

Caracterização Citogenética e Aplicação de Marcadores ISSR em Diferentes Acessos de *Passiflora cincinnata* Mast.

Cytogenetic Characterization and Application of ISSR Markers in the Different Accessions of *Passiflora cincinnata* Mast.

*Larissa Emanuelle da Silva Almeida*¹; *Natoniel Franklin de Melo*²

Abstract

The present study aimed to characterize six accessions of *P. cincinnata* belonging to the Embrapa Semi-Arid Germplasm Active Bank through studies of mitotic chromosomes with banding by differential staining, pollen viability and use of molecular markers of the ISSR type. The chromosome number observed was $2n = 18$ in all accessions. It was possible to identify the presence of heterochromatic regions rich in CG bases in four chromosomes. A high pollen viability was observed, with mean values of 99.33% and 98.54% for staining with acetic carmine and Alexander reactive, respectively. The ISSR primers allowed the detection of polymorphism among different accesses, and five of the fifteen ones presented polymorphism in 100% of the amplicons. The use of CMA3/DAPI differential staining and molecular markers ISSR allowed to confirm the existence of genetic variability among accessions. This

¹Mestranda em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS, Bolsista CAPES;

²Pesquisador, Laboratório de Biotecnologia - Embrapa Semiárido Petrolina-PE, e-mail: natoniel.melo@embrapa.br

genetic variability does not compromise the pollen viability in different accessions, suggesting its use in breeding programs.

Palavras-chave: Viabilidade polínica, cromossomo, marcadores moleculares.

Keywords: Pollen viability, chromosome, molecular markers.

Introdução

Estudos realizados com espécies silvestres de maracujá podem contribuir para o melhoramento das espécies de interesse agrônomo (JUNQUEIRA et al., 2005). No Brasil, *Passiflora cincinnata* é uma das espécies que apresenta maior potencial de mercado (ARAÚJO et al., 2006). Nessa espécie, observa-se fenotipicamente uma considerável variabilidade entre acessos, principalmente relacionados ao tamanho e formato de folhas, flores e frutos (ARAÚJO, 2007). Sendo assim, além dos trabalhos de descrição e conservação, são necessários estudos de caracterização inicial de forma a conhecer a variabilidade cariotípica e molecular dos genótipos existentes, buscando identificar genótipos promissores para uso em programas de melhoramento genético (COELHO, 2015).

Por meio da técnica da citogenética é possível estabelecer padrões de coloração diferencial de regiões ricas em pares de base, mediante o uso dos fluorocromos 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que reconhece regiões heterocromáticas ricas em bases A (adenina) e T (timina), e cromomicina A₃ (CMA₃), que tem afinidade por regiões heterocromáticas ricas em bases G (guanina) e C (citosina) (GUERRA; SOUZA, 2002).

Os marcadores moleculares constituem outra ferramenta para detectar polimorfismo de DNA (SILVA et al., 2011). O ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) tem se destacado na determinação do polimorfismo (COSTA et al., 2012), por permitir uma boa quantificação da variabilidade intra e interespecíficas (DANTAS et al., 2012).

Com este estudo, objetivou-se caracterizar acessos de maracujá-da-caatinga (*P. cincinnata*), pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido, por meio de estudos de cromossomos mitóticos, bandeamento com coloração diferencial, viabilidade polínica, além de estimar a diversidade genética com o uso de marcadores moleculares do tipo ISSR.

Material e Métodos

O material vegetal foi coletado no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Maracujá, localizado na Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. Foram analisados seis acessos de *P. cincinnata*, sendo cada acesso composto por três repetições e parcelas de uma planta.

As análises citogenéticas foram realizadas com base no procedimento descrito por Guerra e Souza (2002). Para análise mitótica, utilizaram-se pontas de raízes tratadas com 8-hidroxiquinoleína e fixadas em Carnoy. A coloração das lâminas foi realizada com Giemsa 2% e montadas em Entellan e para a coloração com CMA3/DAPI, as raízes fixadas foram digeridas em solução de celulase/pectinase. Para análise da viabilidade polínica, botões florais jovens foram corados com carmim acético ou reativo de Alexander. Para cada um dos seis acessos foram confeccionadas seis lâminas, três para cada um dos corantes, avaliando-se 300 grãos de pólen por lâmina. Consideraram-se viáveis os grãos de pólen bem corados e inviáveis os que apresentaram coloração fraca ou esverdeada e/ou morfologia diferente. As imagens foram capturadas e analisadas pelo software Dinocapture 2.0.

Para as análises com iniciadores de microssatélites, foi realizada a extração de DNA utilizando-se o procedimento descrito por Doyle e Doyle (1990). A quantificação do DNA foi estimada em gel de agarose a 1% (p/v), comparando a intensidade das bandas do DNA extraído com o padrão de banda do marcador lambda (Invitrogen), corado com brometo de etídio. A amplificação do DNA foi feita por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) avaliando-se 15 *primers* pré-selecionados, com volume final de 25 μ L de reação por amostra, com um *mix* contendo 20 ng de DNA, 1x de tampão, 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 0,5 mM de *primer*, 0,7 U de Taq, ajustando o volume final com água ultrapura.

O programa de amplificação constou de uma etapa a 94°C por 3 minutos, seguida de 39 ciclos de desnaturação a: 94°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por 1 minutos, e amplificação a 72°C por 1 minutos, com extensão final de 72°C por 7 minutos. Os fragmentos foram separados em gel de agarose a 1,6% (p/v), corados com brometo de etídio e submetidos à voltagem constante de 100 V por 3 horas. A visualização dos amplicons foi realizada

sob luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos foi determinado com marcador DNA ladder de peso molecular 100 pb. Os marcadores ISSR foram convertidos em dados binários, onde se atribui valor (1) para presença e (0) para ausência de bandas. A dissimilaridade genética foi estimada com base no complemento do coeficiente de similaridade (JACCARD, 1908).

Resultados e Discussão

A análise convencional permitiu a determinação do número cromossômico, sendo confirmado $2n = 18$ cromossomos para *P. cincinnata*. Em trabalhos realizados anteriormente, foram observados o mesmo número cromossômico (MELO et al., 2001).

A dupla coloração CMA₃/DAPI permitiu identificar regiões heterocromáticas ricas em bases CG, não sendo encontrada nenhuma região DAPI⁺. As bandas de CMA⁺ apresentaram heteromorfismo, possivelmente decorrente de alterações estruturais, indicando variação da heterocromatina entre os acessos de *P. cincinnata*.

A análise dos grãos de pólen com o uso dos dois corantes permitiu estimar comparativamente a viabilidade polínica nos diferentes acessos de *P. cincinnata*. Ambos apresentaram indicativo de alta viabilidade, com valores médios de 99,33% e 98,54% para o carmim acético e reativo de Alexander, respectivamente (Tabela 1). Do ponto de vista de viabilidade polínica, esses valores indicam que os acessos avaliados podem ser utilizados em programas de melhoramento genético (SOARES-SCOTT et al., 2005).

Os dados obtidos indicam que *P. cincinnata* pode ser uma espécie alógama, o fluxo gênico através do pólen aumenta a possibilidade de formação de diferentes combinações entre alelos, e, conseqüentemente, a variabilidade genética.

Tabela 1. Valores médios de viabilidade polínica de seis acessos de *P. cincinnata* corados com carmim acético e reativo de Alexander.

Corantes	Grãos de pólen viáveis (%)	Grãos de pólen inviáveis (%)
Carmim acético	99,33	0,31
Reativo de Alexander	98,54	1,46

Dos 15 iniciadores de ISSR testados, cinco apresentaram 100% de polimorfismo, sendo eles: DiGA3'C, DiGT5'CY, TriTGT, TriACA 3'RC, e TriACG 3'RC (Tabela 2). Nesse caso, a variabilidade genética encontrada pode ser atribuída às diferentes origens geográficas dos acessos. Um estudo realizado com 11 acessos de *P. foetida*, coletados em diferentes regiões, chegou a resultados similares, com altos percentuais de polimorfismo (SILVA, 2016). Junqueira et al. (2005) também relataram a existência de uma considerável variabilidade intraespecífica em espécies silvestres de maracujá. Os valores obtidos neste trabalho confirmam a existência de variabilidade genética entre os diferentes acessos de *P. cincinnata*, podendo-se utilizar os primers ISSR como marcadores durante sua utilização como fonte de genes em programas de melhoramento.

Tabela 2. Iniciadores ISSR utilizados na amplificação de fragmentos de DNA em seis acessos de *Passiflora cincinnata* Mast., com suas respectivas sequências, percentagem de polimorfismo (P%), número de bandas por genótipo (NBG) e amplitude de fragmentos (AF).

Primer	Sequência	P (%)	NBG (acessos)						AF (pb)
			1	16	25	34	42	49	
DiGA3'C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	100	3	5	3	5	3	3	200-700
DiGT5'CY	CYGTGTGTGTGTGTGTGT	100	6	7	9	2	2	9	350-1000
TriTGT	TGTTGTTGTTGTTGT	100	5	6	8	8	8	8	300-1000
TriACA 3'RC	ACAACAACAACAACARC	100	11	6	12	12	11	10	350-900
TriACG 3'RC	ACGACGACGACGACGRC	100	6	4	6	6	6	6	500-600

Conclusão

O uso da coloração diferencial CMA₃/DAPI e de marcadores moleculares ISSR permitiram confirmar a existência de variabilidade genética entre acessos de *P. cincinnata*. Por outro lado, essa variabilidade genética não compromete a viabilidade polínica nos diferentes acessos de *P. cincinnata*, sugerindo-se seu uso em programas de melhoramento.

Referências

- ARAÚJO, F. P. **Caracterização da variabilidade morfoagronômica de maracujazeiro (*Passiflora cincinnata* Mast.) no Semi-Árido brasileiro**. 2007. 94 f. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômica, Botucatu.
- ARAÚJO, F. P.; QUEIROZ, M. A.; SILVA, N.; MELO, N. F. Estratégias para coleta de germoplasma de maracujá do mato (*Passiflora cincinnata* Mast.). **Magistra**, Cruz das Almas, v. 18, p.35-37, out. 2006. Número Especial.
- COELHO, M. S. E. **Citogenética e cultivo *in vitro* de espécies e híbridos de *Passiflora* L.** 2015. 104 f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- COSTA, J. L.; JESUS, O. N.; OLIVEIRA, G. A. F.; OLIVEIRA, E. J. Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v.12, n.4, p. 253-260, 2012.
- DANTAS, A. C. A.; NUNES, G. H. S.; ARAÚJO, I. S.; ALBUQUERQUE, L. B. Caracterização molecular de acessos de melão coletados no nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 1, p. 183-189, 2012.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, p.13-15, 1990.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo; FUNPEC, 2002. 131 p.
- JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles**, Lausanne, v.44, p. 223-270, 1908.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L. C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. cap. 4, p. 79 -108.
- MELO, N. F.; CERVI, A. C.; GUERRA, M. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 226, p. 69-84, 2001.
- SILVA, A. F.; SANTOS, A. P. G.; OLIVEIRA, A. P. D.; MORAES, S. A.; SANTANA, SILVA, K. V. P.; ALVES, A. A. C.; MARTINS, M. I. G.; MELO, C. A. F.; CARVALHO, R. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 46, n. 9, p. 1082-1088, 2011.
- SILVA, R. M. **Enxertia de cultivares de maracujazeiro azedo sobre *Passiflora foetida* L. Desempenho agrônomo das cultivares, caracterização morfoagronômica, variabilidade genética do porta enxerto e resistência a fusariose**. 2016. 112 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró.
- SOARES-SCOTT, M. D.; MELETTI, L. M. M.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Citogenética clássica e molecular em *Passifloras*. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. cap. 9, p. 211-240.