

ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Passiflora edulis* Sims COM O USO DE MARCADORES ISSR

Juliana Leles Costa¹; Eder Jorge de Oliveira²; Onildo Nunes de Jesus³; Gilmara Alvarenga Fachardo Oliveira¹; Cláudia Garcia Neves⁴; Jacqueline Araújo Castro⁴

¹Estudante de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, e-mail: julianaleles_17@hotmail.com; gfachardo@yahoo.com.br; ² Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Rua da Embrapa, s/n, Caixa Postal 007, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA e-mail: eder@cnpmf.embrapa.br; ³ Bolsista PNPd/CAPES - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Rua da Embrapa, s/n, Caixa Postal 007, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, e-mail: onildo@cnpmf.embrapa.br; ⁴Mestranda na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, e-mail: claagrol@yahoo.com.br ; biojacque12@hotmail.com.

Introdução

Os marcadores moleculares são ferramentas úteis na caracterização da diversidade gênica em diversas culturas. Para a cultura do maracujá (*Passiflora edulis*) são escassos os trabalhos que utilizam essa ferramenta para caracterização visando identificar e manejar os recursos genéticos para uso nos programas de melhoramento.

Os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) podem auxiliar nas análises genéticas na cultura do maracujazeiro (*Passiflora edulis*), uma vez que, há nesta espécie ampla variabilidade e o princípio da técnica permite amplificar segmentos de DNA presentes entre duas regiões de microssatélites em direções opostas (Zietkiewicz et al., 1994).

Dessa forma, este estudo foi conduzido com o objetivo de determinar a variabilidade genética presente em acessos do banco de germoplasma e em acessos melhorados do programa de melhoramento genético do maracujazeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMF), com o uso de marcadores ISSR.

Material e Métodos

Foram utilizados 73 acessos de maracujá da Embrapa-CNPMF, sendo 42 acessos do banco e 31 provenientes de melhoramento (12 híbridos e 19 meios irmãos). Como no banco são mantidas 10 plantas por acessos optou-se em fazer um *pool* DNA desses 10 acessos a fim de reduzir o número de amostras analisadas.

A reação de amplificação foi feita no volume final de 15 uL contendo 10 ng de DNA, tampão de PCR 1X (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 200 uM de dNTP, 0,3 uM de cada iniciador, 1U da Taq DNA Polimerase. O programa de amplificação consistiu de um ciclo a 94 °C por 5 min; 35 ciclos a 94 °C por 40s, 45 ou 48 °C por 40s, 72 °C por 60s; e extensão final a 72 °C por 5min. Vinte e três iniciadores foram utilizados neste estudo (Tabela 1). A eletroforese foi feita em gel de 2% de agarose e coloração com brometo de etídeo e o tamanho dos fragmentos foi determinado com marcador de peso molecular 100 pb (Bio Labs).

Os dados binários gerados foram submetidos a uma análise de distância genética utilizando o coeficiente de dissimilaridade "*Simple Matching*" utilizando o programa Genes (Cruz, 2008). O dendrograma foi gerado utilizando o *software* Mega 4.1 (Tamura et al., 2007) utilizando como método de agrupamento o *neighbor joining*. O ajuste entre a matriz de distâncias e dendrograma foi verificado através de correlação cofenética (r_c).

Resultados e Discussão

Os marcadores ISSR geraram 320 bandas polimórficas (média de 13,9 bandas por iniciador) com o tamanho dos fragmentos variando entre 220 a 2300 pb. Dos 23 iniciadores testados vinte e dois iniciadores mostraram polimorfismo na população de plantas analisadas, sendo que DiCA3'G e o TriCAC5'CY foram o mais polimórfico com 20 e 21 bandas, respectivamente (Tabela 1). O iniciador TriGCC 3'RC não apresentou polimorfismo. Este resultado comprova o alto conteúdo informativo deste marcador.

O polimorfismo observado permitiu a obtenção do dendrograma mostrado na Figura 1. A consistência das informações gráfica com relação à matriz original foi comprovada pelo alto valor de correlação cofenética de 0,96 (Figura 1).

A análise visual dos dados permitiu a separação dos acessos em dois grandes grupos. Um constituído por acessos que compõem o banco de germoplasma (BGM, BRS e GP) e outros provenientes do programa de melhoramento (híbridos e progênies de meios irmãos). A dissimilaridade média estimada foi de 0,32 para os acessos que constituem o banco de germoplasma. Estes acessos foram agrupados em diferentes subgrupos, sendo que os acessos BGM 322 e o BRS GA foram os mais divergentes. A variabilidade maior deste grupo poderá ser explorada para obtenção de novos híbridos ou para organização do germoplasma em grupos heteróticos. Já os acessos oriundos do programa de melhoramento foram agrupados em dois subgrupos, um grupo de variabilidade menor (dissimilaridade média de 0,08) composto por híbridos da série HS. Esta menor variabilidade é esperada em virtude de compartilhar genitores em comuns. O outro grupo maior e mais heterogêneo composto por acessos de progênies de meios irmãos (dissimilaridade média de

0,13) de primeiro ciclo de geração recorrente. Essa heterogeneidade poderá ser de grande utilidade para seleção dos indivíduos que irão compor os novos ciclos de recombinação na seleção recorrente.

Tabela 01: Características dos 23 iniciadores utilizados na análise de diversidade genética no maracujazeiro. *R = A, G; Y = C, T

Nome do <i>primer</i>	Nº Total de Bandas	Nº de Bandas Polimórficas	Nº de Bandas Monomórficas	Nome do <i>primer</i>	Nº Total de Bandas	Nº de Bandas Polimórficas	Nº de Bandas Monomórficas
DiCA3'G	20	20	0	TriAAC 3'RC	13	13	0
DiCA3'RG	14	14	0	TriAAG 3'RC	13	13	0
DiCA3'YG	15	15	0	TriACG 3'RC	16	16	0
DiGA3'C	15	15	0	TriAGA 3'RC	10	10	0
DiGA3'RC	23	23	0	TriTGG 3'RC	3	1	2
DiGA3'T	19	19	0	TriCGA 3'RC	15	15	0
TriCAC3'R C	16	16	0	TriCGC 3'RC	14	11	3
TriCAC3'Y C	20	19	1	TriGAC 3'RC	7	3	4
TriCAC5'C Y	21	21	0	TriGCA 3'RC	13	13	0
TriCAG3'R C	6	6	0	TriGCC 3'RC	6	0	6
TriGTG3'Y C	15	14	1	TriGGA 3'RC	19	19	0
TriTGT3'Y C	11	11	0				

Conclusão

Os marcadores ISSR mostrou-se uma ferramenta valiosa para estudo de diversidade genética dentro de *P.edulis*. A variabilidade presente nos acessos que compõe os BAG poderão ser utilizados para geração de novas populações de melhoramento.

Agradecimentos

Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb).

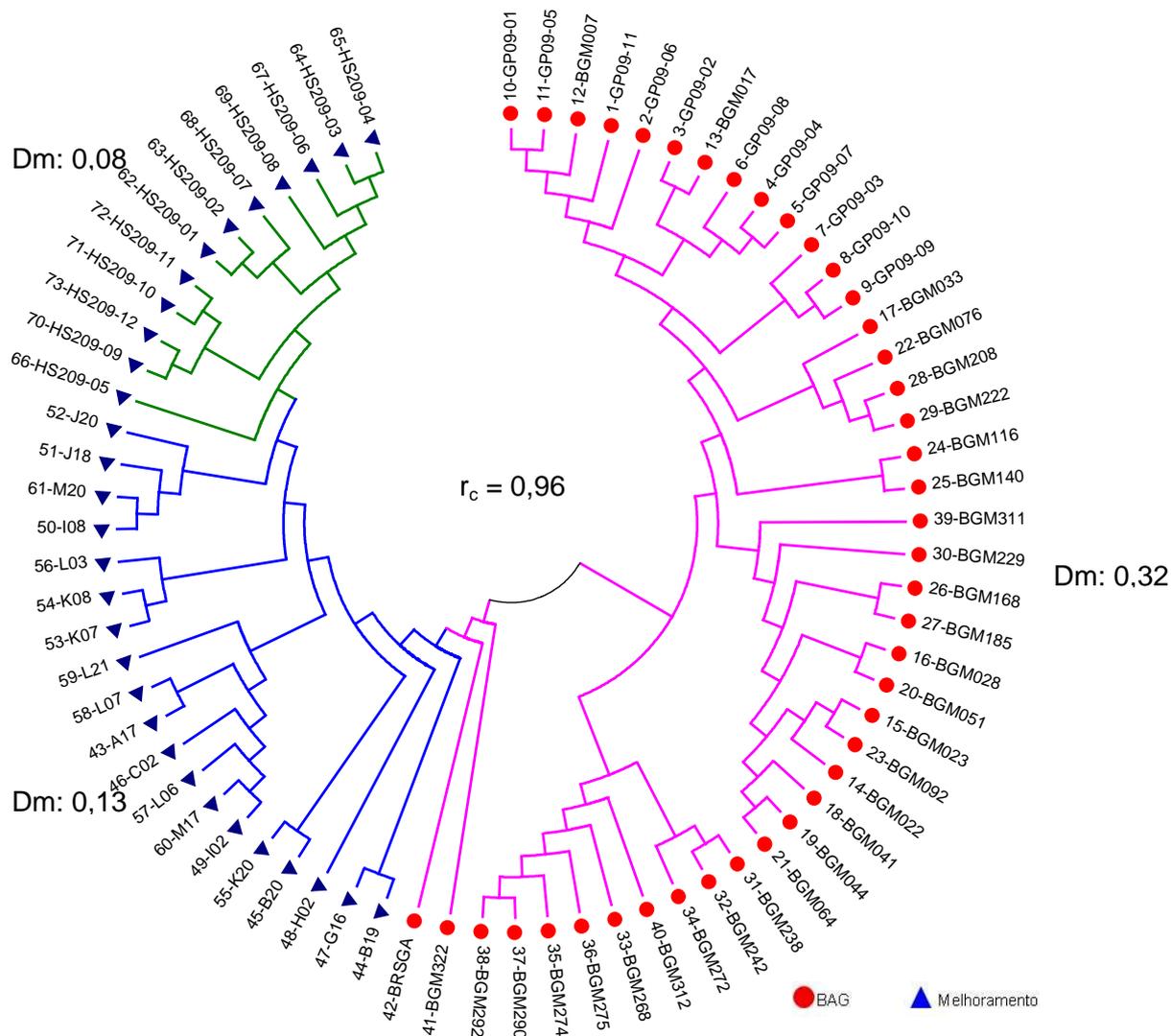


Figura 01: Dendrograma obtido pelo método *neighbor-joining*, a partir da dissimilaridade genética entre 73 acessos de maracujazeiro, utilizando marcadores ISSR. Os grupos avaliados estão identificados na cor rosa (BAG); azuis (meios irmãos) e verde (híbridos). Dm: dissimilaridade média por grupo; r_c : correlação cofenética.

Referências Bibliográficas

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Diversidade Genética**. Viçosa: Editora UFV, 2008. 278p.
 TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596–1599. 2007.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176-183. 1994.