

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CULTIVARES DE PESSEGUEIRO E NECTARINEIRA COM MICROSSATÉLITES¹

VALMOR JOÃO BIANCHI², JOSÉ CARLOS FACHINELLO³, MÁRCIA WULFF SCHUCH³, SILVIERO SANSAVINI⁴

RESUMO - Na certificação de mudas de plantas frutíferas, a identificação genética é importante em todas as etapas do processo de produção. Em pessegueiro, a identificação de genótipos baseada somente em características morfofenológicas deixa dúvidas quanto à verdadeira identidade de algumas cultivares. Marcadores moleculares de microssatélites foram utilizados objetivando a caracterização molecular de 8 cultivares de nectarineira e 28 de pessegueiro. Para a análise, foram utilizados 13 inicalizadores de microssatélites (*primers*), sendo que todos foram marcadores produzindo polimorfismo suficiente para identificar 32 das 36 cultivares analisadas. A maior similaridade genética verificada nas cultivares para consumo *in natura* foi entre Coral e Planalto (0,94) e entre Della Nona e Marfim (0,90), enquanto, para os pessegueiros para indústria, foi de 0,93 entre Jubileu e Capdeboscq e de 0,92 entre Jade e Esmeralda. Os marcadores de microssatélites permitiram separar em grupos distintos as nectarineiras e os pessegueiros de consumo *in natura* dos de indústria, havendo uma elevada concordância entre os dados genealógicos das cultivares e os dados gerados pelos microssatélites, confirmando a grande utilidade da técnica para a caracterização genética.

Termos para indexação: *Pruus persica*, simples seqüências repetidas, *fingerprinting*.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PEACH AND NECTARINE CULTIVARS THROUGH MICROSATELLITES MARKERS

ABSTRACT - Genetic identification of fruit tree plants is important in all phases of the production process. On peach the genotypes identification based only on the morphologic and phenologic characteristics leaves doubts on the true identity of some cultivars. Microsatellite markers were used aiming at the molecular characterization of eight nectarine and 28 peach cultivars. Thirteen microsatellite primers were used and all of them generated enough polimorfism that may identify 32 out of 36 of the analysed cultivars. The greatest genetic similarity was found between the fresh market 'Coral' and 'Planalto'(0,94) and between the 'Della Nona' and 'Marfim' cultivars (0,90), whereas for caning peaches the similarity was 0,93 between the 'Jubileu' and 'Capdeboscq' cultivars and 0,92 between the 'Jade' and 'Esmeralda' ones. The microsatellite markers made possible to separate into distinct groups of the nectarines and fresh market peaches from those caning cultivars that showed a high agreement among genealogical data and those of microsatellite markers that confirm tha this technique is useful for genetic characterization.

Index terms: *Prunus persica*, single sequence repeat, fingerprinting.

INTRODUÇÃO

Até meados da década de 60, a diferenciação de genótipos nos estudos de genética e melhoramento estava associada às características morfofenológicas das plantas. Porém, este método de análise tem como limitações as influências ambientais sobre o fenótipo, além do gasto excessivo de tempo e dinheiro (Sansavini, 1998). Dentro do gênero *Prunus*, o pessegueiro e a nectarineira pertencem à espécie de menor variabilidade genética, possuindo baixo polimorfismo das características morfofenológicas (Vinatzer et al., 1999) de tal maneira que, muitas vezes, a identificação entre cultivares baseada somente no fenótipo deixa muitas dúvidas quanto à verdadeira identidade dos genótipos (Pancaldi et al., 1999). Buscando superar este fator limitante, novos métodos de análise foram sendo introduzidos em auxílio à caracterização genética de cultivares. Inicialmente, a análise isoenzimática tem sido empregada para identificação de cultivares (Pancaldi & Battistini, 1991); entretanto, esta técnica não fornece polimorfismo suficiente para uma caracterização detalhada de genótipos de baixa variabilidade, como é o caso do pessegueiro, não permitindo a individualização, mas somente a separação em grupos (Arulsekhar & Parfitt, 1986; Lima, 2001). Porém, quando se utilizam marcadores moleculares, a possibilidade de identificação de genótipos aumenta consideravelmente em todas as espécies frutícolas (Mulcahy et al., 1993), nas quais a combinação de poucos marcadores são suficientes para diferenciá-las, produzindo um tipo de impressão digital molecular da planta, também conhecida como *fingerprinting* varietal, a qual é obtida a partir da análise do DNA das mesmas (Sansavini, 1998).

Entre os marcadores moleculares disponíveis atualmente para análise genética, os microssatélites ou SSR representam regiões de DNA de seqüência repetida em número variável. Os microssatélites apresentam

como vantagens o carácter co-dominante, elevado polimorfismo e alta reprodutibilidade, características importantes para análise baseada em marcadores moleculares (Sansavini, 1998; Sosinski et al., 2000).

Garantias de idoneidade genética do material vegetal é um atributo qualitativo de grande importância para o setor viveirístico e frutícola, para a formação de pomares de qualidade. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade de utilização dos marcadores microssatélites na caracterização de um grupo de cultivares de pessegueiro e de nectarineira de importância econômica no Brasil.

MATERIALE MÉTODOS

No presente estudo, foram analisados 36 genótipos de *Prunus persica*, sendo 8 cultivares de nectarineira, 14 cultivares de pessegueiro para consumo *in natura*, 4 de dupla finalidade e 10 do tipo indústria (Tabela 1). As análises moleculares foram realizadas nos Laboratórios de Biologia Molecular, da Università Degli Studi di Bologna – Itália, e no de Cultura de Tecidos Vegetais, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS. As análises foram repetidas em ambos os laboratórios a partir de DNA extraído de folhas coletadas de duas plantas diferentes.

O material vegetal utilizado nas análises foi obtido na Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS e no Viveiro Quinta Marli, Pelotas-RS. Para as análises, a extração do DNA foi realizada utilizando amostras com 50 mg de folhas liofilizadas, conforme metodologia descrita por Mulcahy et al. (1993) e com modificações conforme Bianchi et al. (2002); o DNA obtido foi diluído em TE pH 8,0 e, após tratamento com RNase, foi quantificado com fluorímetro (Hofer Instrument, TK100 Model) e diluído com água estéril para a concentração final de 20 ng.µL⁻¹, para ser utilizado na Reação da Polimerização em Cadeia (PCR).

¹ (Trabalho 012/2004). Recebido: 28/01/2004. Aceito para publicação: 13/08/2004. Trabalho desenvolvido com apoio financeiro do CNPq, CAPES e Fapergs.

² Engº Agrº, Dr., Bolsista Prodóc/CAPES, Departamento de Fitotecnia, Área de Fruticultura de Clima Temperado, FAEM/UFPeI, C.P. 354, 96010-900, Pelotas-RS. Fone: (53) 2757124 - E-mail: valmorjb@yahoo.com.

³ Engº Agrº, Dr., Prof. de Fruticultura, FAEM/UFPeI, C.P. 354, 96010-900, Pelotas-RS.

⁴ Prof. Fruticultura, Dipartimento di Colture Arboree – Università Degli Studi di Bologna, Bologna, Italia.

TABELA 1 - Cultivares de pessegueiro e de nectarineira analisadas com marcadores microsatélites e respectivos dados de genealogia, Pelotas-RS, 2002.

Cultivares	Dados genealógicos
	Nectarineiras
01 - Sunred	Fla R9T10 x Panamint {(Gold Mine x Rio Oso Gem) x (Babcok x Boston)}
02 - Mara	Nectared 9 x Sunred
03 - Armking	Palomar x Springtime {(Luken's Honey x Juli Elberta) x Robin}
04 - Sungold	NJ 5107397 x Okinawa
05 - Sunlite	Fla.8B-27 (Okinwa x Panamint) x NJN21
06 - Anita	77.2163 (Introdução de New Jersey)
07 - Dulce	77.2162 (Introdução de New Jersey)
08 - Bruna	Introdução Americana
Pessegueiros para consumo <i>in natura</i>	
09 - Pampeano	Não disponível
10 - Coral	{Delicioso (Introdução 619 - E.E. Pomicultura Taquari)} x {Interlúdio (Jewel x Southland) PL }
11 - Marli	Delicioso x Prelúdio
12 - Chiripá	Delicioso x Nectared 5
13 - Della Nona	{Delicioso} x {Nectared 5 (Introdução 763 - New Jersey - EUA)} PL
14 - Chimarrita	Babcock x Flordabella
15 - Planalto	Coral x Babcok (Introdução - E. E. São Pedro-Argentina)
16 - Piao	Vespertino PL
17 - Chirua	{BR-1 (Delicioso x Panamint)} x {Cascata 277 (Princesa x Colibri)}
18 - Vila Nova	Cristal x Princesa
19 - Saco de Touro	Não disponível
20 - Premier	(Cardeal x 15 de Novembro) PL
21 - Charme	Cascata 340 x BR1
22 - Marfim	Coral x Gang Shan Shang
Pessegueiros dupla finalidade	
23 - Riograndense	Brilhante x NJC 97 (EUA)
24 - Leonense	F2 Brilhante x NJC 97 (EUA)
25 - Eldorado	{Gaudério (Delicioso x Interlúdio) PL } x {Serrano (City Row 29) PL }
26 - Maciel	{Conserva 171 (Aldrighi - Seleção 493 x Pelotas 76)} x {Conserva 334 (selec de sementes dos EUA)}
Pessegueiros tipo indústria	
27 - Jubileu	Bolinha x Conserva 662
28 - Pepita	Precocinho PL {Capdeboscq (Lake City x Intermediário) PL x {Madrugador (Aldrighi x Taquari Precoce PL)}
29 - Adrighi	Seleção 439 (Pelotas-RS) PL
30 - Diamante	{Convênio} x {Pelotas 77 (Aldrighi - Seleção 439 x Cardeal - I-57-100-3)}
31 - Precocinho	Diamante PL
32 - Esmeralda	{Alpes (Aldrighi - Seleção 439 x Tapes)} x {RR 37-201 (EUA)}
33 - Jade	{Alpes (Aldrighi - Seleção 439 x Tapes)} x {RR 53-272 (EUA)}
34 - Capdeboscq	{Lake City (Introdução 625 - E.E. Pomicultura Taquari)} x {Intermediário (S -56-37 seleção da Colônia de Pelotas)} PL
35 - Granada	{Alpes (Aldrighi - Seleção 439 x Tapes)} x {Conserva 102 - I-67-5-56}
36 - Magno	Ambrosio Perret x Tapes

PL: Polinização livre**Fonte:** Arquivos da Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS (2002).

Os *primers* microsatélites utilizados foram o UDP96-001, UDP96-003, UDP96-005, UDP96-008, UDP96-013, UDP96-018, UDP96-019, UDP97-402, UDP98-022, UDP98-024, UDP98-407, UDP98-412 e UDP98-414, cujas seqüências são descritas por Cipriani et al. (1999). As reações de PCR foram conduzidas em aparelho termociclador "MJ PTC-100" em volume de 25 µL contendo 10 mmol.L⁻¹ Tris-HCl pH 9,0; 50 mmol.L⁻¹ KCl, 1,5 mmol.L⁻¹ MgCl₂; 0,2 mmol.L⁻¹ de cada dNTP; 0,2 mmol.L⁻¹ de cada *primer*; 0,1 Unidades de Taq polimerase (Amersham Pharmacia Biotech); 50 ng de DNA genômico e, ao final, adicionou-se uma gota de óleo mineral. O perfil térmico utilizado foi um ciclo a 95°C por 5 min, 35 ciclos a 94°C por 45 s; 57°C por 45 s e 72°C por 45 s, seguindo-se de um ciclo final a 72°C por 8 min.

Aos produtos da reação de PCR foram adicionados 10 µL de solução desnaturante (98% formamida, 10 mmol.L⁻¹ EDTA, 0,05% azul de bromofenol e 0,05% xileno cianol), seguido de tratamento térmico a 95°C por 5 minutos. Uma alíquota de 4,5 µL de cada amostra amplificada foi aplicada ao gel. A eletroforese foi conduzida em gel de poliacrilamida a 6%, em tampão 1X TBE a 7 V.cm⁻¹, pelo período de 2 horas e 30 minutos. A coloração do gel foi realizada utilizando nitrato de prata, segundo a

metodologia descrita no Manual Promega "Silver Sequencing" (Promega, Madison, Wisconsin, USA).

Os produtos da amplificação visualizados no gel, produzidos por cada *primer*, foram utilizados na elaboração de uma matriz de similaridade genética, por meio do registro da presença (1) e da ausência (0) de bandas no perfil eletroforético de cada genótipo, e serviu para a diferenciação das cultivares. A similaridade genética foi calculada usando-se o coeficiente de Dice e, para visualizar a forma de agrupamento das cultivares, foi elaborado o dendrograma empregando-se o método UPGMA (Unweighted pair group mean average), utilizando o software NTSYS.pc versão 2.1 (Rohlf, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de alelos amplificados com cada *primer* variou de três com UDP96-019, UDP97-402 e UDP98-022 até sete com UDP98-414, enquanto o número de bandas amplificadas variou de uma a três por genótipo (Figura 1A e 1B).

Os 13 *primers* utilizados amplificaram um total de 56 alelos, dos

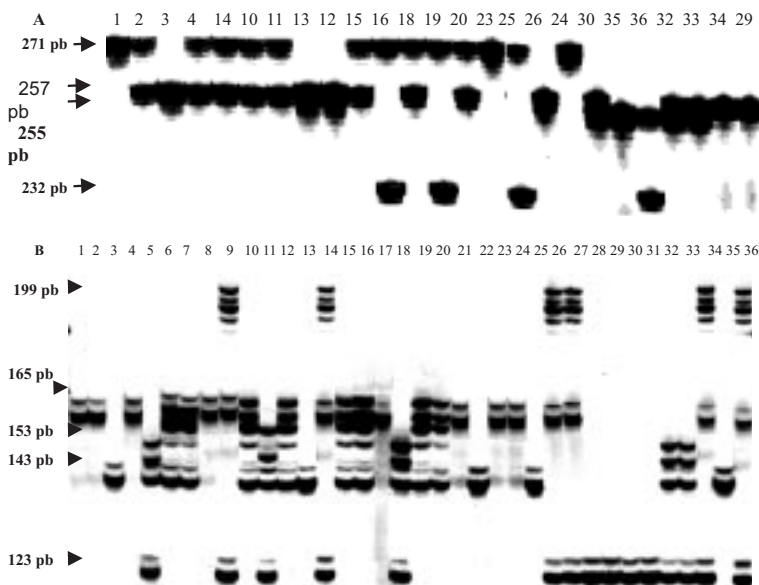


FIGURA 1 - Produtos da amplificação gerados pelos marcadores SSR UDP96-018 (A) e UDP96-008 (B) nas cultivares: 1-Sunred, 2-Mara, 3-Armking, 4-Sungold, 5-Sunlite, 6-Anita, 7-Dulce, 8-Bruna, 9-Pampeano, 10-Coral, 11-Marli, 12-Chiripá, 13-Della Nona, 14-Chimarrita, 15-Planalto, 16-Pialo, 17-Chirua, 18-Vila Nova, 19-Saco de Touro, 20-Premier, 21-Charme, 22-Marfim, 23-Riograndense, 24-Leonense, 25-Eldorado, 26-Maciel, 27-Jubileu, 28-Pepita, 29-Aldrighi, 30-Diamante, 31-Precocinho, 32-Esmeralda, 33-Jade, 34-Capdeboscq, 35-Granada e 36-Magno. À esquerda da figura está indicado o tamanho dos alelos. Pelotas-RS, 2002.

quais 55 (98,2%) foram polimórficos e permitiram a diferenciação de 32 genótipos dos 36 analisados. Somente UDP98-022 apresentou uma banda monomórfica para as cultivares testadas. Este resultado deve-se, principalmente, à presença de cultivares pertencentes ao grupo indústria, dupla finalidade e consumo *in natura*, o qual contribui para aumentar a proporção de alelos distintos.

Com a repetição das análises em dois laboratórios distintos, verificou-se que genótipos iguais, porém, de diferente procedência, apresentaram perfis eletroforéticos iguais, confirmando a confiabilidade da técnica, também verificada na análise genética de diferentes espécies do gênero *Prunus* (Pancaldi et al., 1999; Bianchi et al., 2002). Essa confiabilidade e o poder da técnica SSR foi também demonstrada por Sosinski et al. (2000) na diferenciação de pessegueiros da cv. Springcrest, nos quais os microssatélites detectaram variabilidade entre plantas da mesma cultivar, porém originadas de três fontes diferentes.

Das 8 nectarineiras analisadas, 4 ficaram no mesmo grupo da cultivar de pessegueiro Charme (Figura 2). As cultivares de nectarineira Armking e Sunlite, Anita e Dulce formaram dois grupos distintos, porém sempre relacionados com cultivares de pessegueiro para consumo *in natura*. A similaridade genética estimada para 'Dulce' e 'Anita' com os microssatélites foi de 0,82 (Figura 2), sendo maior do que aquela obtida por Lima (2001) através do polimorfismo do DNA amplificado ao acaso ou RAPD (0,75). Para as cultivares Coral e Marfim, a similaridade estimada por RAPD foi de 0,87 (Lima, 2001), e de 0,85 com os microssatélites, revelando boa concordância entre os dados gerados por ambos os marcadores e os dados genealógicos destas cultivares (Tabela 1).

Dentre os pessegueiros para consumo *in natura*, os maiores valores de similaridade foram verificadas entre as cvs. Coral e Planalto (0,94) e Della Nona e Marfim (0,90) (Figura 2). Isto se deve à constituição genética das 4 cultivares, já que 'Coral' e 'Della Nona' possuem como

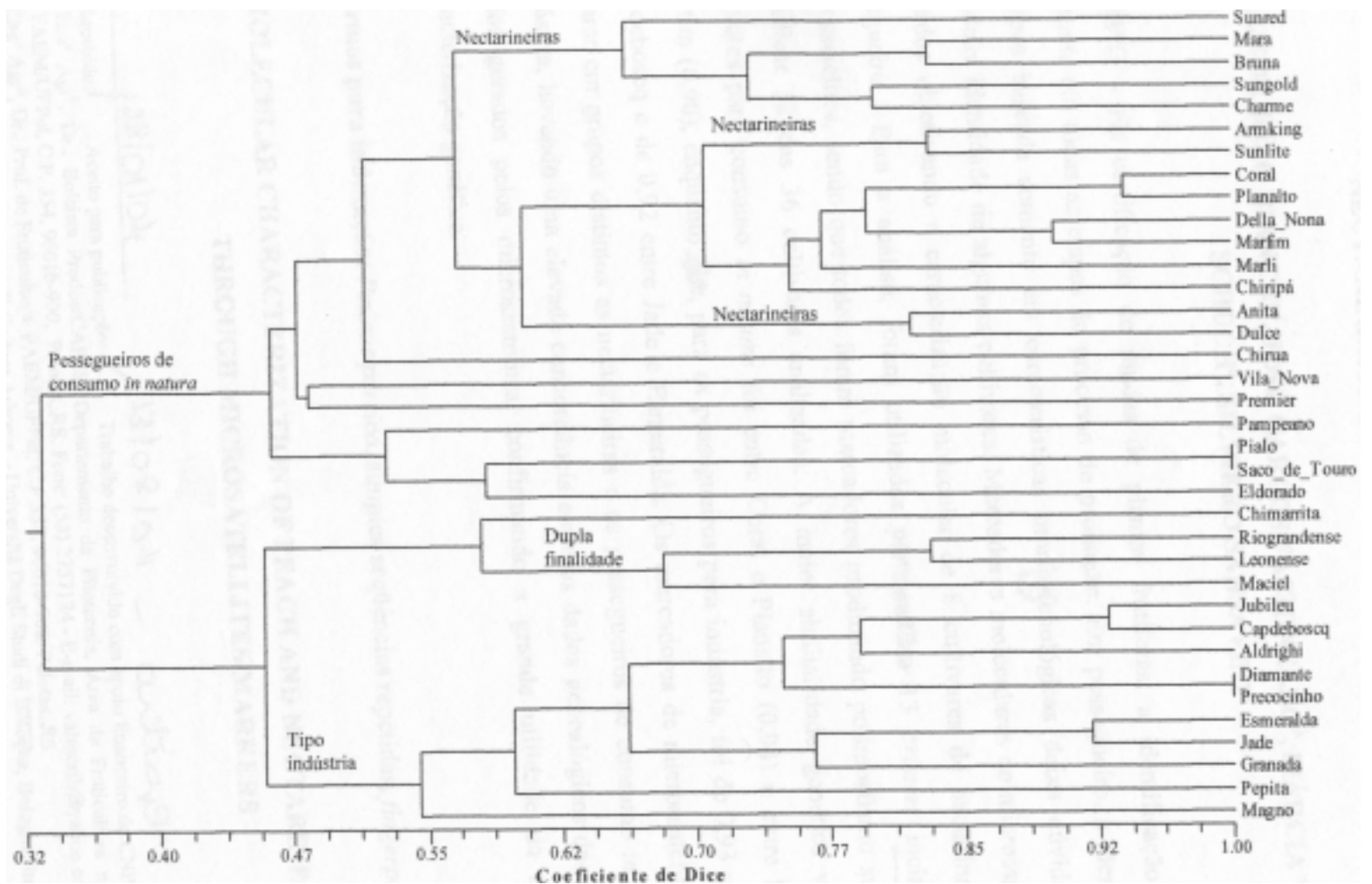


FIGURA 2 – Dendrograma baseado na análise de marcadores microssatélites em 36 cultivares de *Prunus persica* (L.) Batsch, calculado pelo método UPGMA. Pelotas-RS, 2002.

ancestral comum a cv. Delicioso, enquanto 'Planalto' e 'Marfim' têm em comum a cv. Coral (Tabela 1). Esta mesma comparação pode ser feita entre as cvs. Marli e Chiripá, que possuem em comum a cv. Delicioso e estão agrupadas mais próximas de 'Marfim' e 'Della Nona', o que pode ser atribuído ao fato de 'Della Nona' e 'Chiripá' possuírem como genitor comum a cv. Nectared 5 (Tabela 1).

Obteve-se uma clara separação dos pessegueiros tipo indústria. Os de dupla finalidade formaram um grupo separado, porém mais próximo do tipo indústria, com exceção da cv. Eldorado (Figura 2). Neste caso, também se observa uma estreita relação entre os dados moleculares e os genealógicos (Tabela 1) de 'Riograndense' e 'Leonense' com similaridade estimada em 0,83 (Figura 2), ambos com origem das cvs. Brillante e NJC97.

De acordo com os dados da Tabela 1, existe um estreito grau de parentesco entre as cultivares Precocinho e Diamante. Neste trabalho, não foi possível a diferenciação destas duas cultivares, possivelmente em função do número de *primers* e do alto grau de parentesco. A análise com um maior número de *primers* microsatélites, possivelmente, poderá diferenciar estas duas cultivares, pois, de acordo com análise RAPD realizada por LIMA (2001), foi possível diferenciar estes dois genótipos, confirmando que não se trata da mesma cultivar. Para 'Pialo' e 'Saco de Touro', a análise com 13 *primers* SSR produziram perfis eletroforéticos idênticos. Neste caso, análises com maior número de primers e uma nova avaliação das características morfofenológicas das plantas se fazem necessárias, além da utilização de outras técnicas moleculares como RAPD e polimorfismo no comprimento dos fragmentos amplificados ou AFLP, a fim de verificar se esse é um caso de sinonímia.

De modo geral, um grande número de polimorfismo foi gerado pelos marcadores microsatélites utilizados, principalmente por UDP98-414, UDP96-005, UPD96-003. Verificou-se que a técnica apresenta vantagens quando comparada aos RAPD e isoenzimas, devido ao maior número de polimorfismo e repetibilidade dos resultados. Além disso, possui alta aplicabilidade entre espécies correlacionadas, conforme verificado por Pancaldi et al. (1999) e por Cipriani et al. (1999), em várias espécies de *Prunus* spp..

CONCLUSÕES

1) A técnica baseada em marcadores de microsatélites produz elevado polimorfismo entre cultivares de pessegueiro.

2) Marcadores de microsatélites podem ser utilizados na certificação da idoneidade genética de plantas de pessegueiro e nectarineira cultivadas no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ARULSEKAR, S.; PARFITT, D.E. Isozymes analyses procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio, and fig. **HortScience**, Alexandria, v.21, n.4, p.928-933, 1986.
- BIANCHI, V.J.; VENTURI, S.; FACHINELLO, J.C.; TARTARINI, S.; SANSAVINI, S. I marcatori AFLP e SSR, risolutivi nella identificazione genetica delle varietà di susino. **Frutticoltura**, Bologna, n.4, p.83-87, 2002.
- CIPRIANI, G.; LOT, G.; HUANG, W.G.; MARRAZZO, M.T.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. AC/GT and AG/CT micosatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterization and cross-species application in *Prunus*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, n.99, p.65-72, 1999.
- LIMA, M.R.M.S. **Caracterização de cultivares de *Prunus persica* (L.) Batsch através de marcadores moleculares**. 2001. 33f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2001.
- MULCAHY, D.L.; CRESTI, M.; SANSAVINI, S.; DOUGLAS, G.C.; LINSKENS, H.F.; BERGAMINI MULCAHY, G.; VIGNANI, R.; PANCALDI, M. The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genotypes. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.54, p.89-96, 1993.
- PANCALDI, M.; BATISTTINI, S. Utilizzo degli isoenzime per l'identificazione varietale in albicocco. **Atti Convegno AgroBioFrut**, Cesena, p.195-202, 1991.
- PANCALDI, M.; KAÇAR, T.; KUDEN, A.B.; SANSAVINI, S. Impiego di microsatelliti sequenziati nel pesco per il "fingerprinting" e l'analisi genealogica del mandorlo. **Frutticoltura**, Bologna, n.11, p.70-73, 1999.
- ROHLF, F.J. **NTSYS.PC**. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. New York: Exeter Publications, 2000.
- SANSAVINI, S. Biotecnologie frutticole: le nuove frontiere delle ricerche per il miglioramento genetico e la propagazione delle piante da frutto. **Frutticoltura**, Bologna, n.5, p.75-81, 1998.
- SOSINSKI, B.; GANNAVAPU, M.; HAGER, L.D. Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, n.101, p.421-428, 2000.
- VINATZER, B.; PANCALDI, M.; SANSAVINI, S. Potenzialità e limiti del "fingerprinting" nell'identificazione varietale del pesco. **Frutticoltura**, Bologna, n.4, p.97-101, 1999.