

Marcadores Microssatélites Aplicados ao Melhoramento Intrapopulacional do Maracujazeiro Azedo

Brenda Neves Porto⁽¹⁾, Ana Maria Cruz e Oliveira⁽¹⁾, Ronaldo Viana dos Reis⁽¹⁾, Alexandre Pio Viana⁽²⁾, Eder Jorge de Oliveira⁽³⁾ e Aluízio Borem de Oliveira⁽¹⁾

Resumo

O objetivo desse trabalho foi selecionar indivíduos mais divergentes, dentre as 39 progênies selecionadas, das 140 progênies referentes ao segundo ciclo de seleção recorrente do maracujazeiro azedo, no intuito de indicar os 25 genótipos mais divergentes para comporem o próximo ciclo de seleção recorrente, com base em características agronômicas e em marcadores moleculares SSR. Os dados agronômicos foram analisados pelo programa *Darvin 5.0*, utilizando-se a distância de Manhattan. Para os dados moleculares, a matriz de distância foi calculada pelo aplicativo computacional Genes, sendo utilizado o Índice Ponderado. Posteriormente, foi realizado o agrupamento hierárquico UPGMA e sua correlação cofenética utilizando o programa computacional R. Dos 25 genótipos selecionados utilizando os dados agronômicos e os moleculares, 60% destes são coincidentes. Observou-se relativa distancia dos 25 genótipos selecionados em cada uma das análises que utilizaram os dados agronômicos e moleculares, o que é importante para o processo de seleção, isto porque, além de manter a variabilidade da população, os genótipos selecionados apresentam alto potencial agronômico. Os resultados observados indicam os genótipos mais produtivos e divergentes para dar continuidade ao programa de seleção recorrente do maracujazeiro.

Introdução

O Brasil é terceiro maior produtor mundial de frutas, perdendo somente para China e Índia. Dentro desse cenário, estimativas do IBGE (2008) apontam o Brasil como o maior produtor e consumidor mundial de maracujá azedo (*Passiflora edulis Sims*), sendo produzido no país em torno de 650 mil toneladas, apesar do destaque da produção brasileira, a produtividade nacional ainda é muito baixa.

Stenzel & Sera (1999) relataram que, do ponto de vista do sistema de produção, a falta de variedades melhoradas constitui um entrave à produção de frutos homogêneos e de qualidade. Nesse sentido, o melhoramento do maracujazeiro constitui-se num campo de pesquisa promissor.

A seleção dos genótipos superiores se faz, regra geral, mediante a avaliação agronômica, porém, com o advento dos marcadores moleculares, a tendência dos programas de melhoramento genético é integrar as informações obtidas com base nas técnicas clássicas com as técnicas dos marcadores moleculares. Segundo Vieira et al. (2005), a dissimilaridade genética estimada, por meio de marcadores moleculares, quando acompanhadas de informações fenotípicas, fornece informações importantes para as seleções de genótipos superiores.

Nesse sentido objetivou-se, no presente trabalho, selecionar indivíduos mais divergentes, dentre as 39 progênies selecionadas, das 140 progênies referentes ao segundo ciclo de seleção recorrente do maracujazeiro azedo, utilizando dados agronômicos, moleculares e análise conjunta desses dados.

Material e Métodos

Foram avaliadas 39 progênies que foram selecionadas utilizando índice de seleção das 140 progênies referentes ao segundo ciclo de seleção recorrente, denominada Maracujá Amarelo ciclo 1 (MA₁), do trabalho conduzido por Silva (2009).

Avaliou-se 11 características agronômicas, a saber: número de dias para o florescimento (DF); peso de fruto (PF); comprimento de fruto (CF); largura de fruto (LF); número total de frutos (NF); produção total (PT); peso médio de fruto (PMF); espessura de casca (EC); teor de sólidos solúveis totais (SS); cor da polpa (CP) e peso da polpa (PP), de acordo com Silva (2009).

O DNA genômico total foi extraído de folhas dos 39 genótipos de maracujazeiro do segundo ciclo de seleção recorrente (MA₁), empregando-se o procedimento adaptado de Doyle & Doyle (1990).

¹ Universidade Federal de Viçosa, brenda.bio@gmail.com

² Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

³ Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.

Foram utilizados 12 iniciadores microsatélites pertencentes à série PE (*Passiflora edulis* Sims), desenvolvidos por Oliveira (2006) (Tabela 1). As reações de amplificação foram realizadas, conforme descrito por Oliveira (2006), com pequenas modificações ajustadas para cada *mix*, os produtos da amplificação foram corados com nitrato de prata para visualização dos alelos, utilizando-se o método de Creste et al. (2001).

Tabela 1. Locos microsatélites (SSR), sequência dos iniciadores, motivo, tamanho esperado do alelo (pb), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e temperatura de anelamento (TA) dos iniciadores.

Loco	Iniciador <i>forward</i>	Iniciador <i>reverse</i>	Motivo	Alelo (pb)	PIC	TA
PE74	ccctcttcaatagcgttgg	gcacgagcagcagatattatt	(ATCACA) ₅	215	0.3346	TD56
PE38	gatcggctcctcggttagac	agtcacacagcatgagaaatc	(TG) ₈	215	0.2392	TD56
PE58	gcaattccaccatcttctgct	ccacggctcatggatgttc	(AC) ₁₁	243	0.0963	TD60
PE11	gcataagtgtcggctcttgg	cctcgaacctctatcatcca	(GT) ₁₁	178	0.3006	TD60
PE04	atgcttttgaaatccgttt	tgctcatgcaaagtcactgg	(TG) ₉	235	0.0487	TD60
PE24	tcaaactgaactcgtaaagg	gtgctgggagactgatgtt	(CA) ₁₅	294	0.1985	TD60
PE66	ccatagtccaacaagcatc	gctgtggaccctaactcagtc	(AC) ₉	165	0.4975	TD60
PE90	tcaggaagattgcatgtagt	ctgggtttgtttatgttgc	(AGC) ₅	245	0.0487	TD60
PE18	ccgtgaaccaaccatttctc	ttgcagcacaacaagtaa	(TG) ₉	220	0.0926	TD60
PE20	aggatcaccatagaaaacat	gtaggttgccattgctctt	(AAAC) ₄	242	0.0487	TD60
PE42	gtcacttcattcttcttcc	ttagccactcaaacacaa	(GT) ₈	216	0.0250	TD60
PE75	cacaatcgggtgggaaagata	gtagtgttgggcagtttgc	(TG) ₁₇	178	0.1671	60

Os dados agronômicos foram analisados pelo programa Darwin 5.0 (Perrier & Bonnot, 2003), utilizando a distância de Manhattan para indicar a variabilidade dos genótipos avaliados, para os dados moleculares, a matriz de distância foi calculada pelo aplicativo computacional GENES (Cruz, 2006).

Posteriormente, foi realizado o agrupamento hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average*) e sua correlação cofenética, para as matrizes das distâncias de *Manhattan* e índice ponderado, utilizando o programa computacional R (www.r-project.org).

Resultados e Discussão

Com base nos dados agronômicos e moleculares foram selecionados os 25 genótipos mais divergentes, sendo que 60% destes são coincidentes (14, 42, 112, 64, 44, 68, 46, 25, 57, 19, 23, 144, 135, 48 e 122), (Figura 1), e os demais diferentes (Figura 2).

Atualmente, muitos trabalhos envolvendo espécies perenes buscam explicar o grau de concordância entre essas duas análises (agronômica e molecular), seja por correlação ou pelo teste Z de Mantel, visto ser uma forma de reduzir tempo na identificação de indivíduos desejáveis, para programas de melhoramento genético, e na otimização da conservação de germoplasma em bancos ou coleções (SOUSA, 2003).

Segundo N'GORAN et al. (1994), a possibilidade de concordância entre a dissimilaridade genética e fenotípica varia com o tamanho da amostra, sendo, geralmente, reduzida quando a amostra apresenta tamanho pequeno. Porém, a concordância entre elas parece depender também da espécie envolvida e da metodologia empregada. Para diferentes espécies, esta concordância tem-se mostrado variável com a aplicação de metodologias similares. Por exemplo, BARROS (1991) não encontrou concordância entre os dados morfométricos e isoenzimáticos, em acessos de cajueiro. Porém, DAHER (1993) e VEASEY (1998) obtiveram concordâncias, quando compararam os agrupamentos formados por padrões morfológicos e isoenzimáticos, sendo o primeiro em acessos de capim-elefante, e o segundo na separação de espécies anuais e perenes do gênero *Sesbania*.

Nas Figuras 1 e 2, são apresentadas as distâncias genéticas dos 39 genótipos, nas quais pode-se observar relativa distância dos 25 genótipos selecionados em cada uma das análises que utilizaram os dados agronômicos e moleculares, o que é importante para o processo de seleção, isto porque, além de manter a variabilidade da população, os genótipos selecionados apresentam alto potencial agronômico.

A caracterização e exploração da variabilidade genética de espécies de *Passifloras*, e também, dentro da espécie do maracujazeiro azedo, *P. edulis*, podem revelar recursos genéticos de grande valor, sejam novas variedades para os sistemas de produção ou a utilização em programas de melhoramento genético.

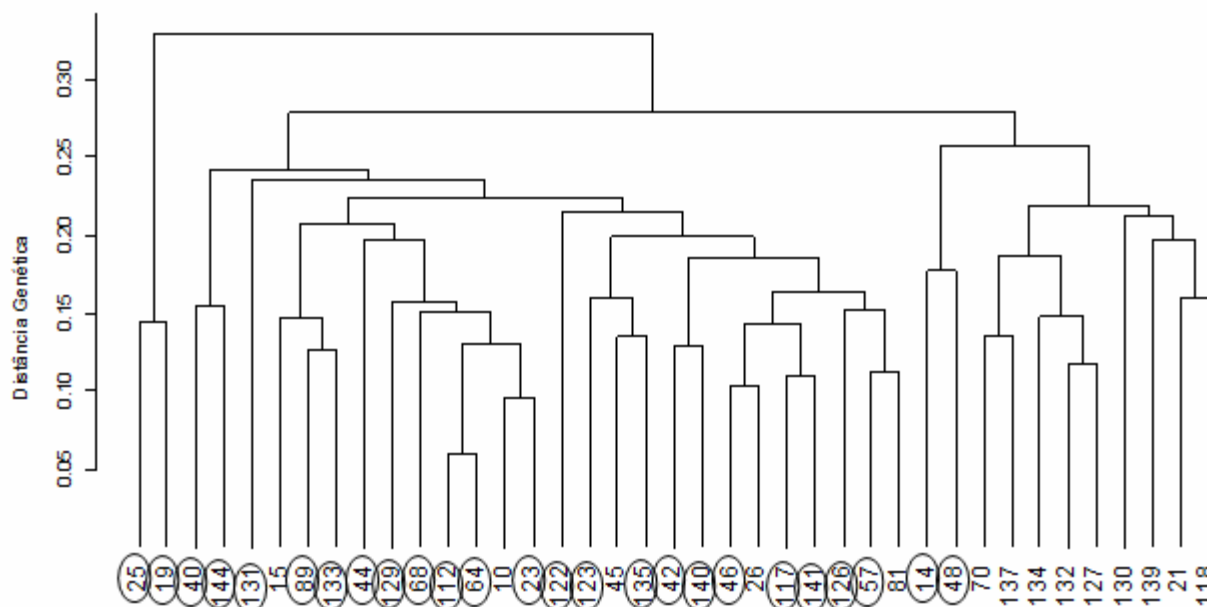


Figura 1. Dendrograma com base na distancia genética dos 39 genótipos obtidos pelos dados agronômicos. As progênies circuladas referem-se àquelas selecionadas como mais divergentes.

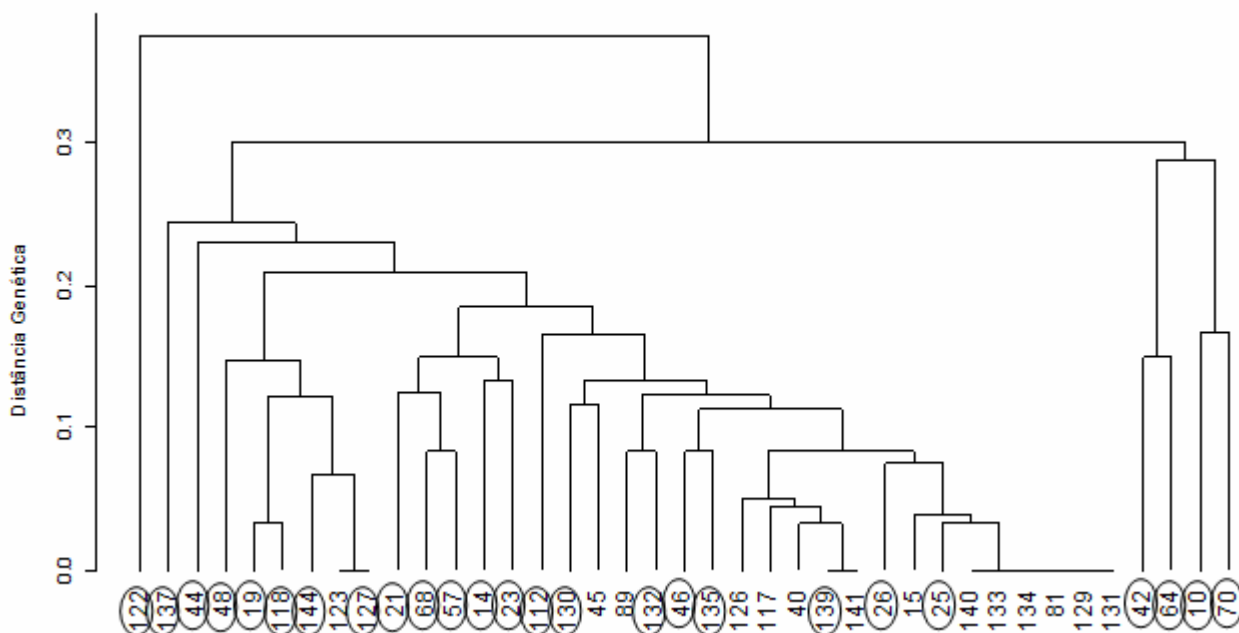


Figura 2. Dendrograma com base na distancia genética dos 39 genótipos obtidos pelos dados dos marcadores moleculares. As progênies circuladas referem-se àquelas selecionadas como mais divergentes.

O coeficiente de correlação cofenética (r) dos dados agronômicos e moleculares foram de 0,67 e 0,86, respectivamente, sendo um coeficiente adequado já que $r \geq 0,56$ é considerado ideal e reflete uma boa concordância com os valores das matrizes de distâncias genéticas (VAZ PATTO et al., 2004).

Houve uma pequena semelhança entre os procedimentos de seleção, entretanto, os genótipos selecionados pelos marcadores moleculares apresentaram-se maior variabilidade genética e com correlação cofenética superior aos genótipos selecionados através dos dados agronômicos.

Os procedimentos de seleção são de fundamental importância dentro de um programa de melhoramento. Assim, a escolha de métodos capazes para a identificação de genótipos mais divergentes e com potencial de produção, dentro do processo de seleção, torna-se indispensável para a obtenção de ganhos genéticos sem perdas na variabilidade.

Os resultados observados indicam os genótipos mais produtivos e divergentes para da continuidade ao programa de seleção recorrente do maracujazeiro, além disso, demonstram o sucesso da seleção recorrente para essa cultura e sua viabilidade.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Referencias Bibliográficas

BARROS, L. de M. (1991) **Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), tipos comum e anão precoce, por meio de técnicas multivariadas.** 256 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A. & FIGUEIRA, A. (2001) Detection of single sequence repeats polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gel by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306.

CRUZ, C. D. (2006) Programa GENES – **Aplicativo computacional em genética e estatística.** Viçosa: UFV
DAHER, R. F. (1993) **Diversidade morfológica e isoenzimática em capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.).** 110 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15.

IBGE **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística:** (2008) Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em 20 dez de 2008.

N'GORAN, J. A. K.; LAURENT, V.; RISTERUCCI, A. M.; LANAUD C. (1994) Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. **Heredity**, Oxford, v.73, n. 6, p. 589-597, Dec.

OLIVEIRA, E. J. (2006) **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)** / Eder Jorge de Oliveira. Tese de Doutorado - Piracicaba, 152 p.: il.

PERRIER, X.; FLORI, A. & BONNOT, F. (2003). Data analysis methods. In **Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants**, pp. 43–76. Edited by P. Hamon, M. Seguin, X. Perrier & J. C. Glaszmann. Enfield, UK: Science Publishers

SILVA, M. G. M. (2009), **Seleção recorrente intrapopulacional no maracujazeiro amarelo.** 157 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

SILVA, M. G. M.; Viana, A. P.; Gonçalves, G. M.; Amaral Junior, A. T. e Pereira, M. G. (2009) Seleção recorrente intrapopulacional no maracujazeiro amarelo: alternativa de capitalização de ganhos genéticos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 170-176.

STENZEL, N. M. C. & SERA, T. (1999) Melhoramento genético de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Paraná. In: Reunião técnica de pesquisa em maracujazeiro, 2., Londrina, 1999. **Anais**, Londrina: IAPAR-SBF, p. 81.

VAZ PATTO, M. C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S. e FEVEREIRO, P. (2004). Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, v.137p.63-72

VEASEY, E. A. (1998) **Variabilidade genética em acessos de espécies de Sesbania Scop. (Leguminosae): caracterização morfológica, agronômica e isoenzimática.** 142 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

VIEIRA, M. L. C.; OLIVEIRA, E. J.; MATTA, F. P.; PÁDUA, J. G.; MONTEIRO, M. (2005) Métodos biotecnológicos aplicados ao melhoramento genético de maracujá. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 411-453.