecular, DNA genômico, polimorfismo.

---

<sup>1</sup>Estudante de Ciências Biológicas - UPE, bolsista Pibic CNPq da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

<sup>2</sup>Mestrando em Agronomia-Produção Vegetal – Univasf e bolsista Facepe, Petrolina-PE.

<sup>3</sup>Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Horticultura, analista da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

<sup>4</sup>Biólogo, D.Sc. em Fisiologia Bioquímica de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

<sup>5</sup>Biólogo, D.Sc. em Ciências Biológicas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, [natoniel.melo@embrapa.br](mailto:natoniel.melo@embrapa.br).

## Introdução

Dentre as espécies nativas do gênero *Passiflora*, *P. cincinnata* é uma das que apresenta maior potencial de mercado por causa da qualidade dos frutos, além de possuir vantagens no cultivo por suas propriedades de tolerância a estresses bióticos e abióticos (Junqueira et al., 2005; Araújo et al., 2006). Além disso, apresenta outros caracteres de interesse agrônômico (Araújo et al., 2008), como maior longevidade, ampliado o período de florescimento, e presença de componentes químicos de interesse para indústria farmacêutica (Junqueira et al., 2005; Meletti et al., 2005).

A variabilidade fenotípica intraespecífica encontrada entre os acessos de *P. cincinnata* coletados em diferentes estados do Nordeste serviu de base para a formação de um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Maracujá na Embrapa Semiárido para a conservação e caracterização desses recursos genéticos (Araújo et al., 2012).

Os marcadores moleculares ISSR (Sequências Simples Repetitivas Internas) se destacam como um dos mais úteis na determinação do polimorfismo molecular em germoplasma melhorado e não melhorado, cujo uso já foi relatado em diversas espécies vegetais, incluindo-se, dentre elas, o maracujazeiro (Borba et al., 2005; Costa et al., 2012).

Este trabalho teve como objetivo contribuir para a caracterização do BAG de Maracujá da Embrapa Semiárido por meio do uso de marcadores de DNA do tipo ISSR, buscando-se selecionar iniciadores e estimar a diversidade genética em 15 acessos de *P. cincinnata* para gerar informações úteis para os programas de melhoramento genético de maracujazeiro.

## Materiais e Métodos

Foram estudados 15 acessos de *P. cincinnata* provenientes do BAG de Maracujá da Embrapa Semiárido, localizado no Campo Experimental da Caatinga, em Petrolina, PE. As análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia da mesma instituição.

A extração do DNA foi realizada utilizando-se o procedimento descrito por Doyle e Doyle (1990). A quantificação do DNA foi estimada em gel de agarose a 1% (p/v), mediante a comparação com o DNA de fago  $\lambda$  (5 ng, 10 ng e 20 ng), corado com brometo de etídio. As amostras foram diluídas para 10 ng/ $\mu$ L e armazenadas a -20 °C.

As reações de amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram realizadas em termociclador Gene Amp 9600 (Applied Biosystems), onde cada amostra foi aferida para um volume final de 12,5 µL, contendo: 20 ng de DNA, 1x de tampão, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP's, 0,5 mM de iniciador, 0,7 U de Taq, ajustando-se o volume final com água Milli-Q.

O programa de amplificação constou de uma etapa a 94 °C por 3 minutos, seguida de 39 ciclos de: 94 °C por 45 segundos, anelamento a 50 °C por 1 minuto, e amplificação a 72 °C por 1 minuto, com extensão final a 72 °C por 7 minutos. Foram avaliados 15 iniciadores ISSR, objetivando-se selecionar os mais polimórficos.

Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v), corado com brometo de etídio e submetidos à voltagem constante de 100 V por 3 horas. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada sob luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos foi estimado com marcador de peso molecular 100 pb (Ludwig).

## Resultados e Discussão

Foram selecionados sete iniciadores ISSR entre os 15 utilizados, em função da nitidez, reprodutibilidade e polimorfismos das bandas geradas. Os sete iniciadores selecionados amplificaram 621 bandas com tamanhos variando entre 200-2.000 pb (média de 88,71 bandas). O número total de fragmentos obtidos por acesso variou de 14 a 136 bandas. Do total geral de bandas obtidas, 262 foram polimórficas, o que representa uma média de 37,42 bandas por acesso, com polimorfismo médio de 42,19% (Tabela 1).

Os sete iniciadores ISSR revelaram a existência de variabilidade genética entre os acessos, sendo o acesso A8 aquele que apresentou o maior número médio de bandas (7,29), enquanto no acesso A10 foi obtido o menor número de bandas, com valor médio de apenas 4 bandas por iniciador (Tabela 1). Neste caso, o número de iniciadores utilizados é suficiente para estimar a diversidade genética por causa do polimorfismo obtido, conforme já relatado para outras espécies de *Passiflora* (Santos et al., 2011; Costa et al., 2012).

**Tabela 1.** Iniciadores ISSR utilizados na amplificação de fragmentos de DNA em 15 acessos de *Passiflora cincinnata* Mast., com suas respectivas sequências, número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de polimorfismo (P%), número de bandas por genótipos (NBG) e amplitude de fragmentos gerados (AF).

Primer	Sequência*	NTB	NBP	P(%)	NBG															AF (pb)
					<i>Passiflora cincinnata</i>															
					A6	A7	A8	A10	A11	A13	A15	A17	A19	A20	A33	A34	A51	A53	SF	
1-DiGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAC	68	49	72,05	5	5	6	1	1	2	-	4	8	7	1	9	6	4	9	200-1100
2-DiGT5'CR	CRGTGTGTGTGTGTGT	106	58	54,71	6	9	5	6	9	3	9	7	9	8	8	8	7	4	8	350-2000
3-DiGT5'CY	CYGTGTGTGTGTGTGT	93	18	19,35	6	4	7	6	5	7	4	4	5	9	6	9	8	5	8	350-800
4-TriCAC3'YC	CACCACCACCACCACYC	101	27	26,73	7	9	9	6	5	6	6	7	4	9	6	6	6	6	9	200-1500
5-TriCAC5'CR	CRCACCACCACCACCAC	136	22	16,17	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	10	7	11	11	8	200-1250
7-TriCAG	CAGCAGCAGCAGCAG	103	81	78,64	8	8	10	-	5	9	9	9	7	9	7	7	9	6	-	350-1250
9-TriCAG3'YC	CAGCAGCAGCAGCAGYC	14	7	50	-	6	5	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	350-1250
Total		621	262	42,19	41	50	51	28	34	36	37	43	42	50	38	46	47	36	42	
P(%)					6,6	8	8,2	4,5	5,5	5,8	6	7	6,8	8	6,1	7,4	7,5	5,8	6,8	
Média		88,71	37,42		5,86	7,14	7,29	4	4,86	5,14	5,28	6,1	6	7,14	5,43	6,57	6,71	5,14	6	

\*R = A + G; Y = C + T

## Conclusão

Os iniciadores ISSR DiGA3'C, DiGT5'CR, DiGT5'CY, TriCAC3'YC, TriCAC5'CR, TriCAG e TriCAG3'YC são eficientes para a caracterização e geração de informações sobre o polimorfismo entre acessos de *P. cinnata*, sugerindo-se seu uso como marcadores moleculares para a análise da diversidade genética e em auxílio aos programas de melhoramento genético.

## Referências

ARAÚJO, F. P. KIILL, L. H. P.; SIQUEIRA K. M. M. **Maracujá do mato**: alternativa agroindustrial para o Semi-Árido. Petrolina: Embrapa-CPATSA, 2006.

ARAÚJO, F. P.; SILVA, N; QUEIROZ, M. A. Divergência genética entre acessos de *Passiflora cinnata* Mast. com base em descritores morfoagronômicos. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 723-730, 2008.

ARAÚJO, F. P.; MELO, N. F. de; FÁBIO, G. F.; JUNQUEIRA, N. T. V.; QUEIROZ, M. A.; COELHO, M. S. E. Seleção de acessos de maracujazeiros silvestres visando resistência à fusariose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22., 2012, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: SBF, 2012. 1 CD-ROM.

BORBA, R. da S.; GARCIA, M. S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; COSTA, J. L.; JESUS, O. N.; OLIVEIRA, G. A. F.; OLIVEIRA, E. J. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, n. 35, p. 565-569, 2005.

COSTA, J. L.; JESUS, O. N.; OLIVEIRA, G. A. F.; OLIVEIRA, E. J. Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit. **Crop Breeding Applied Biotechnology** v.12, p. 253-260, 2012.

DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L. C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá**: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 81-106.

MELETTI, L. M. M., SOARES-SCOTT, M. D., BERNACCI, L. C., PASSOS, I. R. S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá**: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 55-78.

SANTOS, L. F.; OLIVEIRA, E. J.; SILVA, A. S.; CARVALHO, S. M.; COSTA, J. L.; PÁDUA, J. C. ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. **Biochemical Genetics**, v. 49, p. 540-554, 2011.