

MARCADORES MICROSSATÉLITES NA ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Passiflora*

Gilmara Alvarenga Fachardo Oliveira¹; Eder Jorge de Oliveira²; Juliana Leles Costa¹; Onildo Nunes de Jesus³; Fabiana Moraes de Carvalho⁴; Vânia Jesus dos Santos de Oliveira⁵; Jorge Luiz Loyola Dantas²;

¹Estudante de Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 44380-000, Cruz das Almas, BA, e-mail: gfachardo@yahoo.com.br; julianaleles_17@hotmail.com; ²Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Rua da Embrapa, s/n, Caixa Postal 007, 44380-000, Cruz das Almas, BA e-mail: eder@cnpmf.embrapa.br; loyola@cnpmf.embrapa.br; ³Bolsista PNP/DACT/PROIM - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, e-mail: onildo@cnpmf.embrapa.br; ⁴Estudante de Biomedicina da Faculdade Maria Milza, e-mail:fabianamoraescarvalho@hotmail.com; ⁵Doutoranda em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, e-mail: vania79br@hotmail.com.

Introdução

O gênero *Passiflora* possui ampla variabilidade intra e interespecífica, que podem ser utilizadas para fins alimentícios, farmacêutico e ornamental. A principal espécie cultivada é *Passiflora edulis* Sims. (maracujá amarelo e roxo) e *P. alata* (maracujá doce). Variação para características relacionadas à produtividade, precocidade, resistência a pragas e doenças e qualidade dos frutos é conservada nos bancos de germoplasma e precisa ser caracterizada.

Os marcadores microssatélites por apresentarem alto conteúdo de polimorfismo, natureza multialélica, boa cobertura do genoma e herança codominante, são ideais para caracterização de germoplasma. Um dos problemas deste marcador são os custos e tempo para obtenção, porém uma vez obtido este locus poderão ser transferido para outras espécies do mesmo gênero ou família (Pádua et al., 2005). O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética intra e interespecífica em 13 espécies de *Passiflora* da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical com uso de marcadores microssatélites.

Materiais e Métodos

Para a realização deste trabalho foi utilizado o DNA de 73 plantas (13 espécies de *Passiflora*) do BAG Maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.

Para as análises moleculares, foram testados 21 locos SSR identificados de *P.edulis* (Oliveira et al., 2005). As reações de amplificação foram feitas em volume final de 20 μ L, contendo 10 ng de DNA, 0,4 μ M dos iniciadores e 1,0 U de *Taq* DNA polimerase, dNTP, tampão, $MgCl_2$ demais reagentes (Tabela 1). O produto da amplificação foi separado em gel de agarose 1000 4% (Invitrogen) ou em gel desnaturante a 6% de poliacrilamida. A análise de diversidade (*shared allele*), heterozigosidade e conteúdo de informação polimórfica (PIC) foram realizadas no *software PowerMarker* e para construção do dendrograma o MEGA 4.0.

Tabela 1: Locos microssatélites utilizados na caracterização e concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR. Ta°C: Temperatura anelamento.

Locos	Ta°C	dNTP	Tampão	MgCl ₂	Loco	Ta°C	dNTP	Tampão	MgCl ₂
PE03	60	0,2 mM	1X	1,5mM	PE38	56	0,2 mM	1X	2,5mM
PE07	60	0,2 mM	2X	1,5mM	PE41	60	0,2 mM	1X	2,5mM
PE09	56	0,2 mM	2X	1,5mM	PE58	60	0,2 mM	1X	1,5mM
PE11	60	0,2 mM	2X	1,5mM	PE59	56	0,35mM	2X	1,5mM
PE13	60	0,2 mM	2X	1,5mM	PE64	56	0,2 mM	2X	1,5mM
PE15	60	0,35mM	2X	1,5mM	PE66	60	0,2 mM	1X	2,5mM
PE18	60	0,35mM	2X	1,5mM	PE74	62	0,2mM	1X	2,0mM
PE19	52	0,2 mM	1X	2,5mM	PE75	60	0,35mM	2X	1,5mM
PE23	56	0,35mM	2X	1,5mM	PE88	60	0,35mM	2X	1,5mM
PE27	60	0,2 mM	1X	2,5mM	PE90	60	0,2 mM	1X	2,5mM
PE37	60	0,2 mM	1X	1,5mM	-	-	-	-	-

Resultados e Discussão

Foram identificados 101 alelos nos acessos avaliados com média de cinco alelos por loco. O número de alelos variou de 1 a 14, respectivamente para os locos PE19 e PE 37 com média de cinco por locos (Tabela 2). A heterozigosidade variou de 0,0 (PE37) a 0,50 (PE59) com média de 0,159 por locos. Este comportamento contraria a natureza alógama da espécie. Porém, em outros estudos a presença de locos em homozigosidade também tem sido relatado para esta espécie (Pádua et al., 2005; Oliveira et al., 2005) (Tabela 2).

O PIC é um indicador da qualidade do marcador em estudos genéticos. No presente estudo 13 locos foram considerados altamente informativos (PIC > 0,50) enquanto cinco foi considerado medianamente informativo (0,25 a 0,50) e o restante pouco informativo segundo a classificação Botstein et al. (1980). Nove locos informativos (com alto PIC) destacaram por amplificar em mais de 70% dos acessos e poderão ser utilizados em estudo de variabilidade intra e interespecíficos e mapeamento genéticos (Tabela 2).

Tabela 2: Locos SSR utilizados na caracterização dos acessos do banco de germoplasma de maracujazeiro. NºObs: número acesso amplificado; Ho: heterozigiosidade observada; PIC: conteúdo de informação polimórfica.

Locos	Nº				Locos	Nº			
	Obs	Nº de alelos	Ho	PIC		Obs	Nº de alelos	Ho	PIC
PE19	63	14	0,21	0,74	PE27	15	2	0,07	0,16
PE13	69	4	0,15	0,13	PE64	19	2	0,00	0,31
PE75	28	4	0,32	0,54	PE90	53	8	0,02	0,70
PE15	49	4	0,10	0,53	PE07	57	8	0,16	0,79
PE18	62	9	0,27	0,68	PE58	10	3	0,10	0,37
PE88	66	2	0,00	0,37	PE11	9	4	0,44	0,64
PE41	73	2	0,08	0,34	PE09	61	6	0,10	0,71
PE59	26	5	0,50	0,65	PE74	28	6	0,07	0,71
PE 66	61	6	0,00	0,75	PE38	15	4	0,20	0,69
PE03	19	2	0,26	0,37	PE37	73	1	0,00	0,00
PE23	23	5	0,13	0,73					

A diversidade variou de 0,0 a 0,90 com média de 0,52, reflexo da natureza diversa dos acessos. A correlação cofenética foi de 0,77 indicando um alto ajuste entre a matriz original e a distância representando no dendrograma. Como era de esperar os acessos foram agrupadas em função das espécies avaliadas. Exceção foi o agrupamento do acesso BGM152-2 (*P. suberosa*) com acessos de *P. rubra* e o BGM107-1 (*P. morifolia*) com acessos de *P. cincinnata*. Na análise dos grupos formados por cada espécie, nota-se que os acessos de *P. foetida* não foram diferenciados com base nos marcadores utilizados, enquanto os grupos representados por *P. moliformis*, *P. gibertii*, *P. cincinnata* e *P. ligularis* apresentaram maior diversidade (Figura 1). Com essas informações os programas de melhoramento poderão dar os primeiros passos para elaboração de estratégias de hibridação envolvendo cruzamentos intra e interespecíficos.

Conclusão

Os marcadores microssatélites de *P. edulis* mostraram eficientes para estudo de variabilidade intra e interespecífica nos acessos avaliados. O resultado gerado permitirá a identificação de grupos heteróticos para futuros programas de hibridação.

Agradecimentos

À Fapesb e ao CNPq pelo auxílio financeiro e concessão das bolsas de estudo.

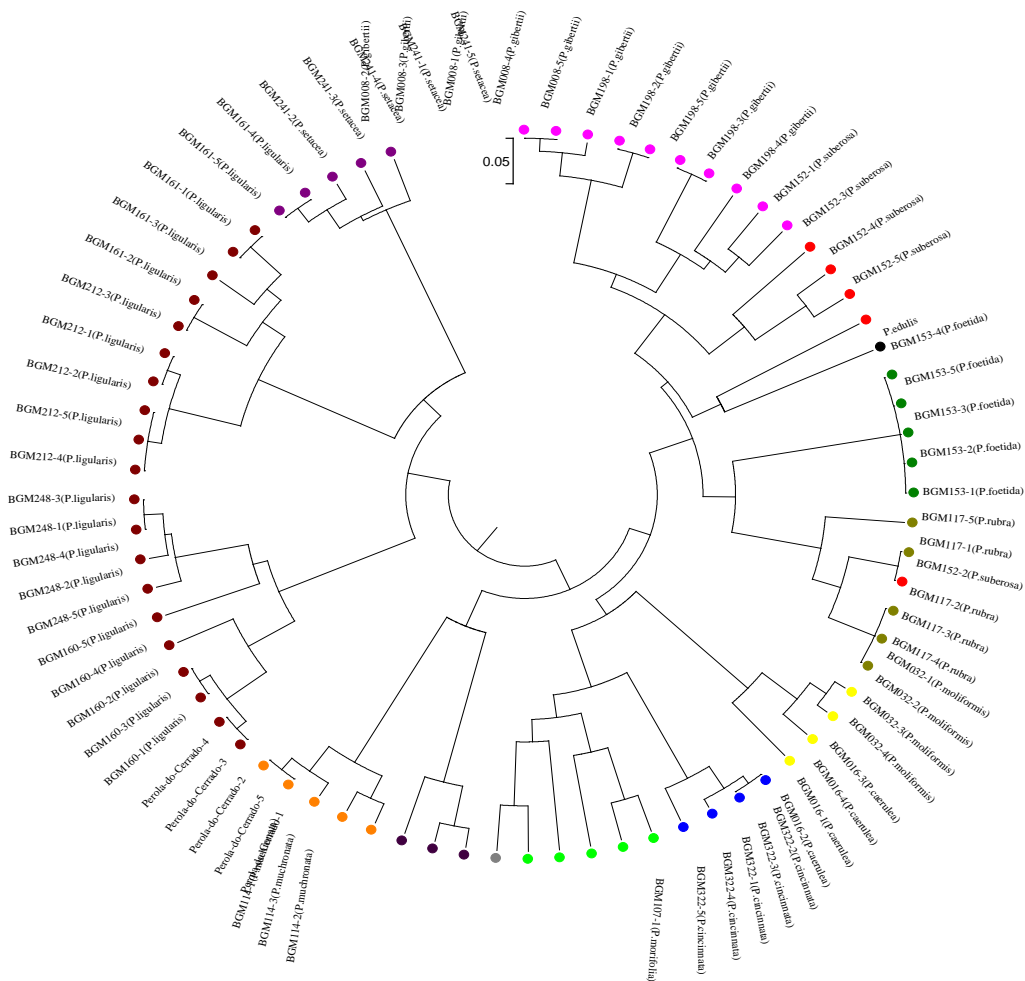


Figura 1. Dendrograma das relações genéticas entre 73 acessos de maracujazeiro obtidos por 21 marcadores utilizando o índice o *shared allele* e método UPGMA. Os acessos identificados com mesma cor são da mesma espécie pela informação de passaporte.

Referências Bibliográficas

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), **Molecular Ecology Notes**, v.5, p.331–333, 2005.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLMICK, H. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism, **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.

PÁDUA, J.G.; OLIVEIRA, E.J.; ZUCCHI, M.I.; OLIVEIRA, G.C.X.; CAMARGO, L.E.A.; VIEIRA, M.L.C. Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: Passifloraceae), **Molecular Ecology Notes**, v.5, p.863–865, 2005.