

## Caracterização de Nectarineiras do BAG de Prunóideas da Embrapa<sup>1</sup>

Liane Bahr Thurow<sup>2</sup>, Natércia Lobato Pinheiro Lima<sup>3</sup>, Sandro Bonow<sup>4</sup>, Maria do Carmo Bassols Raseira<sup>4</sup>,  
Caroline Marques Castro<sup>4</sup>

### Resumo

Este trabalho teve por objetivo a caracterização de acessos de nectarineira do BAG de Prunóideas e de algumas seleções do programa de melhoramento genético da Embrapa com marcadores microssatélites (SSRs), a fim de estimar a variabilidade genética presente. Trinta e dois genótipos de nectarineiras foram alvo do estudo. A caracterização molecular foi realizada com base em dez *loci* SSR e os fragmentos amplificados separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5% com sistema de análise de DNA do sequenciador LI-COR 4300. Todos os *loci* SSR apresentaram polimorfismo entre os genótipos analisados. O número de alelos encontrados variou de dois (BPPCT014) a onze (BPPCT015), num total de 52 alelos, com média de 5,2 alelos por *locus*. A distância genética média geral entre os genótipos analisados foi de 0,52 variando entre 0,22 (‘Sunred’ x seleção Necta 508) a 0,81 (‘Sunred’ x ‘Amarillo’). Através do dendrograma resultante da análise dos 10 *loci* SSRs foi possível discriminar todos os acessos avaliados. Não foi identificada uma estruturação no germoplasma avaliado associada aos caracteres morfológicos, genealogia dos acessos e/ou local de origem, indicando que uma ampla variabilidade genética está conservada no BAG, formando um conjunto diverso para uso no Programa de Melhoramento. Os resultados também demonstram a manutenção da variabilidade genética nas seleções recentes oriundas do programa de melhoramento da Embrapa.

### Introdução

A nectarina [*Prunus persica* (L.) Batsch var. *nucipersica*] é resultante de uma mutação genética natural ocorrida no pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch var. *vulgaris*], de pele lisa e brilhante. Embora somente um gene (G/g, pubescente/glabra) diferencie as variedades botânicas *vulgaris* e *nucipersica*, existem vários efeitos pleiotrópicos sobre os caracteres de fruto associados a este gene (Byrne et al. 2000).

Foi descoberta na China e melhorada nos Estados Unidos na década de 1950, despontando como uma estratégia para aumentar a disponibilidade de pêssego para consumo *in natura*, sendo que atualmente ocupa cerca de 40% do mercado de consumo fresco desta espécie (Byrne et al. 2012).

Com o intuito de conservar a variabilidade existente e fornecer suporte aos programas de melhoramento, o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Prunóideas iniciado em 1984 e mantido pela Embrapa Clima Temperado conta com acessos de frutas de caroço de diversas origens, entre as quais 96 acessos de nectarineiras, e a partir deste germoplasma mantido no BAG e enriquecido continuamente, cultivares vêm sendo lançadas no mercado.

No entanto, a estreita base genética originada por um número limitado de genitores tem restringido a variabilidade genética existente em *P. persica* (Aranzana et al. 2010). Vários trabalhos vêm sendo feitos com o intuito de caracterizar molecularmente os acessos e analisar a variabilidade genética, sendo os marcadores microssatélites considerados um dos mais adequados para estes estudos, em função de serem

1

Parte do projeto de Melhoramento genético de pessegueiro, nectarineira e ameixeira para adaptação às condições brasileiras. Capes/ MTC/ CNPq – REPENSA

2 Mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia - Fitomelhoramento – UFPel. Bolsista da CAPES. e-mail: [lianepel@yahoo.com.br](mailto:lianepel@yahoo.com.br)

3 Analista da Embrapa Clima Temperado, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia - Fitomelhoramento – UFPel. e-mail: [natercia.lobato@cpact.embrapa.br](mailto:natercia.lobato@cpact.embrapa.br)

4 Pesquisador da Embrapa Clima Temperado – CPACT - EMBRAPA/Pelotas. e-mail: [sandro.bonow@embrapa.br](mailto:sandro.bonow@embrapa.br);

[maria.bassols@embrapa.br](mailto:maria.bassols@embrapa.br); [caroline.castro@embrapa.br](mailto:caroline.castro@embrapa.br)

codominantes, altamente polimórficos e distribuídos ao acaso ao longo do genoma. Além disso, o alto nível de variação detectado reduz o número de marcadores necessários para distinguir os acessos (Bouhadida et al. 2011).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo a caracterização de acessos de nectarineira do BAG de Prunóideas e de seleções do programa de melhoramento genético da Embrapa com marcadores microssatélites, a fim de estimar a variabilidade genética presente.

## Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado, localizada no município de Pelotas, RS.

Trinta e dois genótipos representando a variabilidade de nectarineiras existente no BAG de Prunóideas e seleções do programa de melhoramento genético foram alvo do estudo. A caracterização molecular foi realizada com base em dez *loci* SSR (BPPCT002, BPPCT007, BPPCT014, BPPCT015, BPPCT017, BPPCT020, Pchgms3, UDP98-407, CPPCT006 e CPPCT022), previamente desenvolvidos para *Prunus persica*. A extração do DNA foi realizada de acordo com protocolo descrito por Ferreira and Grattapaglia (1998). O DNA foi quantificado com Fluorômetro e diluído a 10 ng/μL para as reações de amplificação via PCR. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 10 μL, contendo cada amostra 2,0 μL de DNA genômico (10ng/μL); 2,0 μL do *primer* (*forward* com iniciador M-13 e *reverse*) (Invitrogen) na concentração de 1,0 μM; 5,0 μL do mix Go Taq Green Master (Promega) e 1,0 μL do iniciador marcado M-13 com corante de fluorescência (M-13.FWD(-29)/IRDye 800 *Primer*) (LI-COR) na concentração de 1,0 μM. O programa de amplificação foi executado em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystems*) conforme segue: ciclo inicial de desnaturação a 94° por 1 minuto, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, anelamento de 50°C a 58°C (de acordo com a temperatura ideal de cada *primer*) por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, finalizando com um ciclo de extensão a 72°C por 4 minutos.

As reações de PCR foram diluídas com água milli-q estéril para uma concentração desejável com clara visualização dos fragmentos amplificados e posteriormente separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5% com sistema de análise de DNA do sequenciador LI-COR 4300 sendo o tamanho dos alelos dimensionado com o marcador de DNA de peso molecular de 50-350 pb (LI-COR). Para visualização, registro e análise dos fragmentos amplificados foi utilizado o software Saga GT (LI-COR).

Para cada *locus* SSR os amplicons foram pontuados como um (1) para alelo homozigoto, 0.5 para cada fragmento quando alelo heterozigoto e zero (0) para alelo 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 and Stuber 1983). Com base na matriz de distância genética foi construído um dendrograma pelo método de agrupamento da distância média UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). O ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ), conforme Sokal and Rohlf (1962), utilizando o programa NTSYS-pc (Rohlf 2005).

## Resultados e Discussão

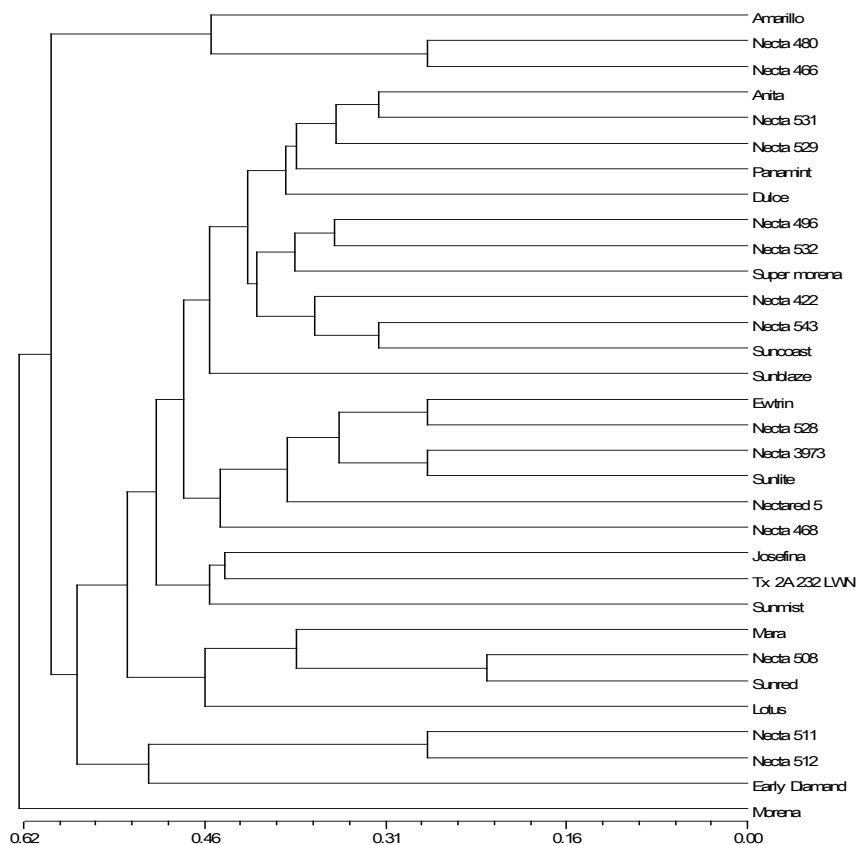
Todos os *loci* SSR analisados apresentaram polimorfismo entre os genótipos analisados. O número de alelos encontrados variou de dois (BPPCT014) a onze (BPPCT015). Um total de 52 alelos foram identificados, com média de 5,2 alelos por *locus*. O nível de polimorfismo foi semelhante ao encontrado por Aranzana et al. (2010) ao analisar 91 genótipos de nectarineira com 50 *loci* SSR (oito *loci* em comum com este estudo), onde encontraram uma média de 4,48 alelos por *locus*. Tal relação mostra a grande variabilidade genética encontrada no germoplasma avaliado.

A distância genética média geral entre os genótipos analisados foi de 0,52 variando desde 0,22,

entre os genótipos 'Sunred' x seleção Necta508, a 0,81, entre 'Sunred' x 'Amarillo'. Necta508 é resultante de polinização livre do cruzamento entre 'Sunred' x 'Rayon', justificando a menor variabilidade genética encontrada. A maior distância genética observada, entre os acessos alvo do estudo, é provavelmente justificada devido a 'Sunred', introdução da Flórida, ser bem adaptada às condições climáticas do sul do Brasil e apresentar baixa exigência em frio, já 'Amarillo', germoplasma introduzido da Bolívia, tem alta necessidade de frio e não frutifica nas condições climáticas do RS.

A análise de correlação cofenética entre o dendrograma e a matriz de dissimilaridade foi de 73,55%. Através do dendrograma resultante da análise dos 10 *loci* SSRs, não foi possível identificar uma estruturação no germoplasma, avaliada associada aos caracteres morfológicos, genealogia dos acessos e/ou local de origem.

Além disso, as cultivares de nectarineiras mais cultivadas no Brasil, Sunblaze e Josefina, e as cultivares lançadas pelo Programa de Melhoramento da Embrapa Clima Temperado, que foram avaliadas neste trabalho, Anita, Dulce e Mara, conservam a variabilidade genética existente no BAG, como pode ser observado na figura 1, tais cultivares estão em grupos distintos, mostrando que não houve um estreitamento da base genética, o que seria uma consequência do número limitado de genitores utilizados.



**Figura 1.** Dendrograma resultante da variação obtida por dez *loci* SSRs em 32 acessos de nectarineiras pelo método de agrupamento UPGMA com base na matriz de distância genética obtida pela Distância de Rogers modificada. O valor do coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ) é de 0,73. Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 2013.

A origem do germoplasma de nectarineiras avaliada neste estudo é diversa, com introduções de Programas de Melhoramento da Flórida, Texas, New Jersey, Califórnia, Arkansas, Espanha e Bolívia. Através dos resultados obtidos neste trabalho foi observado que grande variabilidade genética está sendo conservada nas nectarineiras do BAG de prunóideas da Embrapa Clima Temperado. Os resultados também mostram a manutenção da variabilidade genética nas cultivares lançadas pelo programa de melhoramento da Embrapa.

## Agradecimentos

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida ao primeiro autor.

## Referências

Aranzana MJ, Abbassi E, Howad W and Arús P. (2010) Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. **BMC Genetics** **11**: 69.

Byrne DH et al. (2012) Peach. In: Badenes ML and Byrne DH (Eds.). **Fruit Breeding: Handbook of Plant Breeding**. Springer Science+Business Media, New York, p. 505-569.

Byrne DH, Sherman WB and Bacon TA (2000) Stone fruit genetic and its exploitation for growing under warm winter conditions. In: Erez A (Ed.). **Temperate fruit crops in warm climates**. Kluwer, Boston, p. 157-230.

Bouhadida M et al. (2011) Genetic variability of introduced and local Spanish peach cultivars determined by SSR markers. **Tree Genetics e Genomes** **7**: 257-270.

Ferreira ME and Grattapaglia D (1998) **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Embrapa-Cenargen, Brasília, 220p.

Goodman MM and Stuber CW (1983) Races of maize: VI. Isozyme variation among races of maize in Bolívia. **Maydica** **28**: 169-187.

Rohlf FJ (2005) **NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Applied Biostatistics, Setauket v. 2.2.

Sokal RR and Rohlf FJ (1962) The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon** **11**: 33-40.