

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

**Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal**



Dissertação

**Caracterização da descendência híbrida e segregação de  
marcadores microssatélites em uma população F<sub>2</sub> de  
*Prunus* sp.**

**Luciana Rodrigues Nogueira Machado**

Pelotas, 2011

# **LUCIANA RODRIGUES NOGUEIRA MACHADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Msc. (área do conhecimento: Fisiologia Vegetal).

Orientador: Prof. Dr. Valmor João Bianchi

Co-Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eugênia Jacira Bolacel Braga

Prof. Dr. José Antonio Peters

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz - CRB 10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M149c      Machado, Luciana Rodrigues Nogueira  
                Caracterização da descendência híbrida e segregação de  
                marcadores microssatélites em uma população F2 de *Prunus*  
                sp. / Luciana Rodrigues Nogueira Machado. – 56f. : fig. –  
                Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em  
                Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Instituto  
                de Biologia. Pelotas, 2011. – Orientador Valmor João  
                Bianchi ; co-orientador Eugênia Jacira Bolacel Braga, José  
                Antônio Peters.

1.*Prunus persica* L. 2.Microssatélites. 3.Porta-enxerto.  
4.Resistência a nematóides. 5.Teste de paternidade.  
6.Mapeamento genético. I.Bianchi, Valmor João. II.Braga,  
Eugênia Jacira Bolacel. III.Peters, José Antônio. IV.Título.

CDD:

634.25

**Banca examinadora:**

Dr. Valmor João Bianchi

Dra. Caroline Marques Castro

Dr. Willian Silva Barros

Dra. Elizete Beatriz Radmann

Dedico

*A minha amada mãe Marlene e  
Meu amado marido Aquiles Jônatas*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela coragem e determinação para seguir em frente e acreditar que é possível. Agradeço imensamente aos meus amados pais, Marlene Garcia Rodrigues e Ary Borges Nogueira, pelo amor e carinho a mim dedicado e por compreenderem a minha ausência.

Agradeço imensamente ao meu marido Aquiles Jônatas de Souza Machado, pelo amor, dedicação, apoio e pela compreensão.

A minhas primas, Prof<sup>a</sup> Sandra Oliveira Soares e Prof<sup>a</sup> Leila Oliveira Soares, por todo apoio concedido e por acreditarem em mim.

Ao meu orientador Dr. Valmor João Bianchi, pelos ensinamentos e por acreditar na minha capacidade, mesmo eu sendo de outra área.

Aos professores, Dr. José Antonio Peters, Dr. Nei Fernandes Lopes e Dra. Eugenia Braga, pelos ensinamentos de grande valia.

As amigas: Cibele Gallo, Rose Meri Merched e Maria Lúcia Balbinoti, pelo carinho e apoio dedicados.

A todos os colegas de laboratório, em especial as Doutorandas Daiane Benemann, Alírcia Moraes e Márcia Ribeiro, Mestranda Raquel Costa, pelos agradáveis momentos ao longo destes dois anos de convivência.

Ao estagiário Renan Goulart, pelo manejo das minhas plantas.

Ao mestrando Luis Willian Pacheco Arge, pela imensa ajuda prestada, sem a qual este trabalho não seria possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realizar o mestrado e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos aqueles que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

*“Se você pensar que pode, ou que não pode,  
de qualquer modo você estará certo”*

Henry Ford

## RESUMO

NOGUEIRA-MACHADO, Luciana Rodrigues. **Caracterização da descendência híbrida e segregação de marcadores microssatélites em uma população F<sub>2</sub> de *Prunus* sp.**. 2011. 56f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O pessegueiro (*Prunus persica* (L) Batsch) é a frutífera de caroço mais predominante em todo mundo, porém, no Brasil, devido a fatores como incidência de pragas nos pomares, baixa qualidade fitossanitária do material propagativo e falta de porta-enxertos adequados para a cultura, a produção ainda é considerada baixa. Neste contexto, existe a grande necessidade de desenvolver novos porta-enxertos de *Prunus*, mais adaptados as condições edafoclimáticas da Região Sul do Brasil e portadores de genes de resistência a pragas, dentre as quais os fitonematóides. No presente trabalho, locos de microssatélites (SSR) foram utilizados com o objetivo de verificar a descendência e a segregação de marcadores em genótipos híbridos da população F<sub>2</sub> de porta-enxertos de pessegueiro, obtida a partir de cruzamento controlado, gerando dados para auxiliar na seleção assistida por marcadores (SAM) de novos genótipos portadores de genes de resistência a nematóides das galhas. Esta dissertação foi dividida em dois artigos, no primeiro, foi realizado um teste de paternidade, para verificar a descendência de 13 híbridos provenientes de diversos cruzamentos controlados entre diversos porta-enxertos e copas com características agrônomicas desejáveis. Obteve-se confirmação da paternidade para 11 dos 13 híbridos analisados. Dois genótipos, supostamente descendentes de *Prunus mume* como parental masculino, foram confirmados como sendo gerados por autofecundação da cultivar Aldrichi. No segundo artigo, foi construído um mapa de ligação para uma população de 50 plantas F<sub>2</sub> obtidas por autofecundação de um híbrido F<sub>1</sub>, proveniente do cruzamento entre os pessegueiros cv. 'Capdeboscq' x 'Flordaguard', onde a segregação de 37 locos SSR foi avaliada e 11 marcadores apresentaram ligação, permitindo a elaboração de um mapa com dois grupos. Verificou-se que os marcadores BPPCT004, CPDCT044, BPPCT034 e BPPCT002 foram agrupados de forma similar ao encontrado no GL2 do mapa de referência de *Prunus*. Com os dados obtidos, sugere-se que estes locos SSR, estejam associados a genes de resistência a *Meloidogyne* spp., em diferentes populações de mapeamento, sendo neste caso herdados do porta-enxerto 'Flordaguard' e poderão ser utilizados diretamente em SAM e melhoramento genético de porta-enxertos do cruzamento entre os pessegueiros cv. 'Capdeboscq' x 'Flordaguard'.

Palavras-chave: *Prunus persica*, porta-enxerto, resistência a nematóides, teste de paternidade, mapeamento genético, microssatélites.

## ABSTRACT

NOGUEIRA-MACHADO, Luciana Rodrigues. **Characterization of hybrid offspring and segregation of microsatellite markers in an F<sub>2</sub> population of *Prunus* sp.** 2011. 56f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The peach (*Prunus persica* (L) Batsch) is the predominant stone fruit around the world, but in Brazil, due to factors such as incidence of pests in orchards, low quality plant propagation material and the lack of suitable rootstocks culture, the productivity is still considered low. In this context, is necessary to develop new rootstocks of *Prunus*, more adapted to the ecological conditions of the Southern region of Brazil and carrying genes for pests resistance such as nematodes. In this study, microsatellite loci (SSR) were used to verify the hybrid offspring of genotypes and makers segregation in an F<sub>2</sub> population of peach rootstocks, obtained from controlled crosses, generating data to marker-assisted selection (MAS) of new genotypes carrying genes for nematode resistance. This work was divided in two articles; the first was a paternity test to verify the paternal and maternal offspring of 13 hybrids from controlled crosses between several rootstocks and scion with desirable agronomic traits. We obtained confirmation of paternity for 11 of the 13 hybrids analyzed. Two genotypes, presumably descendants of *Prunus mume* as male parent, were confirmed as being generated by selfing of genotype Aldrichi P1. In the second article, a linkage map was constructed for a population of 50 F<sub>2</sub> plants obtained by selfing of F<sub>1</sub> hybrid, derived from a cross between the peaches 'Capdeboscq' x 'Flordaguard'. The segregation of 37 SSR loci was evaluated and 11 markers showed a link, allowing us to build a map with two groups. It was found that the markers BPPCT004, CPDCT044, BPPCT034 and BPPCT002 were grouped in a manner similar to that found in the GL2 *Prunus* reference map. With the data obtained suggests that these SSR loci are associated with genes for resistance to *Meloidogyne* spp. in different mapping populations, in which case inherited from the rootstock 'Flordaguard', and may be used directly in SAM and improvement genetic peach rootstocks derived from a cross between 'Capdeboscq' x 'Flordaguard'.

Keywords: *Prunus persica*, rootstock, root-knot nematodes resistance, paternity test, genetic mapping, microsatellite markers.

## SUMÁRIO

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 1. Introdução geral.....     | 10 |
| 2. Referências.....          | 14 |
| Artigo 1 .....               | 16 |
| Resumo.....                  | 17 |
| Abstract.....                | 18 |
| Introdução .....             | 19 |
| Material e Métodos .....     | 21 |
| Resultados e Discussão ..... | 23 |
| Conclusão .....              | 28 |
| Agradecimentos.....          | 28 |
| Referências.....             | 29 |
| Lista de Figuras.....        | 33 |
| Lista de Tabelas.....        | 34 |
| Artigo 2 .....               | 36 |
| Resumo.....                  | 37 |
| Abstract.....                | 38 |
| Introdução .....             | 39 |
| Material e Métodos .....     | 42 |
| Resultados e Discussão ..... | 44 |
| Conclusão.....               | 48 |
| Agradecimentos.....          | 48 |
| Referências.....             | 49 |
| Lista de Tabelas.....        | 53 |
| Lista de Figuras.....        | 55 |
| Considerações finais.....    | 56 |

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A família Rosaceae compreende cerca de 100 gêneros e 3.000 espécies, sendo uma das maiores famílias de Angiospermas e uma das mais importantes do ponto de vista econômico, estando concentrada no Hemisfério Norte. No Brasil, são cultivados nove gêneros e cerca de vinte e cinco espécies. Um dos membros desta família é o gênero *Prunus*, que compreende o pessegueiro (*Prunus persica* L.) Batsch), a nectarineira (*Prunus persica* var. *nucipersica*), a ameixeira européia (*Prunus domestica* L.), ameixeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl) a amendoeira (*Prunus dulcis* Mill.) D. A. Webb), o umezeiro (*Prunus mume* Sieb & Zucc.), as cerejeiras (*Prunus avium* L. e *Prunus cerasus* L.) e o damasqueiro (*Prunus armeniaca* L.).

O pessegueiro é uma espécie diplóide nativa da China, com  $2n=16$  e  $n=8$  cromossomos, predominantemente autógama, com menos de 5% de fecundação cruzada (SCORZA; MEHLENBACHER; LIGHTNER, 1985). É uma das frutíferas de caroço mais predominantes em todo mundo, cuja distribuição mundial é reflexo do seu cultivo extensivo. Segundo dados da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) em 2008, a produção mundial de pêssegos ultrapassou os 18 milhões de toneladas, sendo a China, Itália, Estados Unidos e Espanha os maiores produtores.

Na América do Sul, destacam-se a Argentina, o Chile e o Brasil, que ocupa a décima segunda posição mundial, com uma produção anual de 190 mil toneladas, (IBGE, 2008) onde 54% desta produção está concentrada no estado do Rio Grande do Sul (AGRIANUAL, 2008). Embora o RS seja o principal produtor brasileiro, a produção média do estado ainda é considerada baixa, em 2008 foram colhidas cerca de 129 mil toneladas (IBGE, 2008).

Aliada a essa baixa produção estão diversos fatores, dentre eles a incidência de pragas de solo e a falta de porta-enxertos adequados para a cultura. No Brasil, ao contrário de outros países, o melhoramento genético de porta-enxertos para frutíferas de caroço tem assumido importância apenas há poucos anos (CAMPOS, 2005). Dentre as pragas e doenças que afetam a produção de frutíferas de clima temperado, os fitonematóides assumem grande importância em virtude dos sérios prejuízos causados às plantas (RASEIRA; QUEZADA, 2003).

O nematóide das galhas (*Meloidogyne spp.*) é um fitonematóide que ataca quase todas as culturas de alimentos no mundo, constituindo grandes ameaças a fruticultura mundial, no caso do pessegueiro, é fator limitante à produção, causando sérias perdas econômicas, podendo levar a morte do pomar em casos de infestação intensa (ROSSI; FERRAZ; MONTALDI, 2002; BALDWIN; NADLER; ADAMS, 2004). Os nematóides causadores de galhas são endoparasitas sedentários, e formam uma interação muito complexa com a planta hospedeira (FRAGOSO et al., 2005), alterando sua fisiologia e formando sítios de alimentação permanentes, cujas consequências são colheitas reduzidas, produtos de baixa qualidade ou não comercializáveis.

Dentro do gênero *Meloidogyne*, que contém mais de 70 espécies descritas, as quatro espécies mais comuns (*Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria* e *Meloidogyne hapla*) correspondem por 95% de todas as infestações em áreas agrícolas, causando perdas econômicas mundiais de US\$ 125 bilhões anualmente (DHANDAYDHAM et al., 2008). Além destas espécies, o nematóide anelado, *Mesocriconema xenoplax*, associado à morte precoce do pessegueiro, leva a perdas consideráveis, principalmente em solos arenosos, onde a vida útil dos pomares é menor se comparada aos conduzidos em solos argilosos.

O controle químico dos fitonematóides através do uso de nematicidas é antieconômico e antiecológico, uma vez que o custo pode chegar a três vezes a soma dos gastos com controle de outras pragas e além de ser pouco eficiente, pode causar sérios problemas à saúde humana. E no Brasil, não há nematicida registrado para a cultura do pessegueiro.

Desta forma, em função da elevada demanda por outras tecnologias para o controle de fitonematóides, uma solução têm sido identificar e utilizar genótipos contendo genes de resistência a esta praga (*R* genes), que para Huang (2006) é o método mais eficaz e ambientalmente sustentável para redução dos danos causados às culturas de alimentos. Sendo assim, o desenvolvimento ou utilização de métodos que busquem melhorar a eficiência de seleção e cultivo em frutíferas de caroço, têm valor considerável e a aplicação da seleção assistida por marcadores (SAM), bem como a correta identificação varietal das cultivares, vêm a ser uma alternativa na busca de genes de resistência.

A busca por porta-enxertos resistentes a nematóide das galhas é um projeto longo e envolve vários países, dentre eles o Brasil, que realiza diversas pesquisas nesta área. Desde 1998, a Universidade Federal de Pelotas desenvolve um trabalho de avaliação de porta-enxertos de *Prunus*, visando selecionar genótipos mais adaptados as condições climáticas locais e que possuam resistência a nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.).

Atualmente a Universidade Federal de Pelotas conta com um banco de germoplasma com porta-enxertos de diversas partes do mundo, dentre eles, as cultivares Nemaguard, Nemared e Okinawa que são as três cultivares comumente conhecidas por apresentarem resistência a nematóide das galhas, porém várias das

cultivares introduzidas são deficientes em uma ou mais características, como a alta necessidade de frio para a superação da dormência, o que resulta em problemas de adaptação climática a região sul do Brasil. A cultivar Flordaguard é uma terceira geração de 'Okinawa', proveniente da Flórida, apresenta folhas avermelhadas e resistência a nematóides, já as cultivares copa Capdeboscq e Aldrighi, são materiais selecionados no Brasil e suscetíveis a *Meloidoyne* spp., porém requerem baixa exigência em frio, estando bem adaptadas as condições ambientais sul brasileiras.

Sendo assim, visto que existe grande necessidade de desenvolver novos genótipos mais adaptados às condições edafoclimáticas do sul do Brasil, e portadores de genes de resistência à nematóide das galhas, pesquisadores da Universidade Federal de Pelotas realizaram diversos cruzamentos entre porta-enxertos com características agronômicas desejáveis, obtendo genótipos híbridos entre os anos de 2003 a 2006.

O objetivo deste trabalho foi confirmar a descendência destes novos híbridos, através de teste de paternidade, e verificar a ligação de marcadores moleculares em uma população de mapeamento, gerada a partir de um destes híbridos, contribuindo com dados que auxiliem na seleção assistida por marcadores (SAM) de novos genótipos portadores de genes de resistência a nematóide das galhas.

Esta dissertação foi escrita na forma de dois artigos científicos, o primeiro trata da comprovação da descendência de híbridos provenientes de diversos cruzamentos entre porta-enxertos e cultivares copa de *Prunus*. No segundo artigo foi estudada a segregação de marcadores em uma população F<sub>2</sub> obtida de um híbrido derivado do cruzamento entre os porta-enxertos 'Flordaguard' e 'Capdeboscq'.

## 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL: **Anuário de agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2008. 409p.

BALDWIN, J. G.; NADLER, S. A.; ADAMS, B. J. Evolution of plant parasitism among nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 83-105, 2004.

CAMPOS, R. V. **Estabelecimento, multiplicação e enraizamento *in vitro* de porta-enxerto de *Prunus* spp.** Pelotas. 2005. 67p. Dissertação (Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado) Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

DHANDAYDHAM, M.; CHARLES, L.; ZHU, H.; STARR, J.; HUGUET T.; COOK, D.; PROSPERI, J. M.; OPPERMAN, C. Characterization of Root-Knot Nematode Resistance in *Medicago truncatula*. **Journal of Nematology**, Saint Paul, v. 40, p. 46-54, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS  
Disponível em <[faostat.fao.org/site/339/default.aspx](http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx)> acesso em 13 de setembro de 2010.

FRAGOSO, R. R.; BATISTA, J. A.; NETO, O. B.; GROSSI DE SA, M. F. Isolation and characterization of a cDNA encoding a serine proteinase from the rootknot nematode *Meloidogyne incognita*. **Experimental Parasitology**, Parkville, v. 110, n. 2, p.123-33, 2005.

HUANG, R. A. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene Guozhong. Disponível em<[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.06046](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.06046)> Acesso em 21 de agosto de 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em [www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=rs&tema=lavourapermanente2008](http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=rs&tema=lavourapermanente2008) acesso em 13 de Setembro de 2010.

RASEIRA, M. do C. B.; QUEZADA, A. C. **Pêssego: Produção**. Embrapa Clima Temperado-Pelotas-RS. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, 164p.

ROSSI, C. E. ; FERRAZ, L. C. C. B.; MONTALDI, P. T. Resistência de frutíferas de clima subtropical e temperado a *Meloidogyne incognita* raça 2 e *M. javanica*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 43-49, 2002.

SCORZA, R.; MEHLENBACHER, S. A.; LIGHTNER, G. W. Inbreeding and coancestry of freestone peach cultivars of the Eastern United States and implications for peach germoplasm improvement. **American Society for Horticultural Science Journal**, Alexandria, v. 110, p. 547-552, 1985.

## **ARTIGO 1**

# **COMPROVAÇÃO DA PATERNIDADE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PORTA-ENXERTOS DE PESSEGUEIRO COM MARCADORES MICROSSATÉLITES**

(De acordo com as normas da revista Pesquisa Agropecuária Brasileira)

## **Comprovação da paternidade e caracterização molecular de porta-enxertos de pessegueiro com marcadores microssatélites**

Luciana Rodrigues Nogueira Machado<sup>(1)</sup>; Luis Willian Pacheco Arge<sup>(1)</sup> e Valmor João Bianchi<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, CEP 96010-900 - Capão do Leão, RS - Caixa-Postal: 354. Email: luciana.r.nogueira@gmail.com, valmorjb@yahoo.com, lwillianpacheco@hotmail.com

**Resumo-** Treze genótipos híbridos provenientes de cruzamentos controlados entre porta-enxertos de pessegueiro foram avaliados para comprovar a descendência paterna e materna. A determinação da paternidade foi realizada para todos os indivíduos descendentes, através de um processo contínuo de exclusão de paternidade, que incluiu caracterização da cor das folhas e identificação de alelos. Foram avaliados 13 locos de microssatélites, dos quais 10 locos foram marcadores, com média de 4.3 alelos por loco. A caracterização molecular permitiu a separação dos genótipos de acordo com sua origem ou descendência. De um total de oito cruzamentos controlados, obteve-se confirmação de descendência para todos 13 genótipos, sendo 11 deles híbridos e dois genótipos comprovadamente gerados por autofecundação. Os marcadores BPPCT008 e BPPCT024 segregam entre os parentais e permitem diferenciar todos os genótipos com polimorfismos entre 265 e 115 pares de base, exceto as plantas de 'Aldrighi' e seus descendentes por autofecundação. Sendo assim, estes marcadores podem ser empregados em estudos de melhoramento genético e identificação varietal de porta-enxertos de pessegueiro descendentes de 'Capdeboscq' x 'Flordaguard'.

**Termos para indexação:** *Prunus persica*; descendência híbrida; SSR melhoramento genético; identificação varietal

## **Parentage testing and molecular characterization in peach rootstocks with microsatellite markers**

**ABSTRACT-** Thirteen hybrid genotypes from different controlled crosses between peach rootstocks were assessed to establish the paternal and maternal descent. The determination of paternity was performed for all genotypes descended through a continuous process of paternity exclusion, which included determination of leaf color, identification of alleles and grouping (cluster). We evaluated 13 loci microsatellite and identified 10 loci markers with 4.3 alleles per locus. Of the eight crosses made, was obtained confirmation of paternity for all, 11 derived from crossing and two genotypes generated by selfing. The markers BPPCT008, BPPCT024 segregate between the parents and allow to differentiate all genotypes with polymorphisms between 265 and 115 base pairs, except 'Aldrighi' plants and their progeny by selfing. Thus, these markers can be used in studies of breeding and varietal identification of rootstocks of peach descendants 'Capdeboscq' x 'Flordaguard.'

Index terms: *Prunus persica*; hybrid offspring; SSR; genetic improvement; varietal identification

## Introdução

O gênero *Prunus* inclui uma grande diversidade de espécies, originadas principalmente no hemisfério Norte e distribuídas por todo mundo. A classificação botânica das espécies, dentro deste gênero é, às vezes, controversa, devido à facilidade de cruzamentos interespecíficos, onde surgem vários híbridos intermediários, quebrando limites entre as espécies (Casas et al., 2004).

A identificação de híbridos do gênero *Prunus*, através de características morfofenológicas, pode deixar dúvidas sobre a verdadeira identidade dos acessos, devido às semelhanças entre estas características, facilmente influenciáveis por fatores relacionados ao ambiente e o estágio de desenvolvimento da planta. No caso de porta-enxertos, é muito difícil observar suas características após a enxertia, e ainda há um problema adicional em diferenciar cultivares derivadas do mesmo cruzamento, ou que possuam parentes em comum, onde nesses casos, as diferenças se tornam ainda menores (Bianchi et al., 2004; Casas et al., 2004).

Além dos dados morfofenológicos, a verificação da descendência, através de marcadores moleculares, é um passo fundamental para estimar com precisão parâmetros genéticos e de diversidade entre genótipos, dando garantias de fidelidade genética em qualquer estágio do desenvolvimento da planta, principalmente quando se trata de cruzamentos que envolvem vários genitores em comum (Bianchi et al., 2004; Cupertino et al., 2009).

Em função da estreita base genética dentro do gênero *Prunus* e devido à baixa variabilidade entre muitos genótipos, a identificação é difícil com marcadores bioquímicos como isoenzimas, ou moleculares como RAPD, que apresenta baixa

reprodutibilidade dos resultados e possui caráter dominante, não permitindo diferenciar alelos homozigotos de heterozigotos.

Atualmente, para estudos de diversidade e caracterização genética de cultivares têm sido dada grande ênfase ao uso de dos marcadores moleculares de microssatélites (SSR), que apresentam altos níveis de polimorfismo, herança codominante e possibilitam resultados confiáveis em análises de diversidade genética (Yamamoto & Hayashi, 2002). A variabilidade destes marcadores já foi observada em diferentes espécies do gênero *Prunus* (Sosinski et al., 2000; Testolin et al., 2000; Aranzana et al., 2002; Bianchi et al., 2004ab; Bouhadida et al., 2009).

A elevada frequência polimórfica dos marcadores de microssatélites é uma das características importantes que permitiu a Tetsuya (2004) determinar a paternidade de 60 variedades de pêra japonesa (*Pyrus pyrifolia*) de seis gêneros da Ásia, enquanto que Cupertino et al. (2009) determinou o grau de parentesco de 14 famílias de irmãos completos de genótipos elite de *Eucalyptus*. Grattapaglia et al. (2004) demonstraram que a utilização de marcadores de microssatélites foi uma estratégia eficiente para determinar a paternidade, na criação de novos genótipos e melhoramento genético de *Eucalyptus*.

A caracterização molecular associada a estudos de variabilidade genética permite selecionar indivíduos que poderão compor um banco de germoplasma, ou ainda, serem utilizados em melhoramento genético. Estudos de similaridade genética e frequência alélica possibilitam compreender de que forma um alelo aparece em uma determinada população e simplificam a identificação em casos de sinonímia e homonímia em um amplo número de cultivares, facilitando a seleção dos indivíduos e resolvendo casos de controvérsias de denominação (Paula, 2009).

Considerando a estreita base genética do pessegueiro, o presente trabalho objetivou testar o poder discriminatório de marcadores de microssatélites para comprovar a descendência e verificar a diversidade genética, de híbridos derivados de cruzamentos controlados entre diferentes genótipos de porta-enxertos de *Prunus*.

### Material e métodos

No presente trabalho foram avaliados 21 genótipos, dos quais 13 são híbridos obtidos por cruzamentos controlados, realizados entre os anos de 2003 a 2006, e os demais são porta-enxertos e cultivares copa de pessegueiro que foram utilizadas como parentais, conforme apresentado na Tabela 1. Para as análises, foram coletadas folhas jovens completamente expandidas, no mês de dezembro de 2010 e armazenadas em ultrafreezer até o processamento. Para alguns cruzamentos, o caractere morfológico cor da folha foi utilizado como controle do cruzamento, onde o doador de pólen tinha cor avermelhada da folha, uma vez que esta característica é dominante sobre a cor verde.

As análises para determinação da paternidade foram realizadas no Laboratório Cultura de Tecidos de Plantas, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Brasil.

O DNA foi extraído a partir de amostras contendo 50 mg de folhas jovens e frescas, usando o método descrito por Doyle & Doyle (1991) e depois quantificado em gel de agarose 0,8%, usando como padrão o DNA de Fago *Lambda* digerido com *Hind* III, após procedeu-se a diluição das amostras para a concentração de 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

As reações de PCR foram feitas com 20 ng de DNA genômico de cada amostra; 2,5 µl de 10X PCR buffer; 1,7 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5 µM de cada *primer*; 0,2 µM de dNTPs; 0,8U de *Taq* polimerase e água Milli-Q para um volume final de 25 µl. As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador, da marca Bio-Rad modelo Icycler, de acordo com o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 50-60°C por 45s, 72°C por 1 min, e 1 ciclo de 72°C por 10 min, 4°C por 5 min. Treze locos microssatélites foram incluídos neste estudo, sendo que somente dez foram efetivamente utilizados (Tabela 1). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, segundo o método descrito por Bassan et al. (1991).

O perfil eletroforético da população foi registrado para presença (1) e para ausência de alelos (0) em cada loco, os dados binários foram utilizados para o cálculo da similaridade genética e elaboração do dendrograma, para as demais análises estatísticas o perfil eletroforético foi codificado como: (11) homozigoto dominante, (22) homozigoto recessivo e (12) heterozigoto. O cálculo do coeficiente de endogamia (F), heterozigosidade esperada (HE), heterozigosidade observada (HO) e conteúdo de informação polimórfica (PIC), foram calculados utilizando-se o software Genes (Cruz, 2008).

A determinação da paternidade foi realizada para todos os indivíduos descendentes através de um processo seqüencial de exclusão de paternidade, que incluiu avaliação do caractere morfológico cor de folha e identificação de alelos. A caracterização molecular dos indivíduos foi realizada por análise de agrupamento a partir dos dados obtidos (dendrograma), onde similaridade genética foi calculada pelo Coeficiente de Jaccard e o agrupamento dos genótipos foi realizado pelo

método UPGMA (Unweighted Pair Group Mean Average), utilizando o software NTSYS pc versão 2.1 (Rohlf, 2001).

## Resultados e discussão

Treze locos microssátélites foram avaliados, e destes, 10 (77%) apresentaram polimorfismo e foram empregados na determinação da paternidade. Apenas o loco BPPCT033 apresentou amplificação inconsistente, o loco BPPCT018 foi monomórfico para todos os genótipos (com um alelo de aproximadamente 330 pares de base). O loco UDP97-402 gerou apenas um polimorfismo para o genótipo *Prunus mume* e para os demais genótipos de *P. persica* avaliados apresentou apenas um alelo de aproximadamente 110 pares de base (pb), não sendo empregado nas análises de diversidade genética e agrupamento.

No dendrograma (Figura 1), baseado na similaridade média de 0,39, é nítida a tendência de agrupamento dos 21 genótipos em função de sua região de origem e descendência. O genótipo *Prunus mume* (Sieb & Zucc) ficou posicionado separadamente dos demais genótipos, não compartilhando alelos com os demais genótipos avaliados, justificável por se tratar de uma espécie diferente. Para Mayer (2001), a utilização do *Prunus mume* (umezeiro ou damasqueiro-japonês) como porta-enxerto de *Prunus* sp. vem despertando grande interesse em função de sua rusticidade, resistência a pragas e doenças, adaptação e, principalmente, por reduzir o porte de pessegueiros e nectarineiras. Estas características foram levadas em consideração na escolha dos genitores no presente trabalho, na tentativa de obter híbridos interespecíficos com melhor adaptação e compatibilidade de enxertia com genótipos de pessegueiro.

O resultado do cruzamento dirigido entre Aldrighi P1 (genitor materno) e ‘*Prunus mume*’ (genitor paterno) resultou nos genótipos NR0580601 e NR0580602, os quais foram avaliados quanto à descendência híbrida. Verificou-se que ambos os genótipos apresentaram 100% de similaridade com a planta mãe, revelando se tratar de materiais obtidos por autofecundação e não derivados do cruzamento, pois conforme pode ser observado na Tabela 1, estes genótipos possuem alelos idênticos as cultivares Aldrighi P1 e P2.

Foi observado que as cultivares copa de pessegueiro Aldrighi e Capdeboscq, ficaram agrupadas próximas, com cerca de 60% de similaridade. Estes resultados corroboram com o encontrado por Paula (2009) em estudos de diversidade genética entre porta-enxertos de pessegueiro, onde estas duas cultivares também ficaram agrupadas próximas, como similaridade genética média em torno de 67%.

As cultivares Aldrighi e Capdeboscq foram selecionadas na região de Pelotas-RS-Brasil, sendo empregadas por décadas pelas indústrias conserveiras, e seus caroços foram aproveitados por muito tempo para produção de porta-enxertos para pessegueiro e ameixeira, devido a boa taxa de germinação e adaptação as condições climáticas da região. Ambas cultivares são utilizadas em cruzamentos controlados para transferir estas características. Entretanto, ambas são suscetíveis a *M. incognita* (Kofoed e White) Chitwood, desta forma, é necessário cruzá-las com genótipos que apresentem resistência a pragas, para incorporar essa característica ao porta-enxerto.

Muito embora os dois genótipos de ‘Aldrighi’, (‘Aldrighi P1’ e ‘Aldrighi P2’) avaliados sejam *seedlings* obtidos por livre polinização, verifica-se que se trata de material com alto nível de homozigose, uma vez que não foi possível detectar variabilidade genética entre as plantas, com os locos microssatélites testados

(Figura 1; Tabela 1). Entretanto, no caso do cruzamento entre ('Flordaguard' x 'Capdeboscq'), o híbrido NR0080408 apresentou 77% de similaridade com o genitor feminino 'Flordaguard', e os demais híbridos derivados do mesmo cruzamento (NR0080407 e NR0080412), apresentaram similaridades em torno de 53 a 65% com a planta mãe, mostrando que neste cruzamento ocorreu variabilidade genética mesmo entre irmãos completos (Figura 1). Este fato também foi relatado por Grattapaglia et al. (2004) em plantas de *Eucalyptus* analisadas por marcadores microssatélites.

O agrupamento formado pelas cultivares de origem japonesa, Tsukuba\_1 e Okinawa, confirma claramente a separação dos genótipos de acordo com suas origens e a associa os híbridos derivados destes cruzamentos com pelo menos uma das cultivares. Estes resultados concordam com o encontrado por Cheng & Huang (2009) em trabalhos realizados para *Prunus persica* de origem chinesa caracterizados com sete marcadores microssatélites, onde as 32 cultivares agruparam-se de acordo com a região de procedência.

Dos oito cruzamentos realizados, obteve-se confirmação de descendência para os 13 genótipos analisados, destes, 11 são híbridos e dois são derivados de autofecundação. A avaliação do caractere cor da folha corrobora com os resultados, pois a exceção dos híbridos NR0170301 e NR0170302, derivados do cruzamento entre 'Okinawa' e 'Nemaguard', ambos com folhas verdes, os demais híbridos têm folha avermelhada, tendo herdado essa característica dos pais, confirmando a descendência pela análise deste caractere.

No presente estudo, foram observados 2 alelos por genótipo, comprovando que todos o indivíduos avaliados são diplóides.

Ao avaliar os dados de diversidade, observa-se que o valor médio de 4,3 alelos identificado por loco (Tabela 1) Este valor é bastante similar ao encontrado por Testolin et al. (2000) e Sosinski et al. (2000) onde 4,5 e 3,0 alelos por loco foram encontrados em 50 e 28 cultivares de *P. persica*, respectivamente. Aranzana et al. (2002) obtiveram 7,3 alelos por loco em um conjunto de 212 cultivares de pessegueiro analisada com 16 marcadores microssatélites polimórficos. Desta forma, é visto que o número médio de alelos por locos o número de alelos por loco está associado com o número de amostras e número de SSRs utilizados no estudo, isto ocorre também em comparação com a outras espécies, como amêndoeira (*P. dulcis*) com valor médio de 6,6 em 31 marcadores SSRs avaliados (Shiran et al., 2007).

A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) foi menor que a esperada ( $H_e$ ) para todos os locos, enquanto que a heterozigosidade média revelada no presente estudo foi 0,34, sendo considerada baixa se comparada com 0,45 obtida para cultivares de pessegueiro chinês (Cheng & Huang, 2009) e também em comparação com outras espécies do gênero, como damasqueiro (*P. armeniaca*) com 0,52 (Zhebentyayeva et al., 2003) e cerejeira (*P. avium*) com 0,95 (Cantini et al., 2001).

Em geral, a baixa diversidade de alelos registrada, em comparação com outras cultivares e espécies do gênero *Prunus* se dá pelo compartilhamento de alelos entre os genótipos, devido ao modo como os cruzamentos foram desenvolvidos, onde vários parentais são comuns, além da presença de alelos nulos, principalmente verificados em elevado número em *P. mume* (Tabela 1).

Considerando que os locos SSR avaliados são todos derivados do genoma do pessegueiro, verificou-se que apenas 30% dos locos não produziram amplificação no genótipo *P. mume*, gerando os chamados alelos nulos, sendo um

resultado esperado quando se trata de espécies diferentes, porém 70% dos locos apresentaram transferabilidade em *Prunus mume*. Este dado é muito similar ao verificado por Pierantoni et al., 2004, os quais obtiveram uma transferabilidade de aproximadamente 78% dos marcadores SSRs desenvolvidos para macieira, em uma população de pereiras Européias. Os dados aqui obtidos, embora ligeiramente abaixo deste valor, evidenciam que é possível avaliar a diversidade genética de espécies relacionadas, através de marcadores moleculares microssatélites.

O coeficiente de endogamia (F) teve média 0,50, demonstrando que o número de alelos idênticos por descendência não é demasiadamente elevado, mesmo se tratando de indivíduos aparentados. O conteúdo de informação polimórfica (PIC), revelou valores superiores a 0,50 para todos os locos (média 0,62), destacando-se BPPCT008 e BPPCT024, que permitiram diferenciar todos os genótipos, revelando apenas 1 e 2 alelos nulos, respectivamente, e os polimorfismos gerados tiveram tamanho aproximado de 265 a 115 pares de base (Tabela 1).

Os híbridos que tiveram sua descendência confirmada estão em fase de avaliação para resistência a nematóide das galhas, dos quais o genótipo NR0080407 (Paula, 2009) e NR0040412 e NR0130408 (Bianchi et al., 2010) já foram testados e mostraram-se imunes a *M. incognita* (Kofoid e White) Chitwood e poderão ser utilizados como novos porta-enxertos no melhoramento genético de *Prunus*. Embora o número de cultivares e locos SSRs empregados neste estudo seja limitado, os dados gerados apresentam potencial para uso em estudos de comprovação genética e identificação de cultivares de pessegueiro.

## **Conclusão**

1. Todos os genótipos avaliados no trabalho são claramente distinguíveis por teste de paternidade, utilizando marcadores de microssatélites.

2. Os marcadores SSRs demonstraram alto poder discriminatório entre os genótipos, e podem ser utilizados com segurança e rapidez para comprovar a descendência, bem como em análises de diversidade genética entre genótipos híbridos, mesmo em espécies com estreita base genética como o pessegueiro.

## **Agradecimentos**

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

ARANZANA, M. J.; GARCIA-MAS, J.; CARBÓ, J.; ARÚS, P. Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. **Plant Breeding**, v.121, p.87–92, 2002.

BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Anal Biochemistry**, v.196, p.80-83, 1991.

BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; SANSVINI, S. Microsatellite markers for identification of *Prunus spp.* rootstocks. **Scientia Agricola**, v.61, n.3, p.303-306, 2004a.

BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; SCHUCH, M. W.; SANSVINI, S. Caracterização molecular de cultivares de pessegueiro e nectarineira com microssatélites. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 3, p. 490-493, 2004b.

BIANCHI, V. J.; RADMANN, E. B.; GOULART, R. C.; GOMES, C. B.; FACHINELLO, J. C. Reação de porta-enxertos de *Prunus à meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA**. 2010.

BOUHADIDA M.; CASAS, A. M.; GONZALO, M. J.; ARÚS, P.; MORENO, M. A.; GOGORCENA, Y. Molecular characterization and genetic diversity of *Prunus* rootstocks. **Scientia Horticulturae**, v.120, p.237-245, 2009.

CANTINI, C.; IEZZONI, A.F.; LAMBOY, W.F.; BORITZKI, M.; STRUSS, D. DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats.

**Journal of the American Society for Horticulture Science**, v.126, p.205–209, 2001.

CASAS, A. M.; IGARTUA E.; BALAGUER G.; MORENO M. A. Genetic diversity of *Prunus* rootstocks analyzed by RAPD markers. **Euphytica**, v.79, n.1, p.137-141, 2004.

CUPERTINO, F. B.; LEAL, J. B.; VIDAL, P. O.; GAIOTTO, F. A. Parentage testing of hybrid full-sib families of *Eucalyptus* with microsatellites. **Scandinavian Journal of Forest Research**, v.24, n.1, p.2-7, 2009.

CHENG, Z.; HUANG, H. SSR fingerprinting Chinese peach cultivars and landraces (*Prunus persica*) and analysis of their genetic relationships. **Scientia Horticulturae**, v. 120, p.188–193, 2009.

CRUZ, C. D. **Programa GENES**: diversidade genética. Viçosa, 2008. 278p.

DIRLEWANGER, E.; COSSON, P.; TAVAUD, M.; ARANZANA, M. J.; POIZAT, C.; ZANETTO, A.; ARÚS, P.; LAIGRET, F. 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, 2002.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.1, p.13-15, 1991.

GRATTAPAGLIA, D.; RIBEIRO, V. J.; REZENDE, G. D. S. P. Retrospective selection of elite parent trees using paternity testing with microsatellite markers: an alternative short term breeding tactic for *Eucalyptus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.192-1999, 2004.

MAYER, N. A.; PEREIRA, F. M.; NACHTIGAL, J. C. Propagação do umezeiro (*Prunus mume* Sieb & Zucc.) por estaquia herbácea. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.673-676, 2001.

Paula, Luciane Arantes. **Fenotipagem de porta-enxertos de pessegueiros para reação à *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood (1949) e estudo da variabilidade genética com marcadores microssatélites**, 2009. 73f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

PIERANTONI, L.; CHO, K. H.; SHIN, I. S.; CHIODINI, R.; TARTARINI, S.; DONDINI, L.; KANG, S. J.; SANSAVINI, S. Characterization and transferability of apple SSRs to two European pear F1 populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.1519-1524, 2004.

ROHLF, J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. New York: Exeter, 2001. Software.

SHIRAN, B.; AMIRBAKHTIAR, N.; KIANI, S.; MOHAMMADI, S.; SAYED-TABATABAEI, B.E.; MORADI, H. Molecular characterization and genetic relationship among almond cultivars assessed by RAPD and SSR markers. **Scientia Horticulturae**, v.111, p.280–292 , 2007.

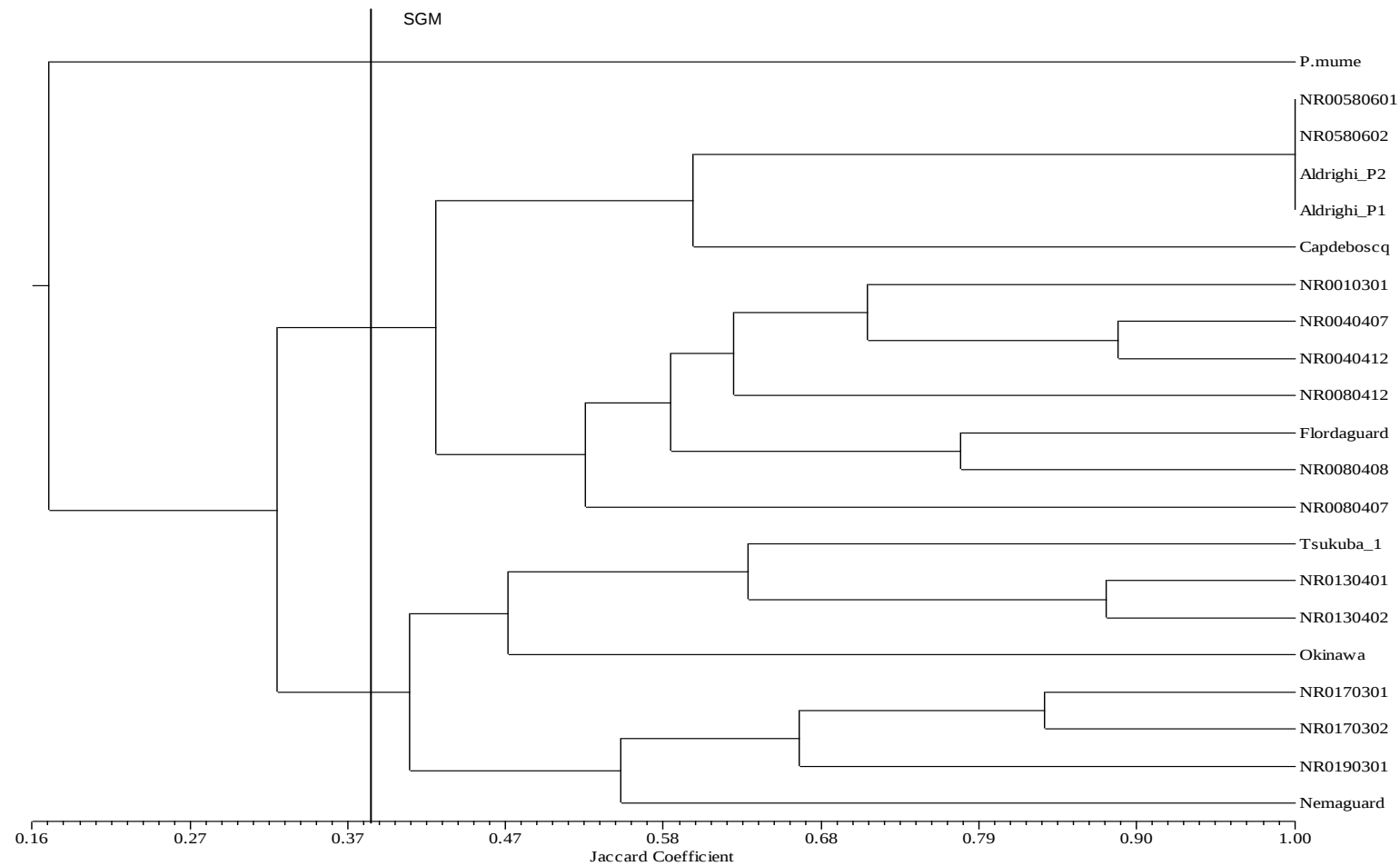
SOSINSKI, B.; GANNAVARAPU, M.; HAGER, L. D.; BECK, L. E.; KING, G. J.; RYDER, C. D.; RAJAPAKSE, S.; BAIRD, W. V.; BALLARD, R. E.; ABBOT, A. G. Characterization of microsatellite in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.1034–1041, 2000.

TESTOLIN, R.; MARRAZZO, T.; CIPRIANI, G.; QUARTA, R.; VERDE, I.; DETTORI, M. T.; PANCALDI, M.; SANSAVINI, S. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. **Genome**, v.43, p.512-520, 2000.

TETSUYA K. Discrimination of Japanese pear varieties and paternity test utilizing SSR markers. **Agriculture and Horticulture**, v.79, n.1, p.146-150, 2004.

ZHEBENTYAYEVA, T.N., REIGHARD, G.L., GORINA, V.M., ABBOTT, A.G. Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, 435–444, 2003.

YAMAMOTO, T.; HAYASHI, T. New root-knot nematode resistance genes and their TS markers in peach. **Scientia Horticulturae**, v.96, p.81-90, 2002.



**Figura 1.** Análise de agrupamento de uma população de 21 genótipos de porta-enxertos de *Prunus* spp., utilizando o método UPGMA

**Tabela 1.** Tamanho estimado em pares de base dos alelos de dez locos microssatélites para treze híbridos e seus genitores <sup>(1)</sup>.

| Cruzamentos                         |                   | Locos SSR |          |          |          |          |          |          |           |          |          |  |  |  |  |  |  |
|-------------------------------------|-------------------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|--|--|--|--|--|--|
| Genitores / Híbridos <sup>(3)</sup> | CF <sup>(2)</sup> | BPPCT002  | BPPCT008 | BPPCT013 | BPPCT024 | BPPCT025 | BPPCT026 | BPPCT034 | BPPCT 041 | UDP98025 | UDP98407 |  |  |  |  |  |  |
| Flordaguard **                      | R                 | 575 500   | 250 225  | 300 280  | 120 120  | 415 415  | 255 240  | 575 540  | 530 510   | 250 250  | 490 490  |  |  |  |  |  |  |
| NR0040407                           | R                 | 600 500   | 250 225  | --- 280  | 120 115  | 415 415  | 255 240  | 575 540  | --- 510   | 300 250  | 490 490  |  |  |  |  |  |  |
| NR0040412                           | R                 | 600 500   | 250 225  | --- 280  | 120 115  | 415 415  | 255 240  | 575 540  | 530 530   | 300 250  | 490 490  |  |  |  |  |  |  |
| Aldrighi-P1                         | V                 | 600 600   | 250 250  | 290 290  | 115 115  | 415 415  | 240 240  | 540 540  | 530 530   | 300 300  | 490 490  |  |  |  |  |  |  |
| -----                               |                   |           |          |          |          |          |          |          |           |          |          |  |  |  |  |  |  |
| Aldrighi-P1                         |                   |           |          |          |          |          |          |          |           |          |          |  |  |  |  |  |  |
| NR0010301                           | R                 | 600 575   | 250 225  | --- 280  | 115 115  | 415 ---  | 255 240  | 540 540  | 530 530   | 300 250  | 490 490  |  |  |  |  |  |  |
| Tsukuba 1 **                        | R                 | 575 575   | 250 225  | 280 280  | 120 115  | 430 430  | 255 255  | 540 540  | 530 530   | 250 250  | 490 490  |  |  |  |  |  |  |
| -----                               |                   |           |          |          |          |          |          |          |           |          |          |  |  |  |  |  |  |
| Tsukuba 1 **                        |                   |           |          |          |          |          |          |          |           |          |          |  |  |  |  |  |  |
| NR0130401                           | R                 | 575 575   | 265 225  | 280 280  | 115 115  | 430 310  | 255 255  | 575 540  | 530 530   | 250 ---  | 490 455  |  |  |  |  |  |  |
| NR0130402                           | R                 | 575 575   | 265 225  | 280 280  | 120 115  | 430 310  | 255 255  | 575 540  | 530 530   | 250 220  | 490 455  |  |  |  |  |  |  |
| OKinawa-P1                          | V                 | 575 575   | 265 265  | 280 280  | 115 115  | 415 310  | 255 255  | 575 575  | 530 530   | 220 220  | 455 455  |  |  |  |  |  |  |
| -----                               |                   |           |          |          |          |          |          |          |           |          |          |  |  |  |  |  |  |
| Tsukuba 1**                         | R                 | 575 575   | 250 225  | 280 280  | 120 115  | 430 430  | 255 255  | 540 540  | 530 530   | 250 250  | 490 455  |  |  |  |  |  |  |
| NR0170301                           | R                 | 575 550   | 225 210  | 280 250  | 120 115  | 430 430  | 255 240  | 600 540  | 530 530   | 300 250  | 490 455  |  |  |  |  |  |  |
| NR0170302                           | R                 | 575 575   | 225 210  | 280 250  | 120 120  | 430 430  | 255 240  | 540 540  | 530 530   | 300 250  | 490 455  |  |  |  |  |  |  |
| Nemaguard                           | V                 | 575 550   | 210 210  | 250 250  | 120 120  | 430 430  | 240 240  | 600 540  | 530 530   | 300 300  | 455 455  |  |  |  |  |  |  |
| -----                               |                   |           |          |          |          |          |          |          |           |          |          |  |  |  |  |  |  |
| Nemaguard                           |                   |           |          |          |          |          |          |          |           |          |          |  |  |  |  |  |  |
| NR0190301                           | R                 | 575 500   | 225 ---  | 280 250  | 120 120  | --- 415  | 255 240  | 575 540  | 530 530   | 300 250  | 490 455  |  |  |  |  |  |  |
| Flordaguard **                      | R                 | 575 500   | 250 225  | 300 280  | 120 120  | 415 415  | 255 240  | 575 540  | 530 510   | 250 250  | 490 490  |  |  |  |  |  |  |
| -----                               |                   |           |          |          |          |          |          |          |           |          |          |  |  |  |  |  |  |
| Flordaguard **                      |                   |           |          |          |          |          |          |          |           |          |          |  |  |  |  |  |  |
| NR0080407                           | R                 | 575 575   | 250 225  | 290 ---  | 120 115  | 415 415  | 240 240  | 540 540  | 510 510   | 330 250  | 490 490  |  |  |  |  |  |  |
| NR0080408                           | R                 | 575 500   | 250 225  | 300 280  | 120 120  | 415 360  | 260 240  | 575 540  | 510 510   | 330 250  | 490 490  |  |  |  |  |  |  |
| NR0080412                           | R                 | 600 500   | 250 250  | 280 ---  | 120 115  | 415 415  | 260 240  | 575 540  | 510 510   | 330 250  | 490 490  |  |  |  |  |  |  |
| Capdeboscq                          | V                 | 600 575   | 250 250  | 290 290  | 120 115  | 415 360  | 260 240  | 540 540  | 530 530   | 330 330  | 490 490  |  |  |  |  |  |  |
| -----                               |                   |           |          |          |          |          |          |          |           |          |          |  |  |  |  |  |  |
| Prunus mume **                      | V                 | 500 450   | 250 250  | 170 170  | --- ---  | 310 310  | 240 240  | 540 540  | --- ---   | 240 240  | --- ---  |  |  |  |  |  |  |
| NR0580601                           | V                 | 600 600   | 250 250  | 290 290  | 115 115  | 415 415  | 240 240  | 540 540  | 530 530   | 300 300  | 490 490  |  |  |  |  |  |  |
| NR0580602                           | V                 | 600 600   | 250 250  | 290 290  | 115 115  | 415 415  | 240 240  | 540 540  | 530 530   | 300 300  | 490 490  |  |  |  |  |  |  |
| Aldrighi P1                         | V                 | 600 600   | 250 250  | 290 290  | 115 115  | 415 415  | 240 240  | 540 540  | 530 530   | 300 300  | 490 490  |  |  |  |  |  |  |
| Aldrighi P2                         | V                 | 600 600   | 250 250  | 290 290  | 115 115  | 415 415  | 240 240  | 540 540  | 530 530   | 300 300  | 490 490  |  |  |  |  |  |  |

<sup>(1)</sup> \*\* indica genitor masculino, --- indica alelos nulos. <sup>(2)</sup> CF indica 'cor da folha', R=folha avermelhada, V=folha verde. <sup>(3)</sup> Híbridos identificados pelas iniciais NR.

**Tabela 2.** Número de alelos, heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) coeficiente de endogamia (F) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) de 10 locos microssatélites avaliados em 21 porta-enxertos de *Prunus* spp..

| Loco     | Alelos | He   | Ho   | F    | PIC  |
|----------|--------|------|------|------|------|
| BPPCT002 | 4      | 0,66 | 0,28 | 0,57 | 0,59 |
| BPPCT008 | 4      | 0,70 | 0,38 | 0,45 | 0,63 |
| BPPCT013 | 4      | 0,70 | 0,27 | 0,61 | 0,65 |
| BPPCT024 | 4      | 0,70 | 0,42 | 0,38 | 0,63 |
| BPPCT025 | 4      | 0,66 | 0,41 | 0,38 | 0,60 |
| BPPCT026 | 5      | 0,70 | 0,27 | 0,61 | 0,64 |
| BPPCT034 | 5      | 0,74 | 0,42 | 0,42 | 0,70 |
| BPPCT041 | 5      | 0,70 | 0,36 | 0,48 | 0,64 |
| UDP98025 | 4      | 0,66 | 0,31 | 0,52 | 0,59 |
| UDP98407 | 4      | 0,64 | 0,27 | 0,58 | 0,58 |
| Média    | 4,3    | 0,68 | 0,34 | 0,50 | 0,62 |

## **ARTIGO 2**

# **SEGREGAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM UMA POPULAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS DE PESSEGUEIRO**

(De acordo com as normas da revista Pesquisa Agropecuária Brasileira)

## Segregação de marcadores microsatélites em uma população de porta-enxertos de pessegueiro

Luciana Rodrigues Nogueira Machado<sup>(1)</sup>; Luis Willian Pacheco Arge<sup>(1)</sup>; Willian Silva Barros<sup>(2)</sup> e

Valmor João Bianchi<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, CEP 96010-900 - Capão do Leão, RS - Caixa-Postal: 354 Email: luciana.r.nogueira@gmail.com, valmorjb@yahoo.com, lwillianpacheco@hotmail.com

<sup>(2)</sup> Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Física e Matemática, Departamento de Matemática e Estatística, willian.barros@ufpel.edu.br

**RESUMO:** A segregação de marcadores SSR foi avaliada em uma população de 50 plantas F<sub>2</sub> obtidas por autofecundação de um híbrido F<sub>1</sub> proveniente do cruzamento entre os pessegueiros cv. Capdeboscq x Flordaguard, suscetível e resistente a *Meloidogyne* spp, respectivamente. Objetivou-se comparar o grupo de ancoramento de marcadores moleculares SSRs desta população F<sub>2</sub> segregante com o mapa genético de porta-enxertos de *Prunus* spp. resistentes a nematóide das galhas. Foi testada a segregação de 37 locos SSRs e um marcador fenotípico referente à cor da folha. O ancoramento dos marcadores (mapeamento genético) foi realizado utilizando-se um LOD=3. O teste de *qui-quadrado* foi utilizado para verificar a significância dos dados, evidenciando que pelo menos 10 marcadores SSR e o fenotípico estão associados em dois grupos de ligação. Embora exista a necessidade de saturar o mapa com maior número de marcadores, foi possível comprovar que os locos marcadores BPPCT004, CPDCT044, BPPCT034 e BPPCT002 agruparam de forma similar ao encontrado no GL2 do mapa de referência de *Prunus*. Possivelmente estes locos estão associados a genes de resistência a *Meloidogyne* spp., sendo herdados do porta-enxerto 'Flordaguard' e podem ser utilizados em seleção assistida por marcadores (SAM).

**Termos para indexação:** *Prunus persica*; mapa de ligação; resistência a nematóide das galhas; SSR; SAM.

## Segregation of SSR markers in a population of peach rootstocks

**ABSTRACT:** Segregation of SSR markers was assessed in a population of 50  $F_2$  plants obtained by selfing of  $F_1$  hybrid derived from a cross between peaches rootstock cv. Capdebocq x Flordaguard, susceptible and resistant to *Meloidogyne* spp, respectively. The objective was to compare the anchoring group of molecular markers SSRs segregating  $F_2$  population of the genetic map of rootstocks of *Prunus* spp. resistant to root-knot nematodes. We tested the segregation of 37 loci SSRs and the phenotypic marker leaf color. Eleven markers showed a link, allowing us to build a map with two linkage groups. The genetic map was performed using a LOD = 3. The chi-square test was used to assess the data significance, showing that at least 10 SSR markers and one phenotypic are associated in two linkage groups. Although, it is necessary to saturate the map with more markers, it was found that the marker loci BPPCT004, CPDCT044, BPPCT034 and BPPCT002 were grouped in a similar way with GL2 *Prunus* reference map. Possibly these loci are associated with genes for resistance to *Meloidogyne* spp., being inherited from the rootstock 'Flordaguard' and can be used in marker-assisted selection (MAS).

Index Terms: *Prunus persica*; linkage map; root-knot nematode resistance; SSR; MAS.

## Introdução

O cultivo do pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch) é severamente afetado pela presença de nematóides causadores de galhas (*Meloidogyne spp.*), pragas de solo facilmente propagáveis que podem inviabilizar áreas de viveiro e pomares, e causam anualmente perdas estimadas em milhões de dólares em todo mundo, uma vez que é praticamente impossível eliminá-los das raízes de árvores frutíferas perenes (Lecouls et al., 1999; Yamamoto & Hayashi, 2002).

Uma estratégia promissora para contornar este problema é usar porta-enxertos que sejam resistentes a nematóides causadores de galhas, pois o controle químico com nematicidas é pouco eficiente e de alto custo, além de não existirem produtos registrados para uso no Brasil. Extensivos trabalhos têm sido realizados buscando a determinação genética da resistência a nematóides em *Prunus* spp. (Lu et al., 1999; Yamamoto & Hayashi, 2002; Claverie et al., 2004; Gillen & Bliss, 2005). Diversos genes de resistência a nematóides também têm sido detectados em outras culturas como: tomate, batata, feijão, soja e cereais.

Em pessegueiro, vários genes de resistência (*R genes*) dominantes ou parcialmente dominantes foram identificados e mapeados (Yamamoto & Hayashi, 2002; Claverie et al., 2004; Dirlwanger et al., 2004; Blenda et al., 2007; Hwang et al., 2010), entretanto ainda existem dúvidas sobre o tipo de herança e quais são os genes realmente envolvidos nesta característica, dentro do gênero *Prunus*.

Todos os genes de resistência a nematóides das galhas descritos até o momento, em *Prunus* spp., foram identificados em dois grupos de ligação (GL2 e GL7). Dentre eles estão dois genes (mi e MJ) que conferem resistência a *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*, respectivamente, o gene Mij relatado por Lu et al. (1998), determina resistência a ambas as linhagens. Yamamoto e Hayashi (2002), elaboraram uma genética complexa, com duplo loco (Mj1/mj1 e Mj2/mj2) para assegurar a resistência a *M. javanica* em pessegueiro. A introgressão da resistência entre genótipos pode ser conseguida com relativa facilidade e acompanhada por marcadores moleculares.

Com isso, a busca por marcadores moleculares ligados à resistência a pragas e doenças facilita o processo de melhoramento tradicional através da seleção assistida por marcadores (SAM) e possibilita o desenvolvimento de novas cultivares resistentes de forma mais rápida e eficiente (Morceli et al., 2008).

O mapa de ligação elaborado por Dirlewanger et al. (2004) para o porta-enxerto GxN22, derivado do cruzamento entre 'Garfi' × 'Nemared' (amendoeira e pessegueiro, respectivamente) apresenta oito grupos de ligação, dentre eles os grupos de ligação 2 (GL2) e grupo de ligação 7 (GL7), onde foram mapeados dois genes de resistência a nematóides  $R_{MiaNem}$  e Ma. O GL2 apresenta o gene  $R_{MiaNem}$  que confere resistência a *M. incognita* (Kofoed e White) Chitwood, *M. javanica* e *M. arenaria* no porta-enxerto 'Nemared' e o GL7 possui o gene Ma, que confere resistência a *Meloidogyne arenaria* em amexeira Mirabolano (*P. cerasifera*).

Este mapa de ligação tem sido utilizado como referência em trabalhos de herdabilidade e mapeamento genético de características, dentro do gênero *Prunus*.

Esmenjaud et al. (2009) observou que a herança destes *R* genes pode variar de acordo com as espécies parentais e geralmente apresenta distorções de segregação, principalmente em relação ao alelo de resistência dominante, onde o esperado foi uma segregação 1R:1S (resistente:suscetível), enquanto o observado foi de 18R:23S para o gene *Ma* e 5R:18S para o gene *R<sub>MiaNem</sub>*.

A herdabilidade dos genes de resistência pode ser acompanhada através da associação de marcadores moleculares com caracteres qualitativos e quantitativos, permitindo detectar marcadores polimórficos reprodutíveis e herdáveis tanto dominantes como codominantes, dentro e entre populações relacionadas. Estes marcadores quando mapeados próximos a regiões-alvo, como genes que governam características de interesse, a exemplo de seqüências relacionadas à resistência a pragas e doenças, geram dados importantes para o melhoramento genético de uma espécie e permitem sua aplicação em Seleção Assistida por Marcadores (SAM), (Lu et al., 1999).

O presente trabalho foi realizado com objetivo de verificar se a ligação de marcadores SSR em uma população  $F_2$  segregante ('Capdeboscq' x 'Flordaguard'), ocorre de forma similar ao verificado no mapa de referência de *Prunus*, bem como gerar dados que auxiliem na seleção assistida de novos porta-enxertos resistentes à *Meloidogyne* spp., para utilizá-los no melhoramento genético de *Prunus*.

## Material e métodos

As análises foram realizadas durante o ano de 2010, no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Brasil. O material vegetal utilizado foi proveniente de uma população de 50 indivíduos  $F_2$  obtida por autofecundação a partir de um híbrido  $F_1$  (NR0080407) originado do cruzamento entre 'Capdeboscq' x 'Flordaguard', sendo o primeiro genótipo uma antiga cultivar copa de pessegueiro suscetível a *Meloidogyne* spp. com coloração verde nas folhas, o segundo genótipo é um porta-enxerto resistente a *Meloidogyne* spp. e apresenta folhas com coloração avermelhada, sendo o doador de pólen. O híbrido  $F_1$  (NR0080407) derivado do cruzamento teve sua descendência confirmada e foi autofecundado, dando origem a geração  $F_2$ . A fenotipagem para a cor da folha foi realizada aos seis meses de idade das plantas  $F_2$ .

O DNA genômico foi extraído dos indivíduos parentais, híbrido  $F_1$  e  $F_2$ , a partir de amostras de 50 mg de folhas jovens frescas usando o método descrito por Doyle & Doyle (1991). Realizou-se a quantificação do DNA em gel de agarose 0,8%, usando como padrão o DNA de Fago *Lambda* digerido com *Hind* III, e logo após uma alíquota foi diluída para uma solução de trabalho na concentração de  $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ .

Nas reações de PCR foram utilizados 20 ng de DNA genômico de cada amostra; 2,5  $\mu\text{L}$  de 10x PCR buffer; 1,7 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,5  $\mu\text{M}$  de cada *primer*; 0,2  $\mu\text{M}$  de  $\text{dNTP}_S$ ; 0,8U de Taq polimerase e água Milli-Q para completar o volume final de 25  $\mu\text{L}$ . As temperaturas de anelamento ( $T^{\circ}\text{A}$ ) para cada *primer* foram determinadas após

realização de um teste de gradiente de temperatura onde foram estabelecidas as temperaturas ótimas de anelamento. As reações de PCR foram realizadas em aparelho termociclador, da marca Bio-Rad modelo Icyclor, utilizando-se o seguinte protocolo de amplificação: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 50-60°C por 45s, 72°C por 1 min, e 1 ciclo de 72°C por 10 min, 4°C por 5 min.

Foram avaliados 37 locos de microssatélites (Tabela 1) e um marcador fenotípico (cor da folha) para a construção do mapa de ligação. Os locos utilizados neste estudo foram escolhidos com base nos grupos de ligação do mapa genético elaborado por Dirlewanger et al. (2004), utilizado como referência para o gênero *Prunus*.

Os produtos da PCR foram analisados após eletroforese em cuba de seqüenciamento utilizando gel de poliacrilamida 6% e corados com nitrato de prata, segundo o método descrito por Bassan et al. (1991). O perfil eletroforético de cada loco foi registrado como (11) homozigoto dominante, (22) homozigoto recessivo e (12) heterozigoto. Os marcadores microssatélites foram integrados aos mapas de ligação através do software Gqmol (Cruz & Schuster, 2005). A análise de mapeamento foi realizada utilizando um LOD score de 3,0 e 30% de recombinação máxima. As freqüências de recombinação foram convertidas em distância genética através da função de Kosambi, o teste *qui-quadrado* ( $\chi^2$ ) foi utilizado para testar a hipótese de segregação independente dos locos SSR analisados (Tabela 2).

## Resultados e discussão

Dos 37 locos microssatélites testados, 23 amplificaram, destes 20 geraram boa amplificação e polimorfismo, sendo utilizados para o teste de segregação e elaboração do mapa de ligação. Os locos BPPCT013, BPPCT001 e CPPCT036 geraram amplificações inconsistentes e de difícil interpretação, não sendo usados na análise de segregação. Os locos CPSTCT007a, CPSTCT021, UDP98407 e BPPCT018 revelaram bandas monomórficas para as amostras avaliadas (Tabela 1).

Pelo teste do *qui-quadrado*, 11 marcadores co-segregaram e foram agrupados em dois grupos de ligação, designados como GL1 e GL2, cobrindo uma distância total de 125,20 cM (Figura 1). O GL1 reuniu o marcador fenotípico “cor da folha” e os marcadores BPPCT019, CPPCT009, BPPCT033, BPPCT026, BPPCT012, BPPCT004, CPDCT044 e UDP96013. Neste grupo de ligação, o marcador fenotípico “cor da folha” encontra-se a uma distância aproximada de 52.5 cM do marcador BPPCT033 (Tabela 2), isso corresponde a uma distância muito similar aquela descrita no mapa de referência de *Prunus* elaborado por Dirlewanger et al. (2004), onde a distância entre tais marcadores foi de 57.3 cM, sendo ambos mapeados no grupo de ligação seis (GL6).

Com isso, observa-se que existe homologia entre as distâncias, porém no presente trabalho não ocorreu o posicionamento destes marcadores no GL6 e sim no GL1, indicando que possivelmente nesta população de mapeamento o marcador BPPCT033 não esteja ligado à coloração da folha, possivelmente por estar localizado

em outro cromossomo ou em uma distância muito grande dentro do mesmo cromossomo.

Neste estudo, o marcador BPPCT004 segregou a distância de 26.50 cM de CPDCT044 (Tabela 2), enquanto que no mapa de referência de *Prunus*, estes marcadores foram localizados a 6,7 cM entre si, e aproximadamente 29 e 22 cM respectivamente do gene  $R_{MiaNem}$ . Estas diferenças, segundo Wunsch (2009), podem ocorrer devido a eventuais distorções de segregação entre os locos SSR e ao polimorfismo entre genótipos da mesma espécie, em função da origem dos parentais e/ou translocações no genoma.

Em geral, os genes de resistência a nematóides são membros de famílias multigênicas, organizadas em regiões cromossômicas relacionadas. A quantidade desses genes é enorme e representa a capacidade da planta em perceber o patógeno, de modo que as plantas são selecionadas evolutivamente para manter muitos genes *R*. Entretanto, a variabilidade entre os genes é necessária, e é obtida principalmente através de cruzamentos entre indivíduos, com fontes de resistências diferentes. Assim, existem mecanismos genéticos para gerar diversidade nos genes de resistência, de forma mais rápida e eficiente que mutações pontuais e aleatórias, como a recombinação desigual e a conversão gênica (Fragoso et al., 2007).

No presente mapa, a fonte de resistência utilizada é o porta-enxerto 'Flordaguard', um híbrido entre *P. persica* x *P. davidiana*, que apresenta vigor médio, baixa resistência à asfixia de raízes e resistência a nematóides (Fachinello, 2000). A resistência de 'Flordaguard' é herança do ancestral 'Okinawa', considerada uma das principais fontes de resistência a *Meloidogyne* spp. (Lu et al., 1999). O mapa de

referência de *Prunus*, que foi elaborado a partir de um cruzamento GxN22, cuja fonte de referência foi o porta-enxerto 'Nemared' , tem como ancestral o porta-enxerto 'Nemaguard', está entre as principais fontes de resistência a *Meloidogyne* spp, em *Prunus persica*, porém de acordo com Lu et al. (1999) esses dois porta-enxertos são genótipos recombinantes que apresentam fontes de resistência diferentes.

O segundo grupo de ligação (GL2) associou fortemente dois marcadores, BPPCT034 e BPPCT002. No mapa elaborado por Dirlewanger et al. (2004), para o porta-enxerto GxN22, estes marcadores co-segregaram no GL2 a uma distância de 48,6 cM do gene  $R_{MiaNem}$  e a 0 cM entre eles, porém no presente mapa a co-segregação também foi observada mas a uma distância de 12.80 cM entre os marcadores (Tabela 2). Esses resultados permitem inferir que os dois marcadores possivelmente estejam localizados em uma região altamente conservada do genoma e que a segregação ocorre de forma similar entre diferentes populações de mapeamento, sendo estes marcadores possíveis candidatos a serem usados para seleção assistida (SAM) para populações derivadas de cruzamentos entre 'Capdeboscq' x 'Flordaguard'.

Para Lu et al. (1999), a SAM apresenta potencial para reduzir significativamente o tempo, espaço e custos necessários para a manutenção e avaliação de grandes populações segregantes de pessegueiro em programas de melhoramento genético, uma vez que pode ser utilizados como ferramenta para identificação de genótipos resistentes a nematóides das galhas.

A segregação dos marcadores revelou a razão esperada para uma herança codominante (1:2:1), a exceção dos marcadores BPPCT004 e BPPCT033, que segregaram na proporção (3:1), desviando significativamente da proporção esperada

(Tabela 2). Este fato já foi observado por Dirlewanger et al. (2002), onde 30% dos locos microssatélites testados apresentaram distorção de segregação. Esmenjaud et al. (2009), observaram que gene  $R_{Mia}$  também foi herdado com distorções, geralmente relacionadas ao alelo dominante do cruzamento. O marcador fenotípico “cor da folha” segregou na proporção 3:1, estando de acordo com o esperado para um caráter dominante, essa relação corrobora com o obtido por Yamamoto et al. (2001).

Os valores do *qui*-quadrado foram altamente significativos, sugerindo que não há hipótese de segregação independente entre os marcadores utilizados para elaborar o mapa de ligação. Portanto, pode-se inferir que pelo menos alguns desses marcadores SSR estejam ligados a uma característica em comum, que provavelmente seja a resistência a nematóide das galhas, e essa característica tenha sido herdada do porta-enxerto ‘Flordaguard’. Outros estudos conduzidos confirmam a imunidade deste porta-enxerto a *M. incognita* (PAULA, 2009), porém neste trabalho, esta confirmação carece de uma maior saturação do mapa e a análise fenotípica da população de mapeamento para a referida resistência.

Embora aqui, estes marcadores estejam reunidos em um mesmo grupo de ligação, é de se esperar que aumentando a saturação do mapa, bem como o número de genótipos avaliado, novos grupos de ligação sejam formados e alguns marcadores fiquem associados em grupos diferentes. Entretanto, as semelhanças entre distâncias e freqüências de ligação confirmam a correspondência entre os mapas, sendo assim, a transferabilidade e a ligação dos marcadores SSR entre as diferentes populações de *Prunus* sp. gera a possibilidade da utilização destes marcadores na seleção assistida de características de interesse.

Assim, a evidente associação dos marcadores entre diferentes populações de mapeamento, geradas a partir de fontes de resistência diferentes, levanta a hipótese de que exista grande homologia entre estas fontes de resistência, provavelmente derivadas de um ancestral em comum.

### **Conclusão**

1. Existe ligação similar de marcadores SSR em diferentes populações de *Prunus*, porém esta ligação não se dá de forma total.
2. Os marcadores BPPCT004, CPDCT044, BPPCT034 e BPPCT002 segregam de forma semelhante ao encontrado em outras populações de mapeamento.

### **Agradecimentos**

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

## Referências

BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Anal Biochemistry**, v.196, p.80-83, 1991.

BLENDIA, A. V.; VERDE, I.; GEORGI, L. L.; REIGHARD, G. L.; FORREST, S. D.; MUÑOZ-TORRES, M.; BAIRD, W. V.; ABBOTT, A. G. Construction of a genetic linkage map and Identification of molecular markers in peach rootstocks for response to peach tree short life syndrome. **Tree Genetics & Genomes**, v.3, p.341–350, 2007.

CLAVERIE, M.; BOSSELUT, N.; LECOULS, A. C.; VOISIN, R.; LAFARGUE, B.; POIZAT, C.; KLEINHENTZ, M.; LAIGRET, F.; DIRLEWANGER, E.; ESMENJAUD, D. Location of independent root-knot nematode resistance genes in plum and peach. **Theoretical and Applied Genetics**, v.108, p.765-773, 2004.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos. Viçosa: UFV, 2005.

DIRLEWANGER, E.; COSSON, P.; TAVAUD, M.; ARANZANA, M. J.; POIZAT, C.; ZANETTO, A.; ARÚS, P.; LAIGRET, F. 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, 2002.

DIRLEWANGER, E.; COSSON, P.; HOWAD, W.; CAPDEVILLE, G.; BOSSELUT, N.; CLAVERIE, M.; VOISIN, R.; POIZAT, C.; LAFARGUE, B.; BARON, O.; LAIGRET, F.; KLEINHENTZ, M.; ARÚS, P.; ESMENJAUD, D. Microsatellite genetic linkage maps of myrobalan plum and an almond-peach hybrid – location of root-knot nematode resistance genes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.827-838, 2004.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.1, p.13-15, 1991.

ESMENJAUD, D.; VOISIN, R.; VAN GHELDER, C.; BOSSELUT, N.; LAFARGUE, B.; DIVITO, M.; DIRLEWANGER, E.; POESSEL, J. L.; KLEINHENTZ, M. Genetic dissection of resistance to root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. in plum, peach, almond, and apricot from various segregating interspecific *Prunus* progenies. **Tree Genetics & Genomes**, v.5, p.279-289, 2009.

FACHINELLO, J.C. Problemática das mudas de plantas frutíferas de caroço. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FRUTAS DE CAROÇO: PÊSSEGOS, NECTARINAS E AMEIXAS**, v. 1, 2000, Porto Alegre. Anais ..., p.25-40.

FRAGOSO, R. da R. (Ed.); LOURENÇO I. T., VIANA, A. A. B.; SOUZA, D. S. L.; ANDRADE, R. V.; MEHTA, A.; BRASILEIRO, A. C. M.; PINTO, E. R. C.; LIMA, L. M.; ROCHA, T. L.; GROSSI DE SÁ, M. F. **Interação Molecular Planta-Nematóide**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 56p.

GILLEN, A. M.; BLISS, F. A. Identification and mapping of markers linked to the Mi gene for root-knot nematode resistance in peach. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.130, p.24–33, 2005.

HWANG, C.F.; XU, K.; HU, R.; ZHOU, R.; RIAZ, S.; WALKER, M. A. Cloning and characterization of XiR1, a locus responsible for dagger nematode resistance in grape. **Theoretical and Applied Genetics**, v.121, p.789–799, 2010.

LU, Z. X.; SOSSEY-ALAOUI, G. L.; REIGHARD, G. L.; BAIRD, W. V.; ABBOTT, A. G. Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance, and its application to peach rootstock breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.115-122, 1999.

LECOULS A. C.; SALESES, G.; MINOT, J. C.; VOISIN, R.; BONNET, A.; ESMENJAUD D. Spectrum of the Ma genes for resistance to *Meloidogyne* spp. in Myrobalan plum. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.1325-1334, 1997.

LECOULS A. C.; RUBIO-CABETAS, M. J.; MINOT, J. C.; VOISIN, R.; BONNET, A.; SALESES, G.; DIRLEWANGER, E.; ESMENJAUD, D. RAPD and SCAR markers linked to the Ma1 root-knot nematode resistance gene in Myrobalan plum (*Prunus cerasifera* Ehr.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.328-335, 1999.

MORCELI, T. G. S.; TREVISOLI, S. H. U.; JUNIOR, A. A. M.; KIHI, R. A. de S.; CALVO, E. S.; DI MAURO, A. O.; GARCIA, A. Identificação e validação de marcadores microssatélites ligados ao gene Rpp5 de resistência à ferrugem-asiática-da-soja.

**Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1525-1531, 2008.

YAMAMOTO, T.; SHIMADA, T.; IMAI, T.; YAEAGAKI, H.; HAJI, T. Characterization of morphological traits based on a genetic linkage map in peach. **Breeding Science**, v.51, p.271-278, 2001.

YAMAMOTO, T.; HAYASHI, T. New root-knot nematode resistance genes and their TS markers in peach. **Scientia Horticulturae**, v.96, p.81-90, 2002.

WUNSCH, A. Cross-transferable polymorphic SSR loci in *Prunus* species. **Scientia Horticulturae**, v.120, p.348-352, 2009.

**Tabela 1.** Loci microssatélites e seus respectivos grupos de ligação no mapa de referência de *Prunus*, utilizados na análise de ligação em híbridos F<sub>2</sub> de pessegueiro ('Capdeboscq' x 'Flordaguard').

| Loco      | Amplificação <sup>(1)</sup> | Polimorfismo <sup>(2)</sup> | Grupo de ligação (GL) <sup>(3)</sup> |
|-----------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| UDP98411  | A                           | P                           | G2                                   |
| BPPCT002  | A                           | P                           | G2                                   |
| CPDCT044  | A                           | P                           | G2                                   |
| BPPCT034  | A                           | P                           | G2                                   |
| BPPCT004  | A                           | P                           | G2                                   |
| CPSCT034  | A                           | P                           | G2                                   |
| UDP98025  | A                           | P                           | G2                                   |
| CPDCT024  | A                           | P                           | G2                                   |
| BPPCT030  | A                           | P                           | G2                                   |
| UDP96013  | A                           | P                           | G2                                   |
| CPSCT007a | A                           | M                           | G2                                   |
| CPSCT021  | A                           | M                           | G2                                   |
| PCEGA34   | NA                          | -                           | G2                                   |
| MA007a    | NA                          | -                           | G2                                   |
| PCHGMS1   | NA                          | -                           | G2                                   |
| MA024     | NA                          | -                           | G2                                   |
| PACITA27  | NA                          | -                           | G2                                   |
| CPPCT024  | NA                          | -                           | G2                                   |
| BPPCT013  | AI                          | -                           | G2                                   |
| BPPCT001  | AI                          | -                           | G2                                   |
| UDP 98406 | NA                          | -                           | G2                                   |
| UDP97403  | A                           | P                           | G3                                   |
| BPPCT026  | A                           | P                           | G5                                   |
| CPPCT036  | AI                          | -                           | G5                                   |
| CPPCT009  | A                           | P                           | G5                                   |
| BPPCT017  | NA                          | -                           | G5                                   |
| UDP 97401 | NA                          | -                           | G5                                   |
| UDP98407  | A                           | M                           | G6                                   |
| BPPCT018  | A                           | M                           | G6                                   |
| UDP 98412 | A                           | P                           | G6                                   |
| BPPCT033  | A                           | P                           | G6                                   |
| BPPCT008  | A                           | P                           | G6                                   |
| BPPCT025  | A                           | P                           | G6                                   |
| COR FOLHA | -                           | -                           | G6                                   |
| CPPCT06   | NA                          | -                           | G8                                   |
| UDP 96015 | A                           | P                           | G8                                   |
| BPPCT012  | A                           | P                           | G8                                   |
| BPPCT019  | A                           | P                           | G8                                   |

<sup>(1)</sup> A= amplificação, AI = amplificação inconsistente, NA= não amplificação

<sup>(2)</sup> P= polimórfico, M= monomórfico

<sup>(3)</sup> Segundo Dirlewanger et al. (2004)

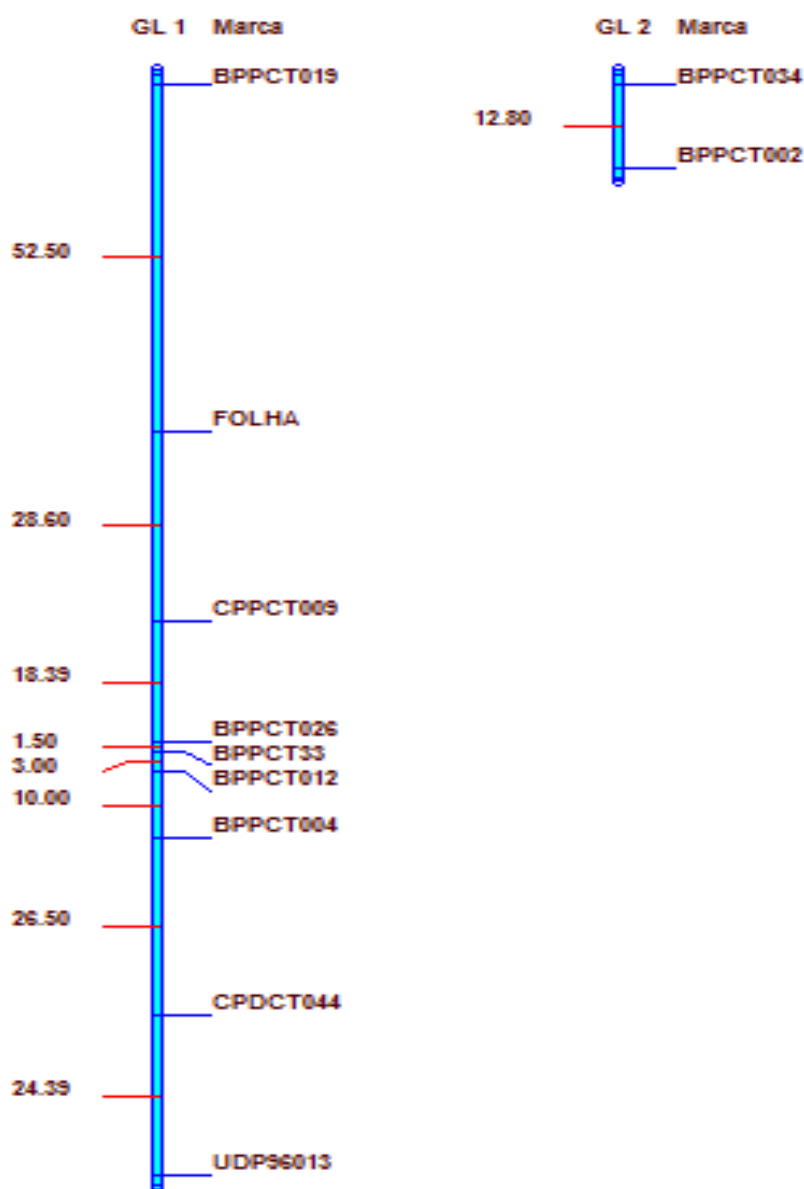
**Tabela 2.** Análise de segregação de marcadores SSR e cor da folha em porta-enxertos de pessegueiro ('Capdeboscq' x 'Flordaguard').

| MARCADOR     | Segregação em F <sub>2</sub> | Valor $\chi^2$ | VR BPPCT019 | VR Cor da Folha | VR CPPCT009 | VR BPPCT026 | VR BPPCT033 | VR BPPCT012 | VR BPPCT004 | VR CPDCT044 | VR UDP96013 |
|--------------|------------------------------|----------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| GL1          |                              |                |             |                 |             |             |             |             |             |             |             |
| BPPCT019     | 1:2:1                        | 0,157          | -           | 0,525           | 0,525       | 0,525       | 0,295       | 0,525       | 0,525       | 0,525       | 0,525       |
| Cor da Folha | 1:2:1                        | 1,50           | 0,525       | -               | 0,286       | 0,240       | 0,525       | 0,240       | 0,30        | 0,326       | 0,525       |
| CPPCT009     | 1:2:1                        | 0,534          | 0,525       | 0,286           | -           | 0,184       | 0,520       | 0,185       | 0,245       | 0,301       | 0,525       |
| BPPCT026     | 1:2:1                        | 0,134          | 0,525       | 0,240           | 0,184       | -           | 0,015       | 0,060       | 0,120       | 0,227       | 0,525       |
| BPPCT033     | 3:1                          | 1,470          | 0,525       | 0,525           | 0,520       | 0,015       | -           | 0,030       | 0,086       | 0,213       | 0,326       |
| BPPCT012     | 1:2:1                        | 1,192          | 0,525       | 0,240           | 0,185       | 0,060       | 0,030       | -           | 0,100       | 0,229       | 0,525       |
| BPPCT004     | 3:1                          | 1,50           | 0,525       | 0,300           | 0,245       | 0,120       | 0,086       | 0,100       | -           | 0,265       | 0,525       |
| CPDCT044     | 1:2:1                        | 0,260          | 0,525       | 0,326           | 0,301       | 0,227       | 0,213       | 0,229       | 0,265       | -           | 0,244       |
| UDP96013     | 1:2:1                        | 1,192          | 0,525       | 0,525           | 0,525       | 0,525       | 0,326       | 0,525       | 0,525       | 0,244       | -           |
| MARCADOR GL2 |                              |                |             |                 |             |             |             |             |             |             |             |
|              |                              |                | VR BPPCT034 | VR BPPCT002     |             |             |             |             |             |             |             |
| BPPCT034     | 1:2:1                        | 0,342          | -           | 0,128           |             |             |             |             |             |             |             |
| BPPCT002     | 1:2:1                        | 0,278          | 0,128       | -               |             |             |             |             |             |             |             |

VR = valor de recombinação

GL1 = grupo de ligação 1

GL2 = grupo de ligação 2



**Figura 1.** Mapa de ligação para 10 marcadores microsatélites e o caractere cor vermelha da folha ('FOLHA'), obtido de uma população  $F_2$  segregante ('Capdeboscq' x 'Flordaguard'). Valor máximo de recombinação 30% e valor mínimo do LOD 3. Universidade Federal de Pelotas Pelotas-RS, 2010.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam que a pesquisa e o desenvolvimento de novos porta-enxertos são de extrema importância para a cultura do pessegueiro, e a biologia molecular é uma ferramenta muito importante para complementar estudos tradicionais, possibilitando resultados rápidos e confiáveis, que poderão ser empregados no melhoramento genético da cultura.

Os marcadores moleculares microssatélites geram grande quantidade de dados confiáveis e reprodutíveis, que podem ser empregados em inúmeras análises como mapeamento genético e seleção assistida, auxiliando processos de seleção de novos genótipos e a correta identificação varietal de cultivares.

Acredita-se que os dados gerados neste trabalho sirvam de base para estudos futuros de biologia molecular e contribuam para pesquisa em melhoramento de *Prunus persica*.