

TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM ESPÉCIES DE *Passiflora*

Gilmara Alvarenga Fachardo Oliveira¹; Eder Jorge de Oliveira²; Juliana Leles Costa¹;
Fabiana Moraes de Carvalho³; Jorge Luiz Loyola Dantas²; Vânia Jesus dos Santos de
Oliveira⁴

¹Estudante de Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 44380-000, Cruz das Almas (BA), E-mail: gfachardo@yahoo.com.br; julianaleles_17@hotmail.com; ²Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Rua da Embrapa, s/n, CP007, 44380-000, Cruz das Almas (BA), E-mail: eder@cnpmf.embrapa.br; loyola@cnpmf.embrapa.br; ³Estudante de Biomedicina da Faculdade Maria Milza, 44380-000, Cruz das Almas (BA), E-mail:fabianamoraescarvalho@hotmail.com; ⁴Doutoranda em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 44380-000, Cruz das Almas (BA), E-mail: vania79br@hotmail.com.

Introdução

Os marcadores do tipo microsatélites, também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou SRT (*Short Tandem Repeats*) são unidades de 1 a 6 nucleotídeos repetidas em *tandem*. Apresentam um elevado conteúdo de informação de polimorfismo, sendo indicados para identificação e discriminação de genótipos. Como outras vantagens apresentam a co-dominância dos marcadores, alta reprodutividade, rapidez e simplicidade da técnica, baixo custo de utilização e grande poder de resolução (Oliveira et al., 2006).

Dentre as dificuldades está o alto custo no desenvolvimento dos iniciadores específicos e na difícil análise de polimorfismos em géis de baixa resolução e com bandas inespecíficas (Faleiro, 2007). Na tentativa de facilitar sua utilização, favorecendo assim as pesquisas, este trabalho teve como objetivo analisar a transferibilidade de iniciadores da espécie *Passiflora edulis* Sims. (maracujá amarelo) para outras espécies de *Passiflora*.

Materiais e Métodos

Foram coletadas amostras 73 plantas oriundas de 16 acessos, de 11 diferentes espécies de *Passiflora* pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Maracujazeiro (BAG-Maracujá) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, com variação de 3 a 5 plantas por acesso.

O DNA genômico total foi extraído a partir de folhas dos genótipos, seguindo protocolo adaptado de Doyle & Doyle (1990). A quantificação do DNA foi feita após

eletroforese (5volts/cm) de alíquotas de cada amostra, comparando-as com diferentes concentrações conhecidas do DNA Lambda, em gel de agarose 1% (p/v). A concentração de DNA foi estimada a partir da comparação visual das intensidades das bandas, reveladas pela coloração com brometo de etídio.

Para as análises moleculares, foram testados 40 locos de SSR, sendo selecionados 21 para realização desse trabalho, em função da melhor qualidade da amplificação. As reações foram realizadas em volume final de 20 µL, contendo 10 ng de DNA, 0,4 µM dos iniciadores e 1,0 U de *Taq* DNA Polimerase, em diferentes temperaturas, concentrações de dNTP, cloreto de magnésio e de tampão de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), conforme apresentado na Tabela 1.

Os produtos resultantes das reações foram amplificados em gel desnaturante de poliacrilamida 6%, visualizados por coloração de prata ou em géis de agarose 1000 (Invitrogen) 4%. O peso molecular dos locos foi determinado por comparação com um padrão de peso molecular de 50 pb.

Tabela 1. Condições de reação dos iniciadores de SSR desenvolvidos para *P. edulis*

Loco	TA*	dNTP	Tampão	MgCl ₂	Loco	TA	dNTP	Tampão	MgCl ₂
PE03	TD60	0,2 mM	1X	1,5mM	PE38	TD56	0,2 mM	1X	2,5mM
PE07	TD60	0,2 mM	2X	1,5mM	PE41	TD60	0,2 mM	1X	2,5mM
PE09	TD56	0,2 mM	2X	1,5mM	PE58	TD60	0,2 mM	1X	1,5mM
PE11	TD60	0,2 mM	2X	1,5mM	PE59	TD56	0,35mM	2X	1,5mM
PE13	TD60	0,2 mM	2X	1,5mM	PE64	TD56	0,2 mM	2X	1,5mM
PE15	60	0,35mM	2X	1,5mM	PE66	TD60	0,2 mM	1X	2,5mM
PE18	TD60	0,35mM	2X	1,5mM	PE74	62	0,2mM	1X	2,0mM
PE19	52	0,2 mM	1X	2,5mM	PE75	TD60	0,35mM	2X	1,5mM
PE23	TD56	0,35mM	2X	1,5mM	PE88	TD60	0,35mM	2X	1,5mM
PE27	TD60	0,2 mM	1X	2,5mM	PE90	TD60	0,2 mM	1X	2,5mM
PE37	TD60	0,2 mM	1X	1,5mM					

*TA= temperatura de anelamento

Resultados e Discussão

Todos os 21 locos foram transferidos para pelo menos uma das 11 espécies analisadas, porém em taxas bastante diferenciadas. Os locos PE13, PE37, PE41 e PE88 apresentaram alta taxa de transferibilidade para todas as espécies em estudo. Por outro lado, o PE11 possibilitou a amplificação do loco apenas nas espécies *P. moliformis* L e *P. setacea* DC (acesso PC) (Tabela 2). Além disso, alguns locos apresentaram muitas bandas inespecíficas, a exemplo do PE07, PE19, PE38 e PE58. A inespecificidade das reações

prejudicam a análise do polimorfismo nestas espécies, para fins de determinação estruturação da variabilidade genética e principalmente para outros usos, como a construção de mapas de ligação e seleção assistida por marcadores.

Para o conjunto de iniciadores de maracujá amarelo otimizados e testados até o momento para *P. caerulea* L., *P. cincinnata*, *P. foetida* L., *P. gibertii*, *P. ligularis*, *P. moliformis* L., *P. morifolia* L., *P. muchronata*, *P. setacea* DC., *P. suberosa* L. e *P. rubra* L., 33% (PE07, PE13, PE18, PE19, PE37, PE41 e PE88) mostraram-se promissores para análise genômica de todas as espécies. Entretanto, muitos outros locos podem ser trabalhados quando o interesse da pesquisa está na análise de uma ou poucas espécies (Tabela 2).

Tabela 2. Taxas de transferibilidade de locos de microssatélites desenvolvidos para *P. edulis* em onze espécies de *Passiflora*.

Loco	Espécies/aceessos																				
	<i>P. caerulea</i> L.		<i>P. cincinnata</i>		<i>P. foetida</i> L.		<i>P. gibertii</i>		<i>P. ligularis</i>			<i>P. moliformis</i> L.		<i>P. morifolia</i> L.		<i>P. muchronata</i>		<i>P. setacea</i> DC.	<i>P. suberosa</i> L.		<i>P. rubra</i> L.
	BGM0 16	BGM3 22	BGM1 53	BGM0 08	BGM1 98	BGM2 12	BGM1 61	BGM1 60	BGM2 48	BGM0 32	BGM1 07	BGM1 14	BGM2 41	PC	BGM1 52	BGM1 17					
PE03	-	-	-	-	20	60	60	-	100	100	-	-	-	-	40	-					
PE07	100	100	80	80	AI*	80	100	20	60	100	100	100	80	100	100	80					
PE09	75	100	80	80	100	80	100	100	100	100	-	-	100	100	40	80					
PE11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-					
PE13	100	100	100	100	80	100	60	100	100	100	100	100	100	100	100	80					
PE15	50	80	40	100	40	100	100	100	100	100	-	33	80	60	-	-					
PE18	75	100	20	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80	100	20					
PE19	100	80	100	AI	60	100	100	100	100	100	100	100	100	100	60	100					
PE23	100	40	-	-	-	-	-	-	-	100	-	100	100	80	-	-					
PE27	100	40	20	-	-	-	-	-	-	25	-	33	20	80	-	-					
PE37	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100					
PE38	AI	AI	AI	AI	AI	60	40	AI	AI	100	AI	-	AI	80	AI	AI					
PE41	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100					
PE58	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	80	100	-	AI	AI	AI	20	-					
PE59	100	100	-	60	100	-	-	-	-	100	100	100	-	-	-	-					
PE64	25	-	-	20	20	-	-	-	20	100	100	66	100	60	-	-					
PE66	100	100	80	80	100	100	100	40	80	100	100	100	80	100	-	100					
PE74	-	-	100	-	80	20	20	-	-	50	100	100	20	100	60	-					
PE75	75	100	40	-	40	40	20	60	40	100	100	33	-	-	20	-					
PE88	100	100	80	80	100	100	100	100	100	100	100	66	100	100	60	60					
PE90	100	100	-	80	80	80	100	80	100	100	-	100	100	100	-	-					

*AI= amplificação inespecífica

Os valores de transferibilidade de locos de *P. edulis* para outras espécies é menor do que o observado em outras espécies, a exemplo do melão para pepino (cerca de 50%) (Danin-Poleg et al., 2001). Entretanto, os resultados obtidos até o momento são bastante promissores, tendo em vista a economia de tempo e recursos financeiros e humanos para o desenvolvimento de marcadores SSR para espécies deste gênero.

Conclusão

Os locos PE07, PE13, PE18, PE19, PE37, PE41 e PE88 apresentaram alta taxa de transferibilidade para as espécies *P. caerulea* L., *P. cincinnata*, *P. foetida* L., *P. gibertti*, *P. ligularis*, *P. moliformis* L., *P. morifolia* L., *P. muchronata*, *P. setacea* DC., *P. suberosa* L. e *P. rubra* L., o que permitirá seu uso nos mais diversos tipos de análises genéticas do gênero *Passiflora*.

Agradecimentos

À Fapesb e ao CNPq pelo auxílio financeiro e concessão das bolsas de estudo.

Referências Bibliográficas

DANIN-POLEG, Y.; REIS, N.; TZURI, G.; KATZIR, N. Development and characterization of microsatellite markers in Cucumis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, p. 61-72, 2001.

DOYLE, J.J. & DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 13-15, 1990.

FALEIRO, F. G.; **Marcadores Genético – Moleculares aplicados a programa de conservação e uso de recursos genéticos**, Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, n.2, p. 294-307, 2006.