



MARCADORES MICROSSATÉLITES EM PESSEGUEIRO: IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA

Resumo: O objetivo deste trabalho foi caracterizar doze genótipos de pessegueiro por meio de oito marcadores microssatélites, visando à identificação de cultivares. Todos os locos microssatélites testados amplificaram para os 12 genótipos, resultando na identificação de 23 alelos, sendo o loco amplificado com o *primer* BPPCT017 o que apresentou maior diversidade alélica, com identificação de seis fragmentos. A análise de correlação cofenética entre o dendrograma e a matriz de dissimilaridade foi de 81,25%. Dois grandes grupos foram formados, separando visivelmente os genótipos com destinação para Mesa dos genótipos para Indústria. Foi possível discriminar genótipos oriundos de cruzamento com os mesmos genitores, comprovando o grande potencial discriminatório dos marcadores SSR, mesmo quando analisados genótipos de pessegueiro com alto grau de parentesco.

Palavras-chave: caracterização molecular, *Prunus persica*, SSR

Introdução

O pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch] é uma das frutíferas de caroço predominantes em todo o mundo, com elevado número de cultivares existentes (ARANZANA et al., 2010). Embora exista variabilidade entre os genótipos, estes são, em muitos casos, morfológica e agronomicamente muito semelhantes, o que dificulta o trabalho de identificação e caracterização.

Como alternativa, a genotipagem com marcadores moleculares oferece algumas vantagens, uma vez que a caracterização molecular é independente das condições ambientais, do estágio fenológico da planta e apresenta a possibilidade de ser realizada precocemente e de forma rápida (BERNET et al., 2003). Desta forma, marcadores moleculares, especialmente marcadores SSR (altamente polimórficos, codominantes e que obedecem aos padrões de herança mendeliana), são muito eficazes na identificação de cultivares, análise da variabilidade genética e na introdução de novas variedades, com a finalidade de testar a DHE (Distinção – Homogeneidade – Estabilidade), necessária para o registro e proteção de cultivares (LIMA et al., 2003).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade da utilização dos marcadores microssatélites na caracterização de genótipos de pessegueiro visando à identificação genética.



Material e Métodos

No total, foram caracterizados 12 acessos de pessegueiro, incluindo as cultivares lançadas recentemente pelo Programa de Melhoramento Genético de Pessegueiro da Embrapa Clima Temperado (Rubimel, Bonão, Âmbar, Libra e Kampai), as cultivares mais plantadas na Região Sul do País (Chimarrita, Aurora1, Maciel, Jade e Esmeralda) e os genótipos em fase de registro junto ao Ministério da Agricultura (Cascata 1032 e Cascata 730). A caracterização das cultivares foi realizada com base em oito locos microssatélites (Tabela 1).

Tabela 1. Locos microssatélites utilizados na caracterização de 12 genótipos de pessegueiro (*P. persica*).

Loco SSR	Sequência <i>forward</i>	Sequência <i>reverse</i>	Cromossomo
BPPCT020	CGTGGATGGTCAAGATGC	ATTGACGTGGACTTACAGGTG	I
pchgms 1	GGGTAAATATGCCATTGTGCAATC	GGATCATTGAACTACGTCAATCCTC	II
BPPCT009	ATTCGGGTGCGAACTCCCT	ACGAGCACTAGAGTAACCCTCTC	IV
BPPCT015	ATGGAAGGGAAGAGAAATCG	GTCATCTCAGTCAACTTTTCCG	IV
BPPCT014	TTGTCTGCCTCTCATCTTAACC	CATCGCAGAGAACTGAGAGC	V
BPPCT017	TTAAGAGTTTGTGATGGGAACC	AAGCATAATTTAGCATAACCAAGC	V
UDP98-407	AGCGGCAGGCTAAATATCAA	AATCGCCGATCAAAGCAAC	VI
UDP98-405	ACGTGATGAACTGACACCCA	GAGTCTTTGCTCTGCCATCC	VII

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 10 μ L, contendo cada amostra 1,0 μ L de DNA genômico (10ng/ μ L); 2,5 μ L de *primer* (*forward* e *reverse*) na concentração de 1,0 μ M; e 5,0 μ L do mix Go Taq Green Master (Promega). O programa de amplificação foi executado em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 de acordo como segue: ciclo inicial de desnaturação a 94° por 1 minuto, seguido de 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, anelamento a 59°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, finalizando com um ciclo de extensão a 72°C por 4 minutos. Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e o tamanho dos alelos comparado com o marcador de DNA de peso molecular de 10pb (InvitroGen).

Para cada loco microssatélite os amplicons foram pontuados como um (1) para genótipo homozigoto, 0,5 para cada fragmento quando genótipo heterozigoto e zero (0) para banda ausente, sendo posteriormente convertidos em uma matriz de dados a partir da qual foi estimada a distância genética entre as cultivares, por meio da distância de Rogers modificado (GOODMAN, STUBER, 1983). Com base na matriz de distância genética foi construído um dendrograma pelo método de agrupamento da distância média UPGMA. O ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma



foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (r), utilizando o programa NTSYS-pc (ROHLF, 2005).

Resultados e Discussão

Todos os oito locos microsatélites testados amplificaram para os 12 genótipos de pessegueiro. A análise de correlação cofenética entre o dendrograma e a matriz de dissimilaridade foi de 81,25%. Dois grandes grupos foram formados, separando visivelmente os genótipos com destinação para Mesa (I) dos genótipos para Indústria (II) (Figura 1).

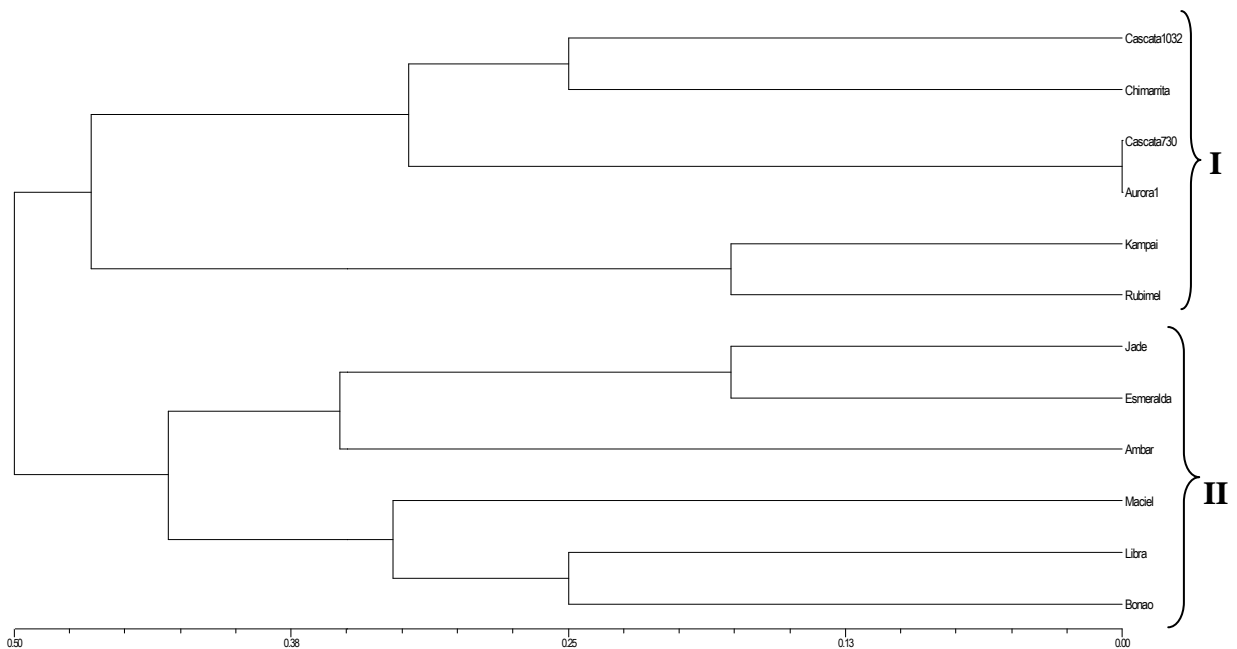


Figura 1. Agrupamento de 12 genótipos de pessegueiro pelo método UPGMA, obtido a partir da análise de oito locos microsatélites, com base na matriz de similaridade genética obtida por meio da Distância de Rogers modificado.

A análise dos oito locos microsatélites resultou na identificação de 23 alelos nos genótipos avaliados. O *primer* BPPCT017 foi o que apresentou maior diversidade alélica, sendo identificados seis fragmentos, seguido pelo BPPCT020 com cinco e BPPCT014 com quatro alelos.

Mesmo com a análise de um número relativamente pequeno de locos SSR, foi possível discriminar e caracterizar genótipos de pessegueiro incluindo alguns que apresentam genitores em comum, como as cultivares Rubimel e Kampai ('Chimarrita' x 'Flordaprince') e que apresentaram variação molecular de 17,7%, assim como 'Libra' e 'Bonão', oriundos do cruzamento de Conserva 171



x 'Pepita', com variação de 25%, comprovando a grande capacidade dos marcadores SSR em discriminar e identificar genótipos de pessegueiro.

As cultivares Jade e Esmeralda apresentaram uma distância genética de 17,7% e possuem 'Alpes' como genitor em comum. 'Jade' e 'Esmeralda' são as cultivares que apresentaram a máxima distância genética dentre todos os genótipos analisados quando comparadas com Cascata 1032 (68,5%).

Não foi possível discriminar 'Aurora 1' de Cascata 703, embora estes genótipos não apresentem indício de ancestral comum em sua genealogia, necessitando desta forma a análise de outros locos microssatélites para distinguir os mesmos.

Conclusão

Foi possível discriminar todos os genótipos estudados com exceção de 'Aurora 1' e Cascata 730. Os marcadores microssatélites têm grande potencial discriminatório, mesmo quando analisados genótipos de pessegueiro com alto grau de parentesco.

Referências Bibliográficas

ARANZANA, M.J.; ABBASSI, E.; HOWAD, W.; ARÚS, P. Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. **BMC Genetics**, v. 11, p.69, 2010.

BERNET, G.P.; BRAMARDI, S.; CALVACHE, D.; CARBONELL, E.A.; ASINS, M.J. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. **Plant Breeding**, Wageningen, v. 122, p. 146-152, 2003.

GOODMAN, M.M.; STUBER, C.W. Races of maize: VI. Isozyme variation among races of maize in Bolívia. **Maydica**, Bergamo, V.28 p. 169-187, 1983.

LIMA, M.; AUGUSTIN, E.; CHOER, E.; RASEIRA, M.C.B. Caracterização de cultivares de pessegueiro e nectarineira por marcadores moleculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 349-355, 2003.

ROHLF, F.J. **NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Setauket: Applied Biostatistics, 2005. v. 2.2.