



RETROCRUZAMENTOS VISANDO À OBTENÇÃO DE RESISTÊNCIA DO MARACUJAZEIRO-AZEDO À VIROSE DO ENDURECIMENTO DOS FRUTOS, AUXILIADOS POR MARCADORES MOLECULARES

Kenia Gracielle da Fonseca¹, Fábio Gelape Faleiro¹, Nilton Tadeu Vilela Junqueira¹, José Ricardo Peixoto², Graciele Bellon¹, Carolina de Faria Vaz¹, Erivanda Carvalho dos Santos¹, João Batista dos Santos¹ (¹Embrapa Cerrados, BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223, 73010-970 Planaltina, DF. e-mail: kenia.fonseca@cpac.embrapa.br ²Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, 70910-900 Brasília, DF) (Apoio financeiro: CNPq)

Termos para indexação: *P.edulis*, *P.setacea*, retrocruzamentos, virose, marcadores moleculares.

Introdução

Na região do Cerrado, a cultura do maracujazeiro apresenta produtividade crescente nos últimos anos, entretanto, a média nacional ainda é considerada baixa quando analisado seu potencial produtivo, principalmente em condições experimentais. A baixa produtividade é provocada por vários fatores, entre eles o fitossanitário, especialmente a suscetibilidade a doenças causadas por vírus (Anjos et al., 2001).

Espécies silvestres de maracujá são alternativas para a ampliação da base genética da resistência, entretanto, trabalhos de melhoramento genético são necessários para combinar a resistência com características de produtividade e qualidade de frutos. A transferência de genes de resistência de espécies silvestres para as comerciais tem sido feita, na Embrapa Cerrados, por meio de hibridações interespecíficas seguidas de um programa de retrocruzamentos auxiliados por marcadores moleculares (Faleiro et al., 2004a, Faleiro et al., 2004b).

Neste trabalho, objetivou-se obter e caracterizar plantas RC4 e RC5 quanto à resistência à virose do endurecimento dos frutos e quanto à recuperação do genoma recorrente com base em marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

Material e Métodos



Foram realizadas duas avaliações de severidade de virose do endurecimento dos frutos nas plantas da quarta e quinta geração de retrocruzamentos (RC4 e RC5) em condições de campo e a caracterização dessas plantas e de seus respectivos genitores recorrente e resistente (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e *Passiflora setacea*) foi realizada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Cerrados, Planaltina-DF.

As avaliações de virose foram realizadas em novembro de 2006 (quando as plantas tinham 18 meses de idade) e janeiro de 2007 nas plantas RC4 e em setembro (quando as plantas tinham 8 meses de idade) e novembro de 2007 nas plantas RC5.

Na primeira avaliação da geração RC4 foram avaliadas 47 plantas e na segunda, o número de plantas avaliadas reduziu para 45. Em setembro de 2007 foram avaliadas 40 plantas RC5 e em novembro de 2007 foram avaliadas 39 plantas. O número de plantas reduziu porque algumas morreram durante a execução do experimento.

Para a avaliação da severidade de virose, coletou-se, ao acaso, dez folhas em desenvolvimento de brotações novas de cada planta RC4 e RC5. Além das plantas RCs, foram avaliadas três plantas do genitor recorrente e três plantas do genitor resistente. Atribuiu-se notas de 1 a 4 para cada folha, sendo 1 = sem sintoma de mosaico; 2 = mosaico leve e sem deformações foliares; 3 = mosaico intenso e sem deformações foliares e 4 = mosaico severo, bolhas e deformações foliares. Para cada planta RC foi calculada uma média das 10 folhas avaliadas.

Com base na resistência à virose do endurecimento dos frutos das plantas RC4 e RC5, realizou-se a caracterização dessas plantas utilizando marcadores RAPD.

Foram selecionadas 17 plantas RC4 de uma população original de 59 plantas e 16 plantas RC5 de uma população de 40 plantas. As plantas RC4, RC5 e seus genitores (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e *Passiflora setacea*) foram caracterizadas com base nos marcadores moleculares. Folhas em estágio intermediário de maturação de cada material genético foram coletadas e o DNA genômico foi extraído a partir do método CTAB modificado (Faleiro et al., 2003) e validado por Bellon et al. (2007). A concentração e a quantidade do DNA foram estimadas por



12 a 17 de outubro de 2008
ParlaMundi, Brasília, DF



espectrofotometria a 260 nm (Sambrook et al., 1989) e a relação A260/A280 utilizada para avaliar a pureza e qualidade do DNA extraído.

Amostras de DNA de cada material genético foram amplificadas para obtenção de marcadores RAPD. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 13 uL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 100 uM de cada um dos desoxiribonucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,4 uM de um *primer* (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), uma unidade da enzima *Taq* polimerase e, aproximadamente, 15 ng de DNA. Foram utilizados os *primers* decâmeros OPD (02), OPE (09, 16 e 18), OPF (14 e 17), OPG (05 e 17) e OPH (08, 14, 16 e 17) para as plantas RC4 e OPD (02 e 19), OPE (09 e 16), OPF (17, 18 e 20), OPG (03, e 15) e OPH (04, 08, 14 e 17) para as plantas RC5.

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, adicionou-se a cada amostra, 3 ul 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 estimou-se as distâncias genéticas entre as diferentes plantas RC e os genitores recorrente e resistente, com base no complemento do coeficiente de similaridade de Nei e 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, 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).

Resultados e Discussão

Na primeira avaliação da severidade de virose do endurecimento dos frutos nas plantas RC4 (novembro de 2006) verificou-se a alta susceptibilidade do genitor recorrente (nota média de 3,9) e das plantas RC4 (nota média de 3,7) e a resistência do genitor *P. setacea* (nota média de 1,7). Na segunda avaliação (janeiro de 2007) confirmou-se os resultados da primeira avaliação. O genitor recorrente e as plantas da quarta geração de retrocruzamentos (RC4) apresentaram a mesma nota média obtida na primeira avaliação e a espécie *P. setacea* apresentou a nota média 1,6.

Na primeira avaliação da virose nas plantas RC5 (setembro de 2007), o genitor recorrente apresentou a média de 2,7; o genitor resistente 1,4 e as plantas RC5 2,0. Na segunda avaliação dessas plantas (novembro de 2007), as plantas *P. edulis* apresentaram a média 3,1; a espécie *P. setacea* apresentou a média 1,3 e as plantas RC5 2,7.

Esses resultados confirmam os resultados obtidos nas avaliações das plantas RC4, demonstrando a alta susceptibilidade das plantas *P. edulis* à virose do endurecimento dos frutos, a resistência da espécie *P. setacea* e a semelhança das plantas RCs com o genitor recorrente.

A partir da avaliação da severidade de virose e também com base na produção de frutos, selecionou-se plantas RC4 e RC5 menos susceptíveis à virose para a extração do DNA genômico.

Na caracterização das plantas RC4, foram gerados 146 marcadores RAPD, a partir dos 12 *primers* decâmeros, obtendo-se a média de 12,2 marcadores por *primer*. Do total de marcadores, 117 (80,14 %) foram polimórficos.

Os 14 *primers* decâmeros utilizados na caracterização das plantas RC5 geraram o total de 120 marcadores RAPD, perfazendo uma média de 8,6 marcadores por *primer*. Dos 120 marcadores, 86 (71,7 %) foram polimórficos. O elevado polimorfismo pode ser explicado pela diferença genética da população RC em relação ao genitor resistente (*P. setacea*). A origem das

plantas RCs de um cruzamento base interespecífico também explica a alta porcentagem de marcadores polimórficos.

As distâncias genéticas entre as plantas RC4 e seus genitores variaram entre 0,38 e 0,91 e entre as plantas RC5 e seus genitores variaram entre 0,33 e 0,96. O menor valor de similaridade foi observado entre as espécies *P. edulis* e *P. setacea* (genitores da geração RC), evidenciando a grande distância genética dessas variedades comercial e silvestre, respectivamente.

A média de recuperação do genitor recorrente GA-2 foi de 84,4% nas plantas RC4 e de 92,19% nas plantas RC5.

Verificou-se, na análise de agrupamento (Figuras 1) e gráficos de dispersão (Figura 2), a formação de um grupo contendo as plantas RCs e o genitor recorrente e outro grupo formado pela espécie *P. setacea* (genitor resistente), o que demonstra o processo de recuperação do genoma recorrente pelo programa de retrocruzamentos.

Comparando as duas gerações de retrocruzamento (RC4 e RC5), observa-se que a distância genética dentro do grupo das plantas RC4 é maior que a distância dentro do grupo RC5, o que era esperado considerando o sucesso da recuperação do genoma recorrente, dentro do programa de retrocruzamentos.

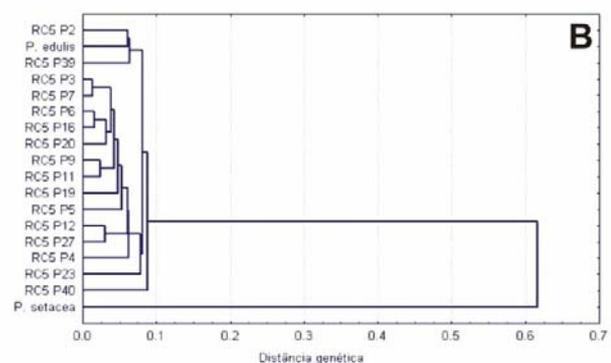
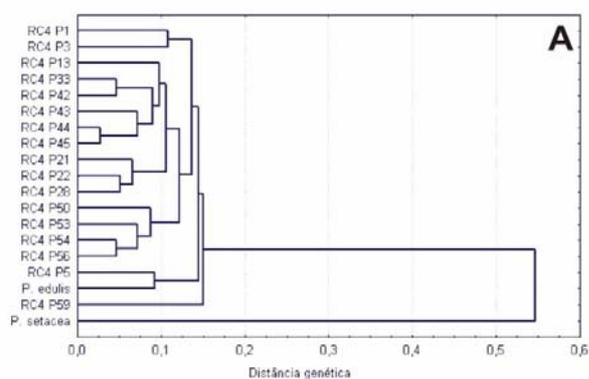


Figura 1. Análise de agrupamento de 17 plantas RC4 (A) e 16 plantas RC5 (B) e seus genitores *Passiflora edulis* e *P. setacea*, com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 146 e 120 marcadores RAPD, respectivamente. O método do UPGMA foi utilizado como critério de agrupamento. Embrapa Cerrados/2007.

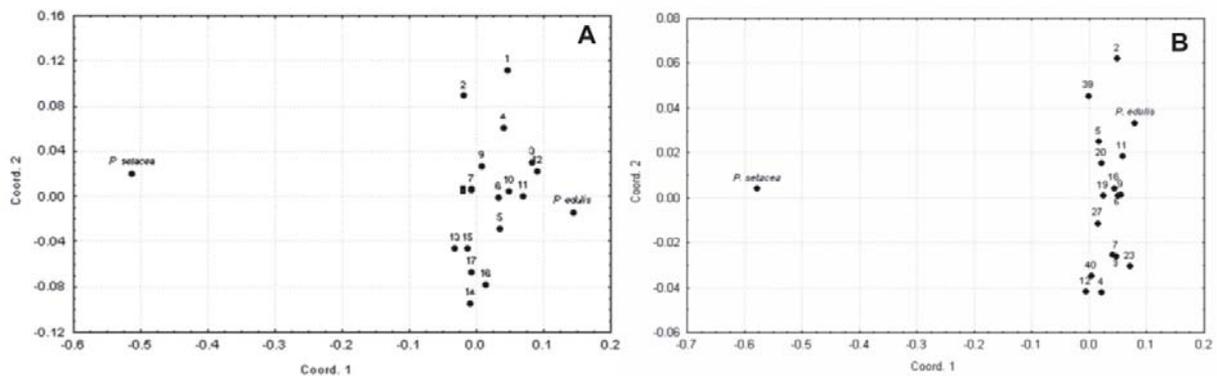


Figura 2. Dispersão gráfica de 17 plantas RC4 (A) e 16 plantas RC5 (B) e seus genitores *Passiflora edulis* e *P. setacea* com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 146 e 120 marcadores RAPD, respectivamente. Embrapa Cerrados/2007.

Conclusões

A severidade da virose do endurecimento dos frutos nas populações RC4 e RC5 avaliadas em condições de campo foi muito próxima da severidade verificada no genitor recorrente, embora algumas plantas tenham se destacado como menos suscetíveis.

A utilização de marcadores RAPD possibilitou a caracterização molecular das plantas RC4 e RC5 quantificando a recuperação do genoma recorrente e evidenciando a elevada distância genética entre os genitores do cruzamento base interespecífico.

Referências Bibliográficas

ANJOS, J.R.N. dos; JUNQUEIRA, N.T.V.; CHARCHAR, M.J.A. **Incidência e distribuição do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro no cerrado do Brasil central.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2001. 17p.



Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais

12 a 17 de outubro de 2008
ParlaMundi, Brasília, DF



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: 4º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2007, São Lourenço- MG. 2007.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística.** Viçosa: UFV, 1997. 442p.

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 No.92) 6p.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BELLON, G.; KRALH, L.L.; ANJOS, J.R.N.; PEIXOTO, J.R.; BRAGA, M.F.; REZENDE, A.M. **Utilização de marcadores moleculares em retrocruzamentos visando a resistência do maracujazeiro-azedo a múltiplas doenças.** In: Fitopatologia brasileira v. 29, (suplemento), XXXVI CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA. Resumos... Pág. S325. 2004a.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; MOREIRA, M.A. & BARROS, E.G. **Use of molecular markers to accelerate the breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose.** Euphytica, 138: 213-218. 2004b.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2ed. New York: Cold Spring Harbor. 653p.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT user's guide.** Version 6, 4 ed. SAS Institute, North Caroline, Cary, 1989.

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