



ESTUDOS PRELIMINARES SOBRE A ORIGEM GENÉTICA DE *Passiflora nitida* Kunth. “MANAUS 2” COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES

Keize Pereira Junqueira¹, Fábio Gelape Faleiro¹, Graciele Bellon¹, Nilton Tadeu Vilela Junqueira¹, Kênia Gracielle da Fonseca¹, Erivanda Carvalho Santos¹, Marcelo Fideles Braga¹, Luciana Sobral de Souza¹, José Darlan Ramos² (¹Embrapa Cerrados, BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223, 73010-970 Planaltina, DF. ²Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3032, 37200-000. e-mail: keize@cpac.embrapa.br). Auxílio financeiro: CAPES, CNPq

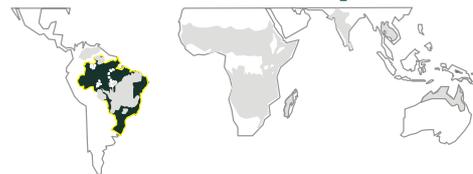
Termos para indexação: maracujazeiro, maracujá-suspiro, germoplasma, RAPD, recursos genéticos.

Introdução

Os vários acessos de *Passiflora nitida* Kunth. dispersos pelo Brasil, principalmente no Bioma Cerrado, possuem características físicas, agrônômicas e moleculares bastante peculiares. González (1996) e Oliveira & Ruggiero (2005) já haviam relatado que, dentro do gênero *Passiflora*, as espécies apresentam algumas diferenças fisiológicas, até mesmo entre plantas da mesma espécie, sendo que essas características podem sofrer influência das condições climáticas do local de cultivo.

O estudo da variabilidade genética em acessos de *Passiflora nitida* realizado por Junqueira et al. (2007) permitiu observar grande base genética na espécie e forte tendência de agrupamento baseada na origem geográfica dos acessos. Entretanto, os autores observaram grande distanciamento genético do acesso *P. nitida* “Manaus 2”, que apresentou distâncias em relação aos outros acessos de *P. nitida* variando de 0,351 a 0,416, enquanto os outros acessos de mesma origem geográfica apresentaram distâncias de 0,146 a 0,285 em relação aos demais. Por outro lado, considerando-se as distâncias genéticas de *P. nitida* “Manaus 2” relativas aos “outgroups” *P. edulis* e *P. alata*, estas foram 0,515 e 0,405, respectivamente.

O acesso em questão foi coletado em Manaus, AM, como *P. nitida* por apresentar padrão de folhas e hábito de crescimento muito semelhantes a esta espécie. Assim, apesar de, morfológicamente, ser parecido com os acessos de *P. nitida* procedentes de Manaus, AM, chama a atenção o grande distanciamento genético deste material em relação aos demais. Objetivou-se estudar a origem genética do acesso *P. nitida* “Manaus 2” utilizando-se marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).



Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados, em Planaltina, DF. Foi analisado o acesso *P. nitida* "Manaus 2", estudando-se a similaridade genética apresentada em relação a *P. nitida* "Manaus 1", *P. laurifolia*, *P. alata*, *P. coccinea* e *P. glandulosa* (Tabela 1), todos mantidos no banco de germoplasma da Embrapa Cerrados. As referidas espécies foram escolhidas por possuírem relatos de ocorrência no estado do Amazonas.

TABELA 1. Espécies de maracujazeiro analisadas e respectivos acessos (locais de coleta) e códigos do Banco de Germoplasma da Embrapa Cerrados.

Nº	Espécie	Acesso	UF	Código
1	<i>Passiflora nitida</i> Kunth.	"Manaus 2" (Distrito Agropecuário)	AM	CPAC MJ-01-16
2	<i>Passiflora nitida</i> Kunth.	"Manaus 1" (Rio Urubu)	AM	CPAC MJ-01-15
3	<i>Passiflora laurifolia</i> L.	"Picos"	PI	CPAC MJ-03-01
4	<i>Passiflora alata</i> Curtis	"Alto Paraíso"	GO	CPAC MJ-02-13
5	<i>Passiflora coccinea</i> Aubl.	"Manaus"	AM	CPAC MJ-08-03
6	<i>Passiflora glandulosa</i> Cav.	"Igarapé-Açu"	PA	CPAC MJ-05-01

Folhas em estágio intermediário de maturação foram coletadas e o DNA genômico extraído utilizando-se o método do CTAB, com algumas modificações (Faleiro et al., 2003).

Amostras de DNA de cada material genético 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 desoxirribonucleotídios (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. Foram utilizados 12 *primers* decâmeros: OPD (04 e 07), OPE (18 e 20), OPF (17 e 20), OPG (05, 09, 17) e OPH (04, 12 e 19).

As ampliações 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 & Li (1979), utilizando-se o Programa Genes (Cruz, 1997). A matriz de distâncias genéticas foi utilizada para realizar análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando-se o método do UPGMA (*Unweighted pair-group arithmetic average*) como critério de agrupamento, com auxílio do Programa Statistica (Statsoft, 1999).

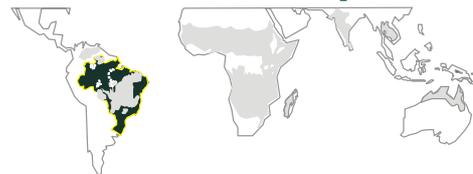
Resultados e Discussão

Os 12 *primers* decâmeros geraram um total de 191 marcadores RAPD, perfazendo a média de 15,92 marcadores por *primer*. Houve grande número de bandas polimórficas (98,95%), o que já era esperado, devido à grande diversidade do gênero *Passiflora*.

Analisando-se cada acesso em relação a *P. nitida* “Manaus 2”, observa-se uma maior frequência de bandas monomórficas em relação ao acesso *P. nitida* “Manaus 1” (68,54%), conforme exposto na Tabela 2. Esse resultado confirma a proximidade genética, embora não muito expressiva, entre os dois materiais, fato este que, aliado às similaridades morfológicas, justifica o material em questão ter sido coletado como *P. nitida*.

TABELA 2. Frequência de bandas monomórficas e polimórficas de 5 espécies de *Passiflora* em relação a *P. nitida* “Manaus 2”.

Espécie	Nº de bandas polimórficas	Nº de bandas monomórficas	% de bandas monomórficas
<i>P. nitida</i> “Manaus 1”	28	61	68,54%
<i>P. laurifolia</i>	38	72	65,46%
<i>P. alata</i>	35	65	65,00%
<i>P. coccinea</i>	52	43	45,26%
<i>P. glandulosa</i>	34	40	54,05%



Considerando-se a análise de agrupamento realizada com base nas distâncias genéticas, pode-se subdividir os 6 acessos em, pelo menos, 2 grupos de similaridade genética a uma distância genética relativa de 0,6 (Figura 1). No primeiro grupo, encontram-se *P. nitida* “Manaus 1”, *P. nitida* “Manaus 2”, *P. laurifolia* e *P. alata*. As espécies *P. coccinea* e *P. glandulosa* formaram o outro grupo.

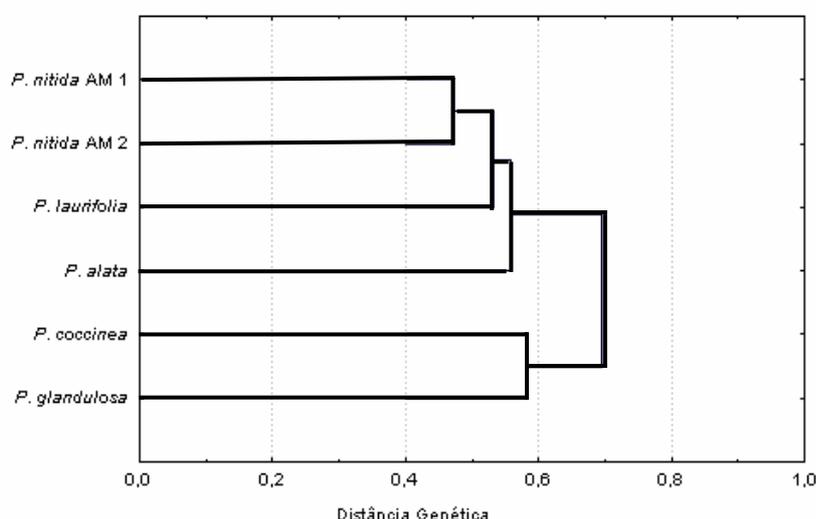


FIGURA 1. Análise de agrupamento de 6 acessos de maracujazeiro com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 191 marcadores RAPD. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento.

Considerando apenas as distâncias genéticas em relação a *P. nitida* “Manaus 2”, os menores valores foram observados com *P. nitida* “Manaus 1” (0,472), *P. alata* (0,514) e *P. laurifolia* (0,549). Tendo em vista toda a base genética já estudada do gênero *Passiflora*, os valores em relação a *P. nitida* “Manaus 1” encontram-se muito altos para acessos de mesma espécie. Assim, no presente estudo, apesar do menor valor de distância genética encontrado ser entre *P. nitida* “Manaus 2” e *P. nitida* “Manaus 1”, a classificação taxonômica inicial deste primeiro acesso como pertencente à espécie *Passiflora nitida* Kunth. pode não estar correta.

Entretanto, alguns autores têm encontrado distâncias genéticas intra-específicas semelhantes àquela observada entre *P. nitida* “Manaus 1” e *P. nitida* “Manaus 2”, especialmente quando se comparam acessos comerciais e silvestres. Faleiro et al. (2005), estudando acessos comerciais e um



acesso nativo de *P. edulis* f. *flavicarpa*, também verificaram altas distâncias genéticas entre o acesso nativo e os comerciais “Gigante Amarelo” e “EC-3-0”, com valores de 0,473 e 0,474, respectivamente. Nesse aspecto, *P. nitida* “Manaus 2” poderia constituir um acesso de *P. nitida* mais distante geneticamente.

Por outro lado, no trabalho de Junqueira et al. (2007), desconsiderando-se o acesso *P. nitida* “Manaus 2”, a distância genética máxima observada nos acessos de *P. nitida* foi de 0,313, encontrada entre os acessos *P. nitida* “Itiquira 1” e *P. nitida* “Natividade” (Comunidade do Brejão).

Um fato que também deve ser considerado é a possibilidade de *P. nitida* “Manaus 2” ser produto de hibridação interespecífica envolvendo *P. nitida* “Manaus 1” e outra espécie de mesma ocorrência geográfica. Nesta hipótese e considerando as espécies estudadas no presente trabalho, haveria chance do outro genitor ser *P. alata* ou *P. laurifolia*, levando-se em consideração as distâncias genéticas e o agrupamento no dendrograma. Entretanto, estas são apenas suposições, tendo em vista que, para a confirmação da fecundação cruzada, seria imprescindível conhecer cada provável indivíduo progenitor. Deve-se considerar também que, por indisponibilidade de material no Banco de Germoplasma da Embrapa Cerrados, alguns acessos utilizados na presente pesquisa não são procedentes do estado do Amazonas e, segundo os dados de Junqueira et al. (2007), há grande variabilidade intra-específica entre acessos de diferentes regiões geográficas. Assim, supondo ser *P. nitida* “Manaus 2” um híbrido natural, estudos mais apurados devem ser realizados.

Rejeitando-se as hipóteses anteriores, *P. nitida* “Manaus 2” pode constituir-se em uma nova espécie. Para tanto, estudos mais aprofundados de taxonomia devem ser conduzidos.

Conclusões

O acesso *Passiflora nitida* “Manaus 2” apresenta maior similaridade genética com as espécies *Passiflora nitida* “Manaus 1”, *P. laurifolia* e *P. alata*. Entretanto, em virtude dos elevados valores de distância genética e considerando-se a base genética já estudada do gênero, *P. nitida* “Manaus 2” pode tratar-se de um acesso resultante de hibridação interespecífica natural ou pode ser uma nova espécie. No entanto, não deve ser descartada a possibilidade desse material constituir um acesso de *P. nitida*, considerando a existência de grande variabilidade genética intra-específica.

Referências bibliográficas

JUNQUEIRA, K.P.; FALEIRO, F.G.; RAMOS, J.D.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.29, no.3, p.571-575.

CRUZ, C. D. **Programa genes**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV. 1997. 442 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**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 6 p. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 92).

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; BELLON, G.; PEIXOTO, J. R. Diversidade genética variedades comerciais de maracujazeiro-azedo com base em marcadores RAPD. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISAS EM MARACUJAZEIRO, 4., 2005, Planaltina, DF. **Quarta...** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 105-109.

GONZÁLEZ, A. **Biología floral e caracterização físico-química dos frutos de dois acessos de *Passiflora cincinata* Mast. nas condições de Jaboticabal**. 1996. 80 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 76, n, 10, p. 5269-5273, 1979.

OLIVEIRA, J. C. de; RUGGIERO, C. Espécies de maracujá com potencial agrônômico. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 143-158.

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