

VARIABILIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS ELITE DE MARACUJAZEIRO, OBTIDOS EM PROGRAMAS DE RETROCRUZAMENTO ENVOLVENDO ESPÉCIES SILVESTRES E COMERCIAIS COM BASE EM MARCADORES RAPD

GENETIC VARIABILITY OF ELITE PASSIONFRUIT GENOTYPES FROM BACKCROSS BREEDING PROGRAM INVOLVING WILD AND COMMERCIAL SPECIES BASED ON RAPD MARKERS

Graciele BELLON¹; Fábio Gelape FALEIRO²; Nilton Tadeu Vilela JUNQUEIRA²; Elisiane FUHRMANN¹

1. Engenheiro Agrônoma, Doutoranda em agronomia/Bolsista CAPES - Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Brasil. gracibellon@yahoo.com.br; 2. Pesquisador da Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brasil.

RESUMO: O maracujazeiro azedo, *Passiflora edulis*, possui baixa variabilidade genética para resistência a doenças. Uma alternativa para aumentar a variabilidade é a utilização de espécies silvestres na base de cruzamentos do melhoramento genético de *passifloras*. Neste trabalho objetivou-se analisar a variabilidade genética de genótipos elite de maracujazeiro obtidos em programas de retrocruzamento envolvendo espécies silvestres e comerciais com base em marcadores moleculares RAPD. Foram analisados 32 genótipos de *Passiflora*. O DNA genômico de cada material foi extraído e nove iniciadores decâmeros foram utilizados para a obtenção dos marcadores moleculares via Reação em Cadeia da Polimerase. Foram realizadas análises de agrupamento via dendrograma e gráfico de dispersão. Foram obtidos 177 marcadores, dos quais 95% foram polimórficos. As distâncias genéticas entre os 32 genótipos variaram entre 0,035 e 0,562. Análises de agrupamento mostraram que os genótipos elite se agruparam com a espécie comercial utilizada como genitor recorrente. Os marcadores evidenciaram variabilidade genética entre os genótipos estudados e confirmaram a eficiência da recuperação do genoma recorrente dentro do programa de retrocruzamentos.

PALAVRAS - CHAVE: *Passiflora*. Melhoramento genético. Marcadores moleculares

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos mais importantes centros de diversidade do maracujá, pois muitas espécies silvestres de *Passiflora* são nativas, notadamente, no Centro-Norte do País (FERREIRA, 2005). Estima-se que mais de 130 espécies do gênero *Passiflora* sejam nativas do Brasil. Essa ampla diversidade de espécies é ponto de partida para programas de melhoramento do maracujazeiro. Estudos preliminares têm mostrado que existe pouca variabilidade genética entre as cultivares comerciais para a resistência a doenças (JUNQUEIRA et al., 2003, KUDO et al., 2012, LEÃO et al., 2006).

Para ampliar a base genética das variedades comerciais, espécies silvestres de maracujá têm sido utilizadas com sucesso em programas de melhoramento genético. Na Embrapa Cerrados, a transferência de genes de resistência de espécies silvestre para as comerciais tem sido realizada, por meio de hibridações interespecíficas seguidas de um programa de retrocruzamentos auxiliados por marcadores moleculares (FALEIRO et al., 2004, FALEIRO et al., 2008; FALEIRO; JUNQUEIRA, 2009, FONSECA et al., 2009).

Marcadores moleculares do DNA têm sido utilizados como uma ferramenta auxiliar nas diferentes etapas do melhoramento genético, desde a caracterização do germoplasma até as etapas finais de seleção de plantas melhoradas. O uso de marcadores moleculares é altamente viável, por permitir um rápido estudo da variabilidade presente, com a obtenção de um número ilimitado de polimorfismos genéticos sem influência do ambiente, bem como a detecção de tais polimorfismos em qualquer estágio do desenvolvimento da planta (FALEIRO, 2007).

Neste trabalho, objetivou-se avaliar a variabilidade genética de genótipos elite de maracujazeiro obtidos em programas de retrocruzamento envolvendo espécies silvestres e comerciais de maracujazeiro com base em marcadores RAPD para acompanhar a recuperação do genoma recorrente e quantificar a redução da variabilidade genética devido aos retrocruzamentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados, Planaltina- DF. Os genótipos

utilizados neste trabalho foram obtidos a partir do programa de melhoramento genético do maracujazeiro realizado pela Embrapa Cerrados visando obter variedades de maracujazeiro mais produtivas, com maior resistência a doenças e melhor qualidade físico-química dos frutos. Para o estudo da variabilidade genética, foram analisados

32 genótipos (matrizes) selecionados, sendo 25 de cruzamentos inter-específicos e 4 de cruzamentos intra-específicos e 3 espécies silvestres (*Passiflora edulis* Sims (acesso silvestre roxo), *Passiflora setacea* e *Passiflora caerulea*), utilizadas como progenitores na base dos cruzamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Genótipos de maracujazeiros resultantes do processo de retrocruzamento e espécies silvestres utilizadas no estudo de variabilidade genética e suas respectivas origens.

Ordem PCR	Genótipos (Matrizes)	Origem dos Genótipos (Matrizes)
1	<i>P. edulis</i> silvestre roxo	-
2	<i>P. setacea</i>	-
3	<i>P. caerulea</i>	-
4	EC4- 121	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
5	EC4- 124	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
6	EC4- 128	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
7	ES4- 138	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
8	EC5- 153	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)
9	ERE- 171	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "roxo" silvestre
10	BRS Gigante Amarelo- 211	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "flavicarpa"
11	EC4- 223	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
12	ES4- 238	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
13	ES4- 239	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
14	EC5- 255	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)
15	EC5- 257	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)
16	ES6- 265	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "flavicarpa"
17	ERE- 272	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "roxo" silvestre
18	BRS Gigante Amarelo- 315	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "flavicarpa"
19	EC4- 325	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
20	ES4- 331	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
21	EC5- 356	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)
22	ERE- 371	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "roxo" silvestre
23	ERE- 378	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "roxo" silvestre
24	ES4- 433	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC4)
25	EC5- 455	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)
26	EC5- 456	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)
27	EC5- 458	<i>P. caerulea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)
28	ES6- 468	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC6)
29	ERE- 476	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "roxo" silvestre
30	BRS Gigante Amarelo- 512	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "flavicarpa"
31	BRS Gigante Amarelo- 519	<i>P. edulis</i> "flavicarpa" x <i>P. edulis</i> "flavicarpa"
32	ES5- 546	<i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i> (RC5)

Folhas em estágio intermediário de maturação foram coletadas e o DNA genômico de cada genótipo foi extraído utilizando o método do CTAB, com modificações (FALEIRO et al., 2003), validado por Bellon et al. (2007a) para extração de DNA de diferentes espécies do gênero *Passiflora*.

Amostras de DNA de cada acesso foram amplificadas para a obtenção de marcadores RAPD. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 µL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 100 µM de cada um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP,

dGTP e dCTP), 0,4 µM de um *primer* (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima Taq polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Para obtenção dos marcadores RAPD foram utilizados 09 *primers* decâmeros: OPD (07, 10 e 16), OPF (01, 14), OPG (01 e 08), OPH (12 e 16). As amplificações foram efetuadas em termociclador programado para 40 ciclos, cada um constituído pela seguinte seqüência: 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 35 °C e 90 segundos a 72 °C. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de seis minutos a 72 °C, e

finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C. Após a amplificação, foram adicionados, a cada amostra, 3 µl de uma mistura de azul de bromofenol (0,25%) e glicerol (60%) em água. Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio, submerso em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 90 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta.

Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foram estimadas as distâncias genéticas entre os diferentes acessos, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e Li, utilizando-se o Programa Genes (CRUZ, 1997). A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar a análise de agrupamento, por meio de dendrograma com o auxílio do Programa Statistica (STAT SOFT INC, 1999), utilizando o método do UPGMA 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 (STAT SOFT INC, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os nove *primers* decâmeros geraram um total de 177 marcadores RAPD, perfazendo uma média de 19,6 marcadores por *primer*. Do total de marcadores, 95% foram polimórficos (Tabela 2). A alta média de marcadores por *primer* e a alta porcentagem de marcadores polimórficos evidenciam alta variabilidade genética interespecífica. Trabalhos realizados utilizando marcadores RAPD, relatam a alta variabilidade genética interespecífica no gênero *Passiflora* (PIO VIANA et al., 2003, FALEIRO et al., 2004, GANGA et al., 2004, JUNQUEIRA et al., 2006, BELLON et al., 2007b). As distâncias genéticas entre os 32 genótipos de *Passiflora* variaram entre 0,035 e 0,562. A menor distância, de 0,035, foi observada entre os genótipos 238 (*P. caerulea* x *P. edulis* Sims - RC4) e 239 (*P. caerulea* x *P. edulis* Sims - RC4) e a maior distância, de 0,562, observada entre os genótipos *P. edulis* Sims acesso roxo silvestre) e *P. setacea* (0,562). A proximidade genética entre os genótipos 238 e 239 já era esperada, considerando que se tratam de genótipos obtidos a partir do mesmo cruzamento base, estando na mesma geração de retrocruzamento. A maior distância obtida entre *P. edulis* Sims acesso roxo silvestre) e *P. setacea* também é compreensível, por se tratarem de espécies diferentes.

Tabela 2. *Primers* utilizados para obtenção dos marcadores RAPD para acessos de *Passiflora alata* e respectivos número de bandas polimórficas e monomórficas.

Primer	Seqüência	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas monomórficas
	5'→3'		
OPD-07	TTGGCACGGG	13	0
OPD-10	GGTCTACACC	32	0
OPD-16	AGGGCGTAAG	21	1
OPF-01	ACGGATCCTG	17	4
OPF-14	TGCTGCAGGT	14	0
OPG-01	CTACGGAGGA	12	1
OPG-08	TCACGTCCAC	21	2
OPH-12	ACGCGCATGT	13	1
OPH-16	TCTCAGCTGG	25	0
TOTAL		168	09

A análise de agrupamento e a dispersão gráfica (Figuras 1 e 2) realizadas com base na matriz de distâncias genéticas demonstram a separação das espécies silvestres *P. edulis* (acesso silvestre roxo), *P. setacea* e *P. caerulea*, que se localizam em pontos extremos do gráfico. Verifica-se a formação de um grande grupo contendo os híbridos inter-específicos, juntamente com os híbridos intra-específicos e a espécie *Passiflora edulis* Sims

cultivar “BRS Gigante Amarelo” que foi utilizado como genitor recorrente. Este agrupamento demonstra o êxito no processo de recuperação do genoma recorrente pelo programa de retrocruzamentos (Figura 1 e 2). Fonseca et al. (2009) também verificaram a eficiência dos marcadores RAPD para acompanhar e quantificar a recuperação do genoma recorrente de maracujazeiro em programas de retrocruzamento. Em relação às

espécies silvestres, verifica-se que *P. caerulea* é a espécie com maior similaridade genética em relação ao grande grupo formado pelos híbridos inter e intra-específicos. Isso pode ser explicado pela transferência de genes da espécie *Passiflora caerulea* relacionados à resistência à bacteriose e coloração de polpa mais intensa (avermelhada) para os genótipos onde a espécie participa do cruzamento base. A resistência à bacteriose e coloração de polpa mais avermelhada foram utilizados como principais critérios de seleção dos genótipos elite no programa de retrocruzamento.

No grande grupo formado pelos genótipos elite e pelo genitor recorrente, verifica-se a

formação de pelo menos três subgrupos de similaridade genética (Figura 1). O primeiro subgrupo é formado pelos genótipos EC4-121 e EC5-455, o segundo pelos genótipos EC4-124, EC4-128, ES4-138, EC5-153 e EC5-255 e o terceiro pelos demais genótipos. O genótipo BRS Gigante Amarelo-519 formou um subgrupo isolado dos demais genótipos. Estes genótipos elite com maior variabilidade genética entre si são promissores para manter a variabilidade genética nos próximos ciclos de seleção recorrente e futuro desenvolvimento de híbridos intravarietais.

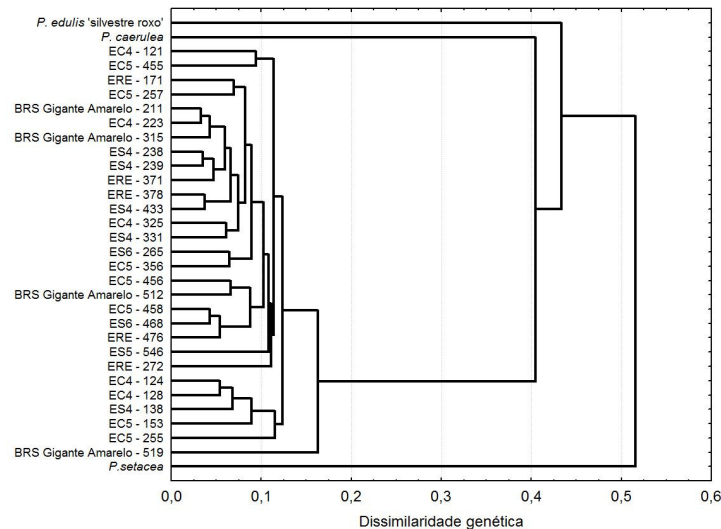


Figura 1. Análise de agrupamento de 32 genótipos de maracujazeiro com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 177 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

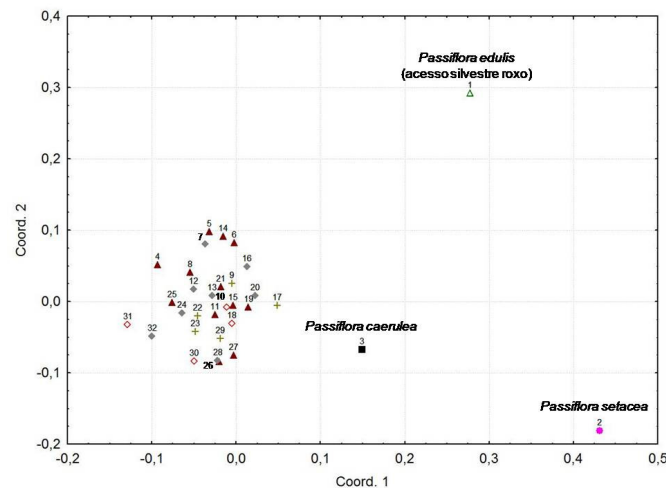


Figura 2. Dispersão gráfica de 32 genótipos de maracujazeiro com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 177 marcadores RAPD. Os números correspondem aos acessos da Tabela 1. Números representados pelas formas: \diamond (Genótipos de *Passiflora edulis* Sims cultivar 'BRS Gigante Amarelo' utilizado como genitor recorrente) \blacktriangle (Genótipos de retrocruzamentos originados de *Passiflora edulis* x *Passiflora setacea*), \blacklozenge (Genótipos de retrocruzamentos originados de *Passiflora edulis* x *Passiflora caerulea*), $+$ (Genótipos de retrocruzamentos originados *Passiflora edulis* flavicarpa x *Passiflora edulis* "roxo silvestre").

CONCLUSÕES

Verificou-se a variabilidade genética dos genótipos elite, obtidos por cruzamentos interespecíficos e intraespecíficos.

Foi possível a quantificação e a confirmação da recuperação do genoma recorrente (*P. edulis*) em genótipos elite dentro do programa de retrocruzamentos com base em marcadores RAPD.

ABSTRACT:The passion fruit, *Passiflora edulis*, has low genetic variability for disease resistance. An alternative for increase the variability have been the use of wild species in crosses with elite cultivars in genetic breeding programs. The objective of this work was to analyze the genetic variability of elite genotypes of passion fruit obtained in backcross programs involving wild and commercial species based on RAPD markers. We analyzed 32 genotypes of *Passiflora*. Genomic DNA was extracted from each material and nine decamer primers were used to obtain the molecular markers via the Polymerase Chain Reaction. Analyses of clustering dendrogram and scatter plot were performed. We obtained 177 markers, of which 95% were polymorphic. The genetic distances between the 32 genotypes ranged between 0.035 and 0.562. Cluster analysis showed that the elite genotypes were grouped with the commercial cultivars used as recurrent parent. The markers showed genetic variability among genotypes and confirmed the efficiency of recurrent genome recovery within the backcrossing program.

KEYWORDS: *Passiflora*, genetic improvement, molecular markers

REFERÊNCIAS

- BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; FERREIRA, C. F.; KARIA, C. T.; FONSECA, K. G.; SANTOS, E. C.; SANTOS, J. R. P.; TEIXEIRA, M. A.; JUNQUEIRA, K. P. **Validação e otimização de protocolo simplificado para extração de DNA a partir de tecido foliar.** In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas,4, São Lourenço. Melhoramento de plantas e agronegócio: anais. São Lourenço: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2007(a). 1 CD-ROM.
- BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SANTOS, E. C.; 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**, v. 29, n. 1, p. 124-127, 2007(b).
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: Aplicativo computacional em genética e estatística.** Viçosa, MG, UFV. 1997. 442 p.
- FALEIRO, F.; **Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina –DF: Embrapa Cerrados, 2007, 102 p.
- 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. **Comunicado Técnico N°92.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003.6p.
- 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 múltipla a doenças com base em marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Suplemento, Brasília, v. 29, p. 325, 2004.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. Caracterização de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares: resultados de pesquisa 2005-2008. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, N° 207. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. 59 p.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Passion fruit (*Passiflora* spp.) improvement using wild species.** In: MARIANTE, A. da S.; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (Ed.). The state of Brazil's plant genetic resources: second national report: conservation and sustainable utilization for food and agriculture. Brasília, DF: Embrapa Technological Information: Embrapa Genetic Resources and Biotechnology : Brasília, DF. 2009. Chaper 5. p. 101-106.

FERREIRA, F. R. Recursos genéticos de Passiflora. In: Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Braga, M. F. (Eds.) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina,DF: **Embrapa Cerrados**, 2005. Capítulo 2. p. 41-51.

FONSECA, K. G. DA.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R, JUNQUEIRA, N. T. V, SILVA, M. S, BELLON, G.; JUNQUEIRA, K. P, VAZ, C. F. Análise da recuperação do genitor recorrente em maracujazeiro-azedo por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 145-153, 2009.

GANGA, M. D. R.; RUGGIERO, C.; LEMOS, E. G. de M.; GRILI, V. G.; GONÇALVES, M. M.; CHAGAS, E. A; WICKERT, E. Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 26, p. 494-498, 2004.

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, anais. Cabo Frio, RJ, 2006, p.384.

JUNQUEIRA, N. T. V.; ANJOS, J. R. N.; SILVA. A. P. O.; CHAVES, R. C.; GOMES, A. C. Reação às doenças e produtividade de onze cultivares de maracujá-azedo cultivadas sem agrotóxico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 8, p. 1005-1010, 2003.

KUDO, A. S; PEIXOTO, J. R; JUNQUEIRA, N. T. V.; BLUM, L. E. B. Suscetibilidade de genótipos de maracujazeiro-azedo à septoriose em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 1, p 200-205. 2012.

LEÃO, R. M. K., PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, N. T. V.; RESENDE, R de O.; MATTOS, J. K. de A.; MELO, B. Reação de progênies de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (Cowpea aphidborne mosaic virus - CABMV) em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 22, n. 3, p. 87-92, 2006.

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, 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 Ecast 14th Street, Tulsa. 1999.