

Variabilidade Molecular em Genótipos de *Passiflora edulis* Sims

Gilmara Alvarenga Fachardo Oliveira¹; Eder Jorge de Oliveira²; Juliana Leles Costa³; Onildo Nunes de Jesus²

Resumo

O objetivo deste estudo foi caracterizar acessos não melhorados (GNM) e melhorados (GM) do Banco Ativo de Germoplasma de Maracujazeiro (BAG-Maracujá), além de um híbrido comercial (BRS GA) e 12 em fase de avaliação (HIB) e 19 progênies de meios irmãos (SEDPMI), oriundos do programa de melhoramento genético da Embrapa Mandioca e Fruticultura (PMGM-CNPMF) com o uso de marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). A variação dos genótipos foi avaliada pelo método de agrupamento *neighbor joining* e por análise de componentes principais. A análise de variância molecular (AMOVA) foi utilizada para verificar a diferenciação entre os grupos de acordo com o grau de melhoramento. Os resultados dos agrupamentos mostraram a formação de dois grupos bem distintos: um proveniente de germoplasma e outro do PMGM-CNPMF. A AMOVA evidenciou que 57% da variação estão entre e 43% dentro dos grupos. Este estudo pode auxiliar na definição de estratégias mais eficientes a serem utilizadas no programa de melhoramento de maracujá amarelo assim como no direcionamento dos cruzamentos entre os genótipos mais contrastantes.

Introdução

A família *Passifloraceae* é composta por cerca de 630 espécies (Vanderplank, 1996), sendo que as espécies do gênero *Passiflora* têm grande valor medicinal, ornamental e, sobretudo, comercial. O maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims), tem destaque na produção de frutos, ocupando cerca de 95% da produção no Brasil (Moraes, 2005). A variabilidade genética presente nessa espécie torna-se uma ferramenta valiosa para ações de melhoramento em busca de genótipos mais adequados ao sistema intensivo de cultivo. Para isso, é necessário o desenvolvimento de trabalhos relativos à caracterização e avaliação para posterior seleção dos genótipos com caracteres de interesse (Santos et al. 2011).

Os marcadores moleculares permitem acessar a variabilidade diretamente em nível de DNA, sem influência do ambiente e não dependem da fase de desenvolvimento da planta. Por isso, os marcadores de DNA podem ser utilizados tanto em estudos de pré-melhoramento quanto na seleção assistida. Sendo assim, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de determinar a variabilidade genética presente em acessos do BAG-Maracujá e em acessos melhorados do PMGM-CNPMF, com o uso de marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*).

Materiais e Métodos

Folhas de 63 acessos de maracujazeiro foram coletados, sendo 20 acessos não melhorados (GNM) e 11 melhorados (GM) do BAG-Maracujá, além de um híbrido comercial (BRS GA) e 12 em fase de avaliação (HIB) e 19 progênies de meios irmãos (SEDPMI), provenientes do PMGM-CNPMF. O DNA foi extraído utilizando-se o protocolo com CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Doyle e Doyle (1987), com algumas modificações. Obteve-se um pool de DNA, amostrando-se 10 plantas por acessos.

Foram utilizados 23 iniciadores ISSR (Santos et al. 2011), cujas reações de amplificação foram realizadas em volume final de 15 μ L contendo 10 ng de DNA, tampão de PCR 1X (Invitrogen), 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTP, 0,3 μ M de cada iniciador e 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. O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%, com coloração de brometo de etídeo e visualizados sob luz UV. O tamanho dos fragmentos foi determinado com marcador de peso molecular 100 pb (Bio Labs).

Os dados binários foram analisados utilizando o coeficiente de dissimilaridade *Simple Matching* no programa Genes (Cruz 2008). O dendrograma foi gerado com uso do *software* Mega 4.1 (Tamura et al. 2007) utilizando como método de agrupamento *neighbor joining*. O ajuste entre a matriz de distâncias e dendrograma foi verificado através de correlação cofenética (rc).

¹Estudante de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, CEP 44380-000, Cruz das Almas-BA, e-mail: gfachardo@yahoo.com.br

²Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, CEP 44380-000, Cruz das Almas-Ba, e-mail: eder@cnpmf.embrapa.br; onildo@cnpmf.embrapa.br

³Mestranda em Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, CEP 13418-900, Piracicaba-SP, e-mail: julianaleles@usp.br

A análise de componentes principais também foi utilizada para visualização do agrupamento dos genótipos. A análise de variância molecular (AMOVA) foi efetuada pela decomposição dos componentes principais entre GNM, GM, HIB e SEDPMI. Estas análises foram realizadas com uso do *software* Genealx 6.1 (Peakall e Smouse 2006).

Resultados e Discussão

Dos 23 iniciadores ISSR testados, 22 detectaram polimorfismo nos acessos analisados. O número total de bandas variou de 2 a 20 para os iniciadores TriTGG 3'RC e TriCAC5'CY, respectivamente. Os marcadores geraram um total de 266 bandas, sendo que 260 foram polimórficas (média de 11,3 bandas por iniciador) com o tamanho dos fragmentos variando entre 220 a 2300 pb (Tabela 1). O alto número de bandas por iniciador e a baixa porcentagem de marcadores monomórficos evidenciam a alta variabilidade genética intra-específica dos acessos analisados.

Tabela 1. Características dos 23 Iniciadores utilizados na análise de diversidade genética no maracujazeiro, em relação ao número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP) e porcentagem de polimorfismo por marcador.

Iniciador*	NTB	NBP	% de polimorfismo	Iniciador	NTB	NBP	% de polimorfismo
DiCA3'G	18	18	100,0	TriAAC 3'RC	10	10	100,0
DiCA3'RG	12	12	100,0	TriAAG 3'RC	11	11	100,0
DiCA3'YG	11	11	100,0	TriACG 3'RC	11	11	100,0
DiGA3'C	9	9	100,0	TriAGA 3'RC	8	8	100,0
DiGA3'RC	17	17	100,0	TriTGG 3'RC	2	2	100,0
DiGA3'T	16	16	100,0	TriCGA 3'RC	15	15	100,0
TriCAC3'RC	14	14	100,0	TriCGC 3'RC	14	14	100,0
TriCAC3'YC	13	12	92,3	TriGAC 3'RC	7	7	100,0
TriCAC5'CY	20	19	95,0	TriGCA 3'RC	12	12	100,0
TriCAG3'RC	6	6	100,0	TriGCC 3'RC	6	0	0,0
TriGTG3'YC	14	14	100,0	TriGGA 3'RC	11	11	100,0
TriTGT3'YC	9	9	100,0				

*R = A, G; Y = C, T

Observou-se alta correlação cofenética (0,98) indicando que o dendograma apresenta um bom ajuste em relação aos dados da matriz de dissimilaridade (Figura 1). A amplitude da matriz de dissimilaridade foi de 0,049 a 0,407. A análise dos dados pelo dendograma permitiu a separação dos acessos em dois grandes grupos: um constituído por acessos que compõem o banco de germoplasma (GM e GNM) e o outro representado pelos híbridos e progênies de meios irmãos provenientes do programa de melhoramento genético (Figura 1). A análise de componentes principais revelou agrupamento similar ao obtido com a matriz de distância genética (Figura 2).

De acordo com a matriz de distância, os acessos do banco de germoplasma apresentaram a maior dissimilaridade média (0,13) e foram agrupados em diferentes subgrupos. A maior variabilidade genética deste grupo evidencia a ampla base genética da espécie, demonstrando boas perspectivas para seu uso no melhoramento, uma vez que, essa diversidade 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 três subgrupos, um grupo representado por acessos SEDPMI, híbridos em fase de avaliação e o híbrido comercial BRS GA. Os acessos SEDPMI foram os mais heterogêneos deste grupo com dissimilaridade média de 0,10. O BRS GA agrupou-se com as progênies de meios irmãos obtidos pelo PMGM-CNPMF, com dissimilaridade média de 0,11. Alta similaridade (0,92) foi observada entre o BRS GA e a progênie B19, indicando a possibilidade de compartilhamento de pool gênico. Os híbridos HIB possuem menor variabilidade (dissimilaridade média de 0,08), provavelmente pelo fato de possuírem alguns genitores em comum. Contudo, o híbrido HS209-05 foi o mais divergente entre estes, com dissimilaridade genética média entre os demais de 0,09 justificando sua alocação separada dos demais (Figura 1 e 2).

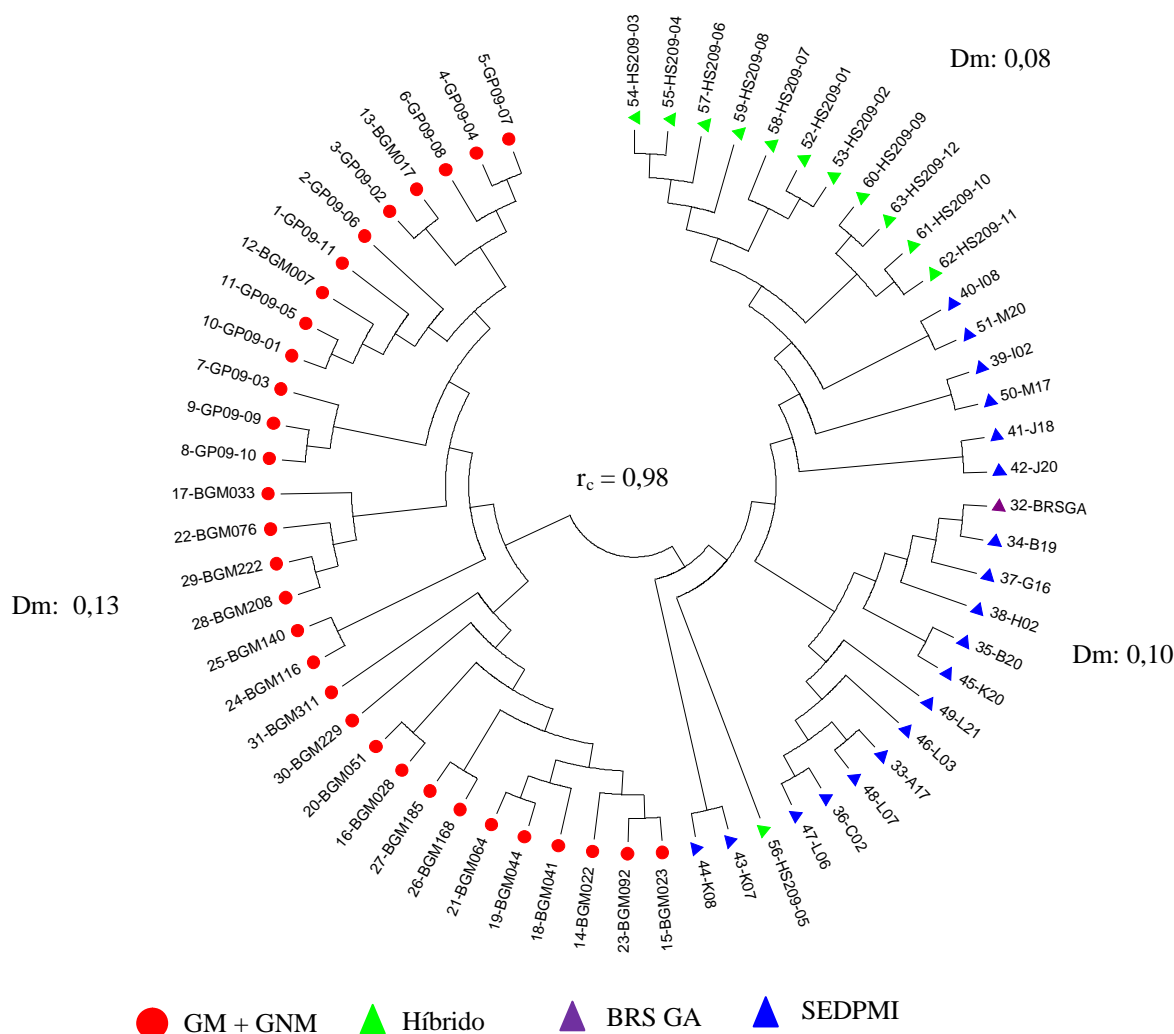


Figura 1: Dendrograma obtido pelo método *neighbor-joining*, a partir da dissimilaridade genética entre 63 acessos de maracujazeiro, utilizando marcadores ISSR. GNM = acessos não melhorados; GM = acessos melhorados; BRS GA = Gigante Amarelo; HIB = híbridos em fase de avaliação e SEDPMI = progênies de meios irmãos. Dm: dissimilaridade média por grupo; rc: correlação cofenética.

A proporção da variabilidade genética existente entre os quatro diferentes grupos com base na AMOVA revelou que a maior parte de variabilidade genética encontram-se entre estes grupos (57%), em comparação com 43% dentro (Tabela 2). A diversidade genética entre os acessos é devida, entre outros fatores, ao sistema de auto-incompatibilidade que favorece a polinização cruzada e, conseqüentemente, o fluxo gênico entre os genótipos distintos, justificando, o alto polimorfismo encontrado.

Estudos sobre a diversidade genética são essenciais nos programas de melhoramento genético e em estudos de pré-melhoramento a fim de conhecer o parentesco entre os genótipos, ao qual pode-se direcionar os cruzamentos visando obter ganhos genéticos nas gerações segregantes.

Tabela 2. Análise de variância molecular (AMOVA), considerando quatro grupos: Parentais, Germoplasma, Progênies de meios irmãos e híbridos. GL: grau de liberdade e SQ: soma dos quadrados e QM: quadrado médio.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Componente de variância	Varição total (%)
Entre Populações	3	1170,110	390,037	24,097	57%
Dentro de Populações	59	1061,786	17,996	17,996	43%
Total	62	2231,896		42,094	100%

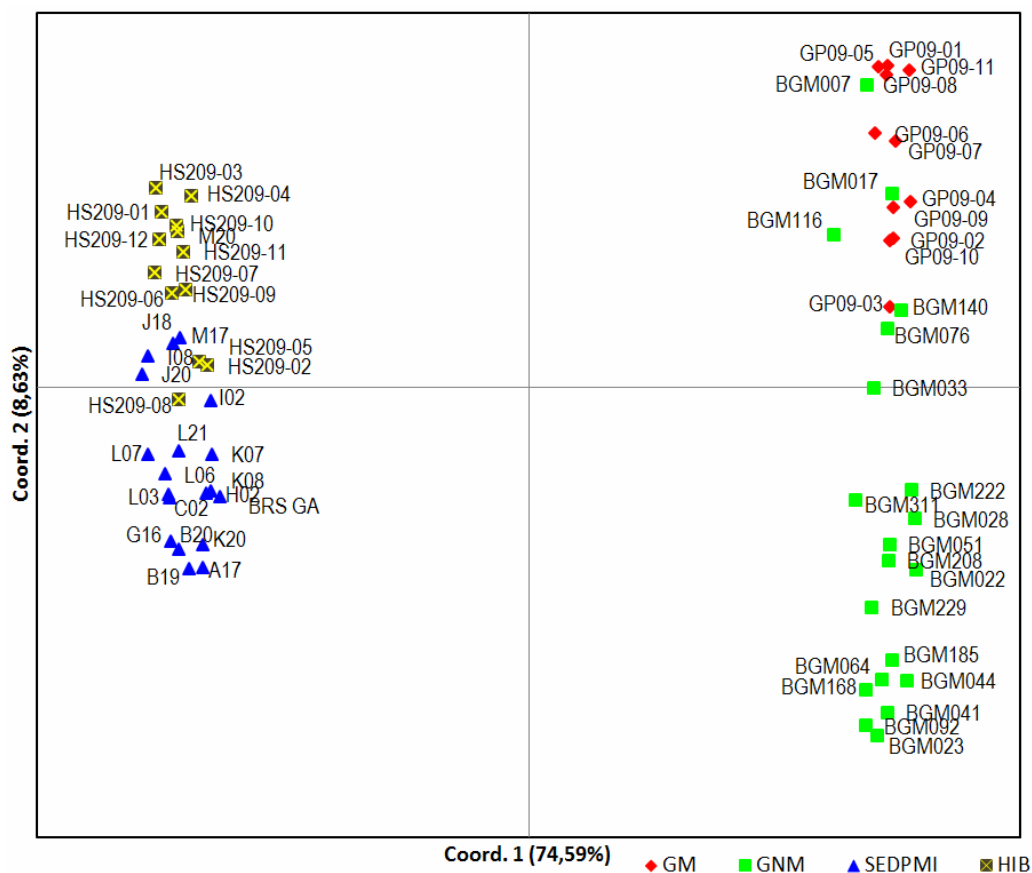


Figura 2. Análise de Componentes Principais (ACP) de 63 acessos de *P. edulis* baseado em 23 iniciadores de ISSR.

Referências

Cruz CD (2008) **Programa Genes: Diversidade Genética**. Editora UFV, Viçosa, 278p.

Doyle JJ and Doyle JL (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus 12**:13-15.

Moraes MC (2005) **Mapas de ligação e mapeamento de QTL (“Quantitative Trait Loci”) em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 141p.

Peakall R and Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes 6**: 288–295.

Santos LF, Oliveira EJ, Silva AS, Carvalho FM, Costa JL and Padua JG (2011) ISSR Markers as a Tool for the Assessment of Genetic Diversity in *Passiflora*. **Biochemical Genetics 49**.

Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4. **Molecular Biology and Evolution 24**: 1596–1599.

Vanderplank J (1996) **Passion flowers**. Massachusetts: MIT Press, 224p.