

USO DE MARCADORES MOLECULARES COMO FERRAMENTA AUXILIAR NA TAXONOMIA DE ACESSOS DO GÊNERO *PASSIFLORA*

Graciele Bellon¹, Fábio Gelape Faleiro², Nilton Tadeu Vilela Junqueira², Cristiane Andrea Lima¹, Bernardo Coutinho de Almeida³, João Gilberto Alves Villela³, Elisiane Fuhrmann⁴, João Batista dos Santos⁵

¹Estudantes de doutorado em Agronomia da Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, 70910-900 Brasília, DF, e-mail: gracibellon@yahoo.com.br, cristiane.andrea@yahoo.com.br,

²Pesquisadores da Embrapa Cerrados, BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223, 73010-970 Planaltina, DF, e-mail: ffaleiro@cpac.embrapa.br, Junqueira@cpac.embrapa.br,

³Estudantes de graduação em Agronomia da Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, 70910-900 Brasília, DF, e-mail: bc_almeid@yahoo.com.br, jgvillela13@yahoo.com.br

⁴Estudante de mestrado em Agronomia da Universidade de Brasília, e-mail: elisipva@yahoo.com.br

⁵Técnico do laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Cerrados e-mail: jb@cpac.embrapa.br

INTRODUÇÃO

A família *Passifloraceae* é amplamente distribuída nos trópicos e regiões temperadas quentes e é composta de mais de 500 espécies, das quais aproximadamente 130 ocorrem no Brasil (BERNACCI et al., 2005), podendo ser utilizadas como alimento, remédios e ornamento. Cerca de 70 espécies produzem frutos comestíveis. O Brasil é, atualmente, o maior produtor e o maior consumidor de maracujá do mundo.

Os estudos taxonômicos em *Passiflora* baseiam-se na caracterização morfológica e agrônômica da planta, levando a uma classificação nítida até o táxon espécie. A classificação botânica, muitas vezes não é um processo fácil, considerando a alta variabilidade intra-específica e o efeito ambiental sobre o fenótipo diferenciador entre espécies e variedades botânicas dentro da espécie (FALEIRO, 2007). A correta identificação de um acesso em um banco de germoplasma é essencial. Erros de identificação de acessos em Bancos de Germoplasma, podem ser causados por problemas de homonímia (o mesmo nome para diferentes acessos) e de sinonímia (diferentes nomes para o mesmo acesso).

Marcadores moleculares podem ser utilizados para auxiliar trabalhos de classificação botânica e filogenia, considerando o poder de diferenciação inter e intra-específica, porém estes nunca irão substituir o trabalho essencial e de grande importância dos botânicos e taxonomistas (FALEIRO, 2007).

O Banco Ativo de Germoplasma de maracujazeiro da Embrapa Cerrados “Flor da Paixão”, abriga uma das maiores coleções de espécies de *Passiflora* do mundo. Algumas dúvidas quanto à classificação taxonômica de alguns acessos têm ocorrido, a exemplo de um acesso de *Passiflora picturata* Ker Gawl. e um de *Passiflora hatschbachii* Cervi. Taxonomistas da equipe envolvida no melhoramento genético do maracujazeiro suspeitam que o acesso *P. picturata* pertença, na verdade, à espécie *Passiflora amethystina* e que o acesso *Passiflora hatschbachii* seja uma variação da espécie *Passiflora setacea*. Neste

trabalho, objetivou-se investigar as suspeitas acima, analisando cinco acessos de *Passiflora*, utilizando marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) como ferramenta auxiliar.

Material e Métodos

Foram analisados cinco acessos do gênero *Passiflora*, mantidos no Banco Ativo de Germoplasma de maracujazeiro da Embrapa Cerrados “Flor da Paixão (tabela 1). O DNA genômico de cada acesso foi extraído utilizando o método do CTAB, com modificações (FALEIRO et al., 2003). Foram utilizados 14 *primers* decâmeros: OPD (01, 05, 08 e 11), OPE (02, 16 e 20), OPF (08 e 14), OPG (05 e 18) e OPH (04, 12 e 15). Os marcadores foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre os acessos com base no complemento de similaridade de Nei e Li (1979), utilizando-se o Programa Genes (CRUZ, 2001) e realizadas análises de agrupamento por meio de dendograma, utilizando-se o método UPGMA (Unweighted pair-group arithmetic average) como critério de agrupamento e a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio do programa SAS (Sas Institute Inc, 1989) e Statistica (Statsoft Inc, 1999). A estabilidade dos agrupamentos foi estimada por meio da análise de Bootstrapping com 500 replicações por meio do programa Genes (CRUZ, 2001).

Tabela 1. Acessos de *Passiflora* e seus respectivos códigos.

Tubo	Acesso	Código
1	<i>Passiflora amethystina</i> SP	CPAC-MJ-13-03
2	<i>Passiflora amethystina</i> DF	CPAC-MJ-13-04
3	<i>Passiflora picturata</i> ??	CPAC-MJ-47-01
4	<i>Passiflora setacea</i>	CPAC-MJ-12-01
5	<i>Passiflora hatschbachii</i> ??	CPAC-MJ-50-01

Resultados e Discussão

Os 14 *primers* decâmeros geraram um total de 408 marcadores RAPD, perfazendo uma média de 29,14 marcadores por *primer*. Do total de marcadores (97%) foram polimórficos. A alta média de marcadores por *primer* e a alta porcentagem de marcadores polimórficos evidenciam alta variabilidade genética interespecífica. Faleiro et al. (2004), Pio Viana et al. (2003), Junqueira et al. (2006) e Bellon et al. (2007), já haviam relatado a alta variabilidade genética interespecífica no gênero *Passiflora* com base em marcadores RAPD.

As distâncias genéticas entre os cinco acessos de maracujá variaram entre 0,282 e 0,776 (Tabela 2). A menor distância foi observada entre *P. setacea* e *P. hatschbachii* e o

maior valor observado referem-se à distância entre o acesso de *P. hatschbachii* e *P. amethystina* SP.

A distância genética entre os dois acessos de *Passiflora amethystina* foi de (0,436) uma distância relativamente alta para acessos da mesma espécie. Existe uma suspeita que o acesso *Passiflora amethystina* SP, pertença, na verdade, à espécie *Passiflora loefgrenii* “Corupa”. As distâncias genéticas entre o acesso *Passiflora picturata* ?? e os acessos *Passiflora amethystina* SP e *Passiflora amethystina* DF foram de 0,562 e 0,561, respectivamente, indicando a possibilidade do acesso *Passiflora picturata* não pertencer a espécie *Passiflora amethystina*. Com relação ao acesso *Passiflora hatschbachii* ??, a distância genética do acesso *P. setacea* foi de 0,282. Esta magnitude de distância é comum entre acessos da mesma espécie, indicando a possibilidade do acesso de *Passiflora hatschbachii* ser, na verdade, uma variação da espécie *Passiflora setacea*.

As análises de agrupamento via dendrograma e gráfico de dispersão (Figura 1 e 2) ilustram as distâncias genéticas discutidas acima. O coeficiente de correlação cofenética do dendrograma ($r = 0,97$) revelou elevado ajuste entre a representação gráfica e a matriz de dissimilaridade original.

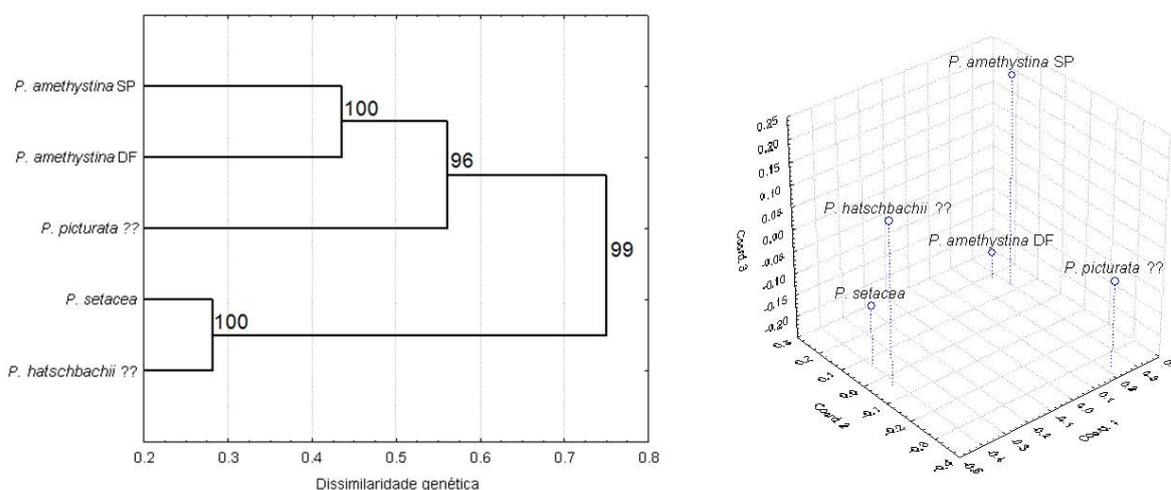


Figura 1. Análise de agrupamento e dispersão gráfica de cinco acessos de maracujá, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 408 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento. Os valores encontrados nos grupos indicam o valor percentual de vezes que os genótipos agruparam juntos em 500 ciclos de análise de *bootstrapping*. O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,97.

Conclusões

Os marcadores RAPD foram úteis como ferramenta auxiliar nos estudos taxonômicos de acessos de *Passiflora*. Os resultados evidenciam que o acesso *Passiflora hatschbachii*?? pode ser, na verdade, da espécie *Passiflora setacea* e que o acesso *Passiflora picturata* ?? possivelmente é realmente uma espécie diferente da *Passiflora amethystina*.

Referências Bibliográficas

BELLON, G.; FALEIRO, FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SANTOS, E. C.dos .; BRAGA, M. F.; GUIMARÃES, C. T. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *passiflora edulis* Sims., com base em marcadores RAPD. Revista Brasileira de Fruticultura, 2007, vol.29, n. 1, ISSN 0100-2945.

BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D. & PASSOS, I.R.S. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N. T.V., BRAGA, M. F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. pp. 559-586.

CRUZ, C.D. Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa : UFV, 2001. 648p.

FALEIRO, F.G. Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102p. il.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BELLON, G.; BORGES, T.A.; ANJOS, J.R.N.; PEIXOTO, J.R.; BRAGA, M.F.; SANTOS, D.G. Diversidade genética de espécies silvestres de maracujazeiro com resistência a múltiplas doenças com base em marcadores RAPD. Fitopatologia Brasileira, v. 29, (Supl), p. S325, 2004.

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, K. P.; Faleiro, F. G ; RAMOS, J. D. ; BELLON, G.; JUNQUEIRA, N,T,V ; BRAGA, M,F . Confirmação de hibridações interespecíficas no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. In: XIX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2006, Cabo Frio, RJ. p.384.

PIO VIANA, A.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, M. M.; MALDONADO, F.; AMARAL JÚNIOR, A. T. Diversidade entre genótipos de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras determinada por marcadores RAPD. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 489-493, dez. 2003.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT user`s guide. Version 6, 4th. Ed. Cary, North Caroline, 1989. 846 p.

STATSOFT INC. Statistica for Windows [Computer program manual] Tulsa, OK. StatSoft Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa. 1999.