

## Identificação de Cultivares de Pessegueiro por meio de Marcadores Microsatélites

Carolina da Silva Silveira<sup>1</sup>, Natércia Lobato Pinheiro Lima<sup>2</sup>,  
Newton Alex Mayer<sup>3</sup> e Sandro Bonow<sup>4</sup>

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi certificar a identidade genética de cultivares de pessegueiro. Foi realizada a certificação de 49 plantas. Essas plantas, de acordo com a cultivar a que supostamente pertenciam, foram divididas em quatro grupos. Grupo 1, 21 plantas, grupo 2 com 14 plantas, grupo 3 com cinco plantas e grupo 4 com nove plantas, respectivamente como das cultivares Esmeralda, Bonão, Âmbar e Jade. Para a certificação foram utilizados cinco marcadores microsatélites. Foram comparados os padrões moleculares de genótipos referência provenientes do programa de melhoramento genético de pessegueiro da Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS com àqueles dos genótipos a serem identificados. Apenas o grupo 1 apresentou variação intragrupo, sendo identificada uma planta atípica. Quanto a identificação genética, o grupo 1 não apresentou o padrão molecular esperado, demonstrando ter ocorrido alguma troca de material. Os demais grupos apresentaram padrão molecular condizente com a amostra referência. A análise dos cinco microsatélites foi capaz de diferenciar todas as cultivares mostrando o êxito da utilização deste tipo de marcador molecular na certificação genética de cultivares de pessegueiro.

### Introdução

O pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch] é uma das fruteiras de grande importância para o Brasil, principalmente para o sul do Rio Grande do Sul. Atualmente existe um grande número de cultivares lançadas e disponíveis ao produtor. Dentro dessas cultivares, a correta identificação varietal, embora exista uma considerável variabilidade genética entre as cultivares, por vezes, pode ser difícil. A identificação de cultivares tem sido tradicionalmente realizada por meio de avaliação morfofenológica, embora, em alguns casos esse método pode não ser suficiente ou pode apresentar algumas outras desvantagens como a necessidade de considerável tempo, principalmente se as características morfológicas diferenciadoras das cultivares forem na fase reprodutiva. Alternativa a identificação morfofenológica são os métodos moleculares. Dentre os métodos moleculares, a análise de microsatélites tem sido utilizada com frequência e com sucesso para a caracterização de cultivares (Wünsch et al. 2006). Microsatélites são regiões do DNA de sequência repetitiva em número variável, na qual constituem a classe mais polimórfica de marcadores moleculares disponíveis atualmente. A identificação de cultivares tem sido utilizada para várias situações, entre elas a checagem da identidade genética quando as características morfofenológicas de determinadas plantas não conferem com aquelas descritas para a cultivar. O objetivo desse trabalho foi checar a identidade genética de um grupo de plantas de pessegueiro em uma área experimental instalada em uma propriedade rural no município de Morro Redondo-RS, das quais tinha-se dúvida em relação a identidade da cultivar. Essa dúvida foi motivada pela grande variabilidade morfológica observada entre plantas de um mesmo grupo e por um grupo de plantas estar com o início da maturação em desacordo com aquela da cultivar a que deveria pertencer.

### Material e métodos

No presente estudo, foram analisados 4 grupos de plantas de pessegueiro supostamente sendo das cultivares Esmeralda, Bonão, Jade e Âmbar. O grupo 1 possuía 21 plantas supostamente sendo da cultivar Esmeralda, o grupo 2, como Bonão com 14 plantas, o grupo 3, a cultivar Âmbar com 5 plantas e do grupo 4, supostamente sendo a cultivar Jade com 9 plantas. Com a finalidade de checar a identidade genética das cultivares os padrões moleculares desses grupos foram comparados com genótipos referência: Esmeralda, Bonão, Precocinho, Âmbar, Ametista, Diamante, Jade, Maciel, Turmalina e Sensação, oriundas do programa

---

<sup>1</sup> Graduanda do Curso de Biotecnologia – UFPel/Pelotas. carolinnasilveira@hotmail.com

<sup>2</sup> Analista da Embrapa Clima Temperado – CPACT, Mestranda no Programa de Pós Graduação em Agronomia, na área de concentração de Fitomelhoramento da UFPel/Pelotas. natercia.lobato@embrapa.br

<sup>3</sup> Pesquisador da Embrapa Clima Temperado – CPACT. alex.mayer@embrapa.br

<sup>4</sup> Pesquisador da Embrapa Clima Temperado – CPACT. sandro.bonow@embrapa.br

de melhoramento genético de pessegueiro da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. As análises consistiram na verificação de padrões moleculares intra e intergrupos.

Foram testados seis *primers* microssatélites, reconhecidamente polimórficos (Tabela 1), porém devido a clareza dos resultados foram utilizados apenas cinco. As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular, na Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS. Para a extração de DNA foram utilizadas entre 150 mg a 200 mg de folhas jovens e utilizado o protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1996). O DNA obtido foi quantificado em gel de agarose 1%, e a concentração ajustada para 20 ng.µL<sup>-1</sup>.

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador Marca Veriti (Applied Biosystems) em volume final de 10 µL, contendo 5 µL do mix Go Taq Green Master (Promega); 1 µL de cada *primer*, a 1 µM; 20 ng de DNA genômico; 1 µM de M13 Forward (-29) IRDye 800 a 1 µM, e ao final 1 µL de água ultrapura estéril. As reações de PCR foram conduzidas nas seguintes condições: um ciclo a 94°C por 1 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 45 s; x°C por 45 s e 72°C por 2 min, seguindo-se de um ciclo final de 72°C por 4 min. A temperatura de anelamento variou de acordo com o *primer* utilizado, conforme Tabela 1.

Tabela 1 - *Primers* dos microssatélites utilizados na certificação genética de 49 plantas de pessegueiro.

Loco SSR	Sequência <i>forward</i>	Sequência <i>reverse</i>	Temperatura de anelamento
BPPCT007	TCATTGCTCGTCATCAGC	CAGATTTCTGAAGTTAGCGGTA	57°C
BPPCT017	TTAAGAGTTTGTGATGGGAACC	AAGCATAATTTAGCATAACCAAGC	56°C
BPPCT020	CGTGGATGGTCAAGATGC	ATTGACGTGGACTTACAGGTG	58°C
CPPCT022	CAATTAGCTAGAGAGAATTATTG	GACAAGAAGCAAGTAGTTTG	50°C
UDP98-407	AGCGGCAGGCTAAATATCAA	AATCGCCGATCAAAGCAAC	58°C
pchgms 3	ACGGTATGTCCGTACTCTCCATG	CAACCTGTGATTGCTCCTATTA AAC	58°C

Os produtos das reações de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliácridamida 6% em sequenciador LI-COR 4300 e o tamanho dos alelos comparados com as amostras de referência das cultivares padrão.

## Resultados e discussão

Dos *loci* microssatélites analisados, nas condições empregadas, apenas o *primer* BPPCT022 não amplificou de forma que permitisse a análise em todos os genótipos de pessegueiro e foi desconsiderado. No grupo 1 houve variação intragrupo (Tabela 2), indicando um genótipo diferente dos demais. Na comparação com o genótipo referência, Esmeralda, o grupo apresentou em todos os microssatélites padrão molecular distinto da cultivar esperada evidenciando que as plantas não eram da cultivar Esmeralda. Na comparação com o padrão dos demais genótipos referência testados, o grupo apresentou, para todos os microssatélites, padrão similar a cultivar Bonão, cultivar a que as características morfofenológicas haviam coincidido. Assim, fortalecendo a suspeita de o grupo 1 pertencer a cultivar Bonão e não Esmeralda. Quanto a planta atípica desse grupo, essa não coincidiu com o padrão de Bonão, coincidindo com o padrão de Esmeralda e Ametista. No grupo dois, não houve variação intragrupo, todos os cinco loci microssatélites analisados coincidiram com o padrão da cultivar referência, Bonão, esperada para este grupo. Da mesma forma ocorreu para os grupos três e quatro, os quais apresentaram os padrões moleculares esperados, Âmbar e Jade, respectivamente. Estes, baseados nos microssatélites analisados, não apresentaram variação intragrupo. Ressalta-se que a variabilidade intragrupo nessas plantas, observada a campo, possivelmente deve-se somente a fatores ambientais e não genéticos.

Tabela 2 - Grupos, número de plantas por grupo, variedade referência, *primers* utilizados e padrões moleculares, com base nos genótipos referência, encontrados em cada grupo para cada *primer*.

	Nº de plantas	Variedade Referência	BPPCT007	BPPCT017	BPPCT020	UDP98-407	pchgms 3
Grupo 1	21	Esmeralda	Bonão, Precocinho, Diamante ou Maciel	Bonão	Bonão	Bonão, Precocinho e Diamante	Bonão
Grupo 2	14	Bonão	Bonão	Bonão	Bonão	Bonão	Bonão
Grupo 3	5	Âmbar	Âmbar	Âmbar	Âmbar	Âmbar	Âmbar
Grupo 4	9	Jade	Jade	Jade	Jade	Jade	Jade
Grupo 5	1	Esmeralda	Esmeralda ou Ametista	Esmeralda, Precocinho ou Ametista;	Esmeralda ou Ametista	Esmeralda ou Ametista	Esmeralda ou Ametista

### Conclusão

Foi possível verificar que dentro do grupo 1 ocorreu uma planta atípica as demais. Além disso, o padrão molecular das plantas desse grupo não coincidiu com o padrão da cultivar a que deveriam pertencer, permitindo concluir que ocorreu a troca de materiais. Os outros grupos não apresentaram variação intravarietal e apresentaram padrão condizente com a cultivar a que deveriam pertencer.

### Referências

- Aranzana MJ, Mas JG and Arus P (2002) **Development and variability analysis of microsatellite markers in peach**. Plant Breeding, v. 121, n. 184, p. 87-92.
- Cipriani G, Lot G, Huang WG, Matarazzo MT, Peterlunger E and Testolin R (1999) **AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus***. Theoretical and Applied Genetics, v. 99, p. 65-72.
- Dirlewanger E, Cosson P, Tavaud M, Aranzana MJ, Poizat C, Zanetto A, Arús P and Laigret F (2002) **Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.)**. Theoretical and Applied Genetics, v. 105, p. 127-138.
- Sosinski B, Gannavarapu M, Hager LD, Beck LE, King GJ, Ryder CD, Rajapakse S, Baird WV, Ballard RE and Aboutt AG (2000) **Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]**. Theoretical and Applied Genetics, v. 101, p. 421-428.
- Wünsch A, Carrera M and Hormaza JI (2006) **Molecular characterization of local Spanish peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] germplasm**. Genetic Resources and Crop Evolution, 53:925-932.