

CARACTERIZAÇÃO DE TRÊS GENÓTIPOS DE UMEZEIRO (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) POR MARCADORES RAPD¹

NEWTON ALEX MAYER², ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS³, FERNANDO MENDES PEREIRA⁴, ESTER WICKERT³

RESUMO - Um projeto de pesquisa visando à utilização de clones de umezeiro (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) como porta-enxertos para pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch] está sendo conduzido na FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal-SP, com promissoras perspectivas de sucesso. Três genótipos de umezeiro foram selecionados de acordo com características agrônomicas desejáveis para esta finalidade. A distinção dos três genótipos entre si, baseada exclusivamente em características morfológicas, apresenta limitações. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi identificar marcadores RAPD capazes de diferenciar e caracterizar os Clones 05, 15 e a cv. Rigitano (Clone 10) de umezeiro, utilizando-se das cultivares Aurora-1 e Okinawa de pessegueiro como outgroup. Dos 220 primers testados, foram selecionados 42, que amplificaram todos os cinco genótipos. Verificou-se que os marcadores RAPD permitiram a distinção entre o Clone 05, o Clone 15 e a cv. Rigitano de umezeiro, demonstrando a existência de variabilidade genética entre os mesmos. Dentre os três genótipos de umezeiro estudados, constatou-se que a similaridade genética é maior entre o Clone 05 e o Clone 15.

Temas para indexação: frutas de caroço, porta-enxerto, marcadores moleculares.

CHARACTERIZATION OF THREE MUME GENOTYPES (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) BY RAPD MARKERS

ABSTRACT - A research project with the objective to develop mume clones (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.), to be used as rootstocks for peach tree [*Prunus persica* (L.) Batsch] is being carried out at the Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Jaboticabal Campus, São Paulo State, Brazil. This project showed promising perspectives of success, with three clones that were selected according to their characteristics for peach rootstock. But the distinction of the three clones among them, based only in morphologic characteristics, has presented limitations. The objective of the present research was to identify RAPD markers able to characterize and differentiate the 05 and 15 Clones and Rigitano mume cultivar, using Aurora-1 and Okinawa peach tree as outgroup. Among the 220 tested primers, 42 were selected and used to amplify the five genotypes. RAPD markers allowed the distinction among 05 Clone, 15 Clone and Rigitano, selected in FCAV/UNESP, showing presence of genetic diversity among them. These markers also showed that among the three mume genotypes studied, the genetic similarity is bigger between 05 Clone and 15 Clone.

Index terms: stone fruits, rootstock, molecular markers.

INTRODUÇÃO

O gênero *Prunus* inclui aproximadamente 200 espécies e é dividido em 6 subgêneros, que são: 1) *Prunophora* (ameixeiras em sua maioria); 2) *Amygdalus* (pessegueiros e amendoieiras); 3) *Cerasus* (cerejeiras); 4) *Lithocerasus* (cerejeiras); 5) *Padus* (cerejeiras de cachos), e 6) *Laurocerasus* (cerejeiras amarelas). O subgênero *Prunophora* é subdividido em 3 seções: a) *Euprunus* (ameixeiras européias e asiáticas); b) *Prunocerasus* (ameixeiras americanas), e c) *Armeniaca* (damasqueiro e umezeiro) (Rehder, 1940, citado por Shimada et al., 2001). Entretanto, devido à facilidade de hibridização natural entre as espécies do gênero *Prunus*, a classificação botânica tem sido controversa em alguns casos, em função da facilidade de desenvolvimento de tipos intermediários entre duas espécies (Dosba, 1994, citado por Casas et al., 1999).

No caso de ameixeiras, há ocorrência de cultivares auto-incompatíveis e, em muitos casos, há dificuldade em determinar se uma cultivar provém de uma única espécie ou do cruzamento entre diferentes espécies. Outras cultivares são híbridas e resultam de cruzamentos naturais entre espécies de ameixeiras, umezeiro, damasqueiro ou até mesmo com pessegueiro, o que tem dificultado a identificação de cultivares segundo sua origem (Shimada et al., 1999).

A identificação de cultivares de frutíferas tem sido baseada em características morfológicas e agrônomicas dos genótipos. Entretanto, existe substancial variação intra-específica, especialmente nas características de folhas e de frutos, o que dificulta a distinção dos genótipos baseando-se somente na morfologia externa, além de ser um processo lento, devido ao longo período de juvenilidade das plantas lenhosas. Tratando-se de porta-enxertos, a identificação de caracteres morfológicos é ainda mais difícil após a enxertia, além do que estes caracteres

¹(Trabalho 197-07). Recebido em: 13-08-2007. Aceito para publicação em: 17-07-2008.

²Embrapa Clima Temperado, BR 392, Km 78, CP 403, 96001-970, Pelotas-RS. E-mail: alex@cpact.embrapa.br.

³Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Depto. de Tecnologia, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal-SP. E-mail: egerle@fcav.unesp.br, ewickert@terra.com.br.

⁴UNESP/FCAV, Depto de Produção Vegetal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal-SP. E-mail: inagrojab@yahoo.com.br

são geralmente influenciados por fatores ambientais e pelo estágio de crescimento da planta (Casas et al., 1999; Wünsch & Hormaza, 2002).

Marcadores RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) têm sido utilizados em diferentes espécies de frutíferas, inclusive para o gênero *Prunus*. Shimada et al. (2001) estudaram a diversidade genética de 4 espécies de *Prunus*, subgênero *Lithocerasus*, utilizando 40 diferentes acessos, sendo que marcadores RAPD permitiram a diferenciação de todos os acessos. Em um estudo com 42 diferentes acessos de ameixeira (*Prunus salicina*), marcadores moleculares também foram eficientes na discriminação de todos os acessos (Shimada et al., 1999). Os autores concluíram que a técnica de RAPD é viável para identificar diferentes acessos de ameixeira.

A relação genética entre 54 cultivares de umezeiro foi estudada com estes mesmos marcadores, possibilitando a classificação em 7 diferentes grupos, concordando com sua origem geográfica (Shimada et al., 1994, citado por Wünsch & Hormaza, 2002). Em damasqueiros (*Prunus armeniaca*), o uso de marcadores RAPD possibilitou a distinção de 19 cultivares originárias de 4 diferentes regiões geográficas (Mariniello et al., 2002).

Em um projeto de pesquisa visando à seleção de clones de umezeiro para utilização como porta-enxerto de pessegueiro, três clones, identificados como Clone 05, Clone 10 e Clone 15, foram considerados promissores. Os três clones foram selecionados na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), em função de características desejáveis, destacando-se a resistência a *Meloidogyne javanica* (Mayer et al., 2003) e *M. incognita* (Mayer et al., 2005) e o menor vigor do Clone 10 (Mayer & Pereira, 2006). O avanço dos estudos permitiu o lançamento da cultivar Rigitano (Pereira et al., 2007), inicialmente selecionada como Clone 10. Entretanto, essa cultivar apresenta características morfológicas muito semelhantes aos outros dois genótipos, os Clones 05 e 15, de tal forma que se mostraram limitantes para a discriminação dos três genótipos entre si, pela impossibilidade de serem influenciados pelas condições ambientais. Dessa forma, estudos moleculares visando à distinção dos genótipos em nível molecular tornam-se necessários, uma vez que fornecem subsídios e informações para viabilizar o processo de registro dos genótipos, além do controle sobre a identidade genética dos porta-enxertos, que é essencial na certificação de mudas utilizadas na fruticultura moderna.

O objetivo do presente trabalho foi identificar marcadores moleculares RAPD capazes de diferenciar e caracterizar o Clone 05, o Clone 15 e a cv. Rigitano de umezeiro, selecionados na FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal-SP como porta-enxertos para pessegueiro.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Obtenção dos clones. A partir de um lote de plantas de umezeiro (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.), propagadas por germinação de sementes oriundas de genitores desconhecidos e mantidas em cultivo na Estação Experimental de Jundiá – IAC, foram colhidos ramos herbáceos de cada planta, individualmente

identificados. Esses ramos foram transportados ao Ripado de Fruticultura do Departamento de Produção Vegetal da FCAV/UNESP, onde se iniciaram os trabalhos de seleção para características agrônômicas desejáveis como porta-enxertos, em 1998 (Nachtigal et al., 1999; Pereira et al., 2007).

Os três genótipos que se destacaram - o Clone 05, o Clone 10 (cv. Rigitano) e o Clone 15, foram propagados por enraizamento de estacas herbáceas (Mayer et al., 2001). Após aclimação em viveiro, os clones foram transplantados para o campo, em maio de 2002, sob espaçamento de 0,5 m entre plantas, em área experimental localizada no Sítio São João, Município de Taquaritinga-SP. Em janeiro de 2006, foram colhidos aproximadamente 300 g (matéria fresca) de folhas jovens de uma única planta identificada de cada clone de umezeiro. As folhas foram armazenadas em sacos plásticos identificados e colocadas em caixa de isopor contendo gelo. Do mesmo modo, também foram colhidas folhas jovens de pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch] da cultivar-copa Aurora-1 e do porta-enxerto 'Okinawa' para serem utilizadas como "outgroup", sendo utilizada uma única planta de cada cultivar, ambas mantidas em condições de campo em área destinada à manutenção de plantas-matrizes, também localizada no Sítio São João.

b) Obtenção dos marcadores RAPD. Folhas jovens dos três clones foram utilizadas para extração do DNA conforme o protocolo de Shillito & Saul (1988). A quantificação do DNA e sua qualidade foram avaliadas com o auxílio de um espectrofotômetro (BECKMAN-DU 640), medindo-se a absorvância de cada amostra em contraste com uma amostra de H₂O destilada livre de DNA, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (Sambrook et al., 1989).

A reação de amplificação do DNA genômico para a obtenção dos marcadores RAPD constituiu-se de 30 ng de DNA genômico, tampão de PCR 1X (50 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, pH 8,4) (Invitrogen, CA, USA), 2,5 mM MgCl₂ (Invitrogen, CA, USA), 200 μM dNTP (Invitrogen, CA, USA), 1,5 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, CA, USA), 10 pmol de oligonucleotídeo iniciador ('primer') e água pura estéril q.s.p. para 20 μL. Foram utilizados 220 primers do Kit de primers Operon Technologies Inc..

A amplificação foi realizada em termociclador PTC 100 Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc., e submetida a uma ciclagem de 92°C por 3 min, 47 repetições de (92°C por 1 min, 36°C por 1 min e 45 s e 72°C por 2 min), 72°C por 7 min e um ciclo final a 5°C.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em tampão TEB 1X (89 mM Tris; 89 mM Ácido Bórico; 2,5 mM EDTA, pH 8,3), utilizando géis de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo (0,5 mg/ml) durante 1h 30min a 90Volts. Como padrão de tamanho molecular, foi utilizado o marcador 1 kb DNA ladder plus (Invitrogen, CA, USA) e o marcador 100 pb DNA ladder (Invitrogen, CA, USA). A visualização dos resultados foi realizada em equipamento de fotodocumentação Gel-Doc 1.000 (BioRad, CA, USA).

c) Análise dos marcadores obtidos. A análise dos marcadores foi realizada através da construção de uma matriz binária, na qual se analisaram a presença (1) e a ausência (0) de banda em cada material para os diferentes primers. A matriz binária

gerada foi convertida em matriz de distância através do software PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony - versão 3.01) (Swofford, 2002). A matriz de distância obtida foi então analisada pelo software MEGA (versão 2.1) (Kumar et al., 2004), utilizando-se do Método de Distância com algoritmo de agrupamento de Neighbour Joining (Saitou & Nei, 1987) para a construção do filograma das relações filogenéticas desenvolvidas pelos clones e do cálculo dos índices de distância genética entre os materiais do estudo. A medida da distância genética interespecífica é uma medida da diversidade genética existente entre os indivíduos de um grupo em relação a outros grupos (Saitou & Nei, 1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a determinação das melhores condições de amplificação, foram testados 220 primers, dos quais 42 amplificaram os genótipos de umezeiro e pessegueiro utilizados neste trabalho (Tabela 1). Dos 42 primers que amplificaram fragmentos de DNA para todos os materiais, 24 primers apresentaram polimorfismo para os clones de umezeiro, ou seja, 10,9 % do total de primers testados. A Tabela 1 mostra que, nos 42 primers que amplificaram os genótipos de umezeiro, foram detectadas 432 bandas no total, sendo que 330 foram bandas monomórficas e 102 polimórficas (23,6%) para o umezeiro. Observa-se também que, em 9 primers, foram detectadas 5 ou mais bandas polimórficas para o umezeiro. Já entre as duas cultivares de pessegueiro utilizadas como “outgroup”, foram detectadas 346 bandas monomórficas e 86 bandas polimórficas.

Os primers OPC07 (Figura 1) e OPB12 (Figura 2) mostraram-se polimórficos em relação aos três clones, evidenciando a possibilidade de diferenciar os clones entre si e em relação ao outgroup. O primer OPC07 amplificou dois fragmentos exclusivos para Clone 05, com aproximadamente 750 pb e 350 pb. Na cv. Rigitano, detectou-se a presença de um fragmento exclusivo de cerca de 1.490 pb. Esse primer permitiu a distinção dos três genótipos de umezeiro. Dessa forma, a identificação dos Clone 05, Clone 15 e da cv. Rigitano de umezeiro tornou-se facilitada e precisa, pois, com o uso de um único primer, foi possível identificar os genótipos, independentemente dos fatores ambientais existentes onde a planta se encontra. Já o primer OPB12 (Figura 2) permitiu a observação da presença de um fragmento polimórfico exclusivo para o Clone 15 com cerca de 420 pb. Esse primer, entretanto, não permitiu a discriminação do Clone 05 e da cv. Rigitano. Assim, a análise conjunta da amplificação obtida através dos primers OPC07 e OPB12 permitiu a discriminação através de bandas características para os três genótipos. Esse fato ocorreu para vários primers, de acordo com o exemplificado para os primers OPC07 e OPB12. Dessa forma, verificou-se que os marcadores moleculares RAPD foram eficientes na identificação dos clones.

Marcadores RAPD foram utilizados com sucesso no levantamento da diversidade genética existente entre 40 acessos do gênero *Prunus*, representando os subgêneros *Prunophora* (ao qual pertence *P. mume*), *Amygdalus*, *Lithocerasus* e *Cerasus* (Shimada et al., 2001). Os autores verificaram que 4 espécies

pertencentes ao subgênero *Lithocerasus* apresentaram maior similaridade com membros dos subgêneros *Prunophora* e *Amygdalus* do que com *Cerasus*, sugerindo que os acessos estariam mais bem classificados se agrupados em apenas dois grupos: *Prunophora-Amygdalus* e *Cerasus*, uma vez que o subgênero *Lithocerasus* não é aceito por todos os taxonomistas.

Os mesmos marcadores mostraram-se eficientes no estudo da diversidade genética de 42 acessos de ameixeira (*Prunus* spp), sendo que foi possível identificar os acessos do grupo Europeu (*P. domestica* L., *P. insititia* L.) e do grupo Japonês (*P. cerasifera* Ehrh.), bem como os cruzamentos oriundos a partir desses dois grupos (Shimada et al., 1999), concordando com classificações já existentes.

Marcadores RAPD constituem-se a classe de marcadores moleculares mais utilizados atualmente (Sadder & Ateyyeh, 2006). Isto se deve a suas características de rapidez e simplicidade na obtenção dos resultados, cobertura de todo o genoma do indivíduo em estudo, por sua facilidade de implementação e menor custo comparativo a outros marcadores. Por outro lado, são marcadores criticados por sua falta de repetibilidade quando são comparados resultados obtidos por diferentes laboratórios. Entretanto, o problema da repetibilidade pode ser evitado ao tomar-se uma série de cuidados em relação ao uso de DNA íntegro e puro, reagentes de qualidade e uso de um mesmo termociclador para todas as reações, além de repetir as reações pelo menos três vezes para a confirmação dos padrões de amplificação.

O conhecimento da distância genética entre porta-enxerto (genótipos de umezeiro) e a cultivar-copa (cv. Aurora-1 de pessegueiro) pode auxiliar nos estudos sobre compatibilidade de enxertia e ausência de sintomas de incompatibilidade, revelada nos estudos conduzidos na FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal-SP, com esses genótipos (Mayer, 2004; Mayer et al., 2006). Segundo Hartmann et al. (1997), a compatibilidade de enxertia só ocorre entre duas espécies botanicamente afins e próximas geneticamente.

Na Tabela 2, são apresentadas as distâncias genéticas existentes entre os cinco genótipos envolvidos no presente estudo. Verifica-se que a menor distância genética existente ocorre entre a cultivar Aurora-1 de pessegueiro com o porta-enxerto ‘Okinawa’ (0.171). Entre os três genótipos de umezeiro, observa-se que a menor distância genética ocorre entre o Clone 05 e o Clone 15 (0.305). A distância genética entre os genótipos também revela a maior proximidade genética dos três genótipos de umezeiro com a cv. Aurora-1 de pessegueiro (valores entre 0.595 e 0.614), comparativamente à encontrada entre os três genótipos de umezeiro com a cv. Okinawa (valores entre 0.662 e 0.700).

O número de bandas polimórficas entre os genótipos também é apresentado na Tabela 2. Observa-se que, entre os três genótipos de umezeiro, o número de bandas polimórficas foi maior (entre 64 e 70), comparativamente ao obtido entre as duas cultivares de pessegueiro (36). Esse resultado reflete a maior similaridade genética existente entre ‘Aurora-1’ e ‘Okinawa’, comparativamente à existente entre o Clone 05, o Clone 15 e a cv. Rigitano de umezeiro.

De acordo com o filograma apresentado na Figura 3, existe maior similaridade genética entre os Clones 05 e 15, com

coeficiente de similaridade de aproximadamente 0.15. A cv. Rigitano, de acordo com os marcadores RAPD, apresentou similaridade de 0.17, em relação aos Clones 05 e 15, revelando maior divergência genética em relação a estes.

O filograma também demonstra similaridade de aproximadamente 0.09 entre 'Okinawa' e 'Aurora-1'. O porta-enxerto 'Okinawa', originário do programa de Melhoramento Genético da Universidade da Flórida, foi obtido de um lote de sementes enviado por Henriz Chikasne, de Okinawa, no Japão. Foi introduzido no Brasil em 1969, por meio de intercâmbio de material genético entre o IAC e a Universidade da Flórida (Ojima et al., 1999). A cultivar-copa Aurora-1 foi obtida, em segunda geração, do cruzamento entre o pessegueiro 'Tutu' (IAC 1353-1) e a nectarineira 'Colombina' (Fla 19-37 S), oriunda do Programa de Melhoramento Genético e Cultural do Instituto Agrônomo de Campinas (Ojima et al., 1989). Por sua vez, a nectarineira 'Colombina' é originária de polinização livre de 'NIN 21' ('Okinawa' x 'Panamint'), daí a similaridade genética existente entre 'Aurora-1' e 'Okinawa' (Barbosa, 2007, comunicação pessoal).

Verifica-se que os marcadores RAPD se mostraram eficientes na discriminação dos três genótipos de umezeiro em estudo, bem como forneceram bandas específicas para cada clone com capacidade para serem convertidas em marcadores SCAR. Essa abordagem apresenta grande importância, pois ao identificar-se molecularmente cultivares, é possível preservar o direito de propriedade bem como a proteção das cultivares, evitando a criação e proliferação de fraudes. Marcadores SCAR poderiam ser desenhados a partir dos fragmentos polimórficos para cada clone, permitindo a discriminação destes e facilitando a identificação no caso de dúvida em relação a materiais desconhecidos, se relacionados aos três clones em questão.

O uso das novas técnicas de biologia molecular na certificação de espécies frutíferas poderá acelerar e otimizar o processo de identificação de cultivares, pela caracterização molecular de cada genótipo em qualquer estágio de desenvolvimento, independentemente dos fatores ambientais que podem influenciar o fenótipo. Além disso, essas técnicas podem auxiliar em programas de melhoramento genético, selecionando genes de interesse, na construção de mapas genéticos, em estudos de similaridade e de distância genética entre cultivares e espécies, além de constituir eficientes métodos para o controle de qualidade e prevenção de fraudes (Mariniello et al., 2002; Wunsch & Hormaza, 2002).

TABELA 1- Relação dos primers selecionados, com suas respectivas seqüências e número de bandas polimórficas (NBP) e número de bandas monomórficas (NBM) entre os clones de umezeiro (Clone 05, cv. Rigitano e Clone 15) e cultivares de pessegueiro (Okinawa e Aurora-1) estudados.

Primer	Seqüência 5' - 3'	umezeiro		pessegueiro	
		NBP	NBM	NBP	NBM
OPA03	AGTCAGCCAC	00	07	01	06
OPA04	AATCGGGCTG	00	10	05	05
OPA05	AGGGGTCTTG	02	09	02	09
OPA06	GGTCCCTGAC	03	02	00	05
OPB10	CTGCTGGGAC	01	06	00	07
OPB12	CCTTGACGCA	02	09	06	05
OPB17	AGGGAACGAG	00	14	05	09
OPC01	TTCGAGCCAG	03	03	00	06
OPC02	GTGAGGCGTC	03	08	05	06
OPC03	GGGGTCTTT	05	04	04	05
OPC07	GTCCCACGA	12	05	03	14
OPC08	TGGACCGGTG	01	06	01	06
OPC09	CTCACCGTCC	04	09	03	10
OPC10	TGTCTGGGTG	00	11	04	07
OPC11	AAAGCTGCGG	00	08	02	06
OPC12	TGTCATCCCC	04	04	02	06
OPC14	TGCGTGCTTG	03	08	00	11
OPC15	GACGGATCAG	00	04	02	02
OPC17	TTCCCCCAG	05	08	04	09
OPC18	TGAGTGGGTG	00	14	01	13
OPC19	GTTGCCAGCC	00	09	01	08
OPC20	ACTTCGCCAC	03	12	02	13
OPD03	GTCCCGTCA	00	05	01	04
OPD07	TTGGCACGGG	00	05	00	05
OPD08	GTGTCCCCA	00	12	06	06
OPD11	AGCGCCATTG	00	09	03	06
OPD13	GGGGTGACGA	01	12	00	13
OPD20	ACCCGGTAC	00	09	04	05
OPF09	CCAAGTTC	00	09	00	09
OPH05	AGTCGTCCCC	07	02	03	06
OPH08	GAAACACCCC	07	06	01	12
OPH12	ACGGCATGT	06	12	03	15
OPH14	ACCAGGTGG	00	06	01	05
OPH16	TCTCAGCTGG	01	11	01	11
OPH17	GAATCGCCA	08	05	02	11
OPI02	GGAGGAGAGG	00	07	01	06
OPI06	AAGGGCGCAG	00	08	01	07
OPI07	CAGCGACAAG	01	10	01	10
OPI13	CTGGGGCTGA	03	06	00	09
OPI14	TGACGGCGGT	00	10	02	08
OPI17	GGTGGTGATG	06	08	03	11
OPI18	TGCCACGCT	11	08	00	19
Total	-	102	330	86	346
(NBP e NBM)					
Total de bandas por espécie	-	432		432	

TABELA 2- Distância genética e número de bandas polimórficas (em itálico) entre o Clone 05, cv. Rigitano e Clone 15 de umezeiro (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) e cultivares Okinawa e Aurora-1 de pessegueiro obtidas com o uso de marcadores RAPD.

	Clone 05	'Rigitano'	Clone 15	'Okinawa'	'Aurora-1'
Clone 05	-	0.333	0.305	0.700	0.605
'Rigitano'	70	-	0.324	0.681	0.614
Clone 15	64	68	-	0.662	0.595
'Okinawa'	147	143	139	-	0.171
'Aurora-1'	127	129	125	36	-

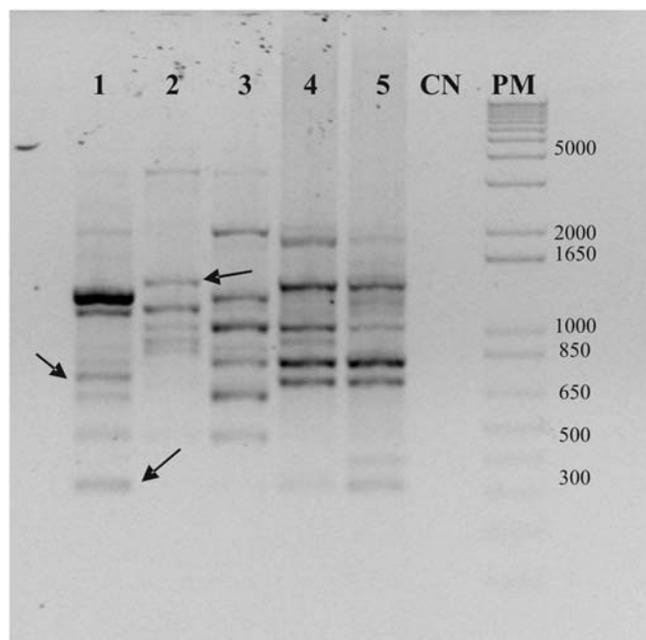


FIGURA 1- Produto da amplificação por RAPD utilizando-se do primer OPB12 com presença de fragmentos exclusivos indicados por seta. PM = padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Plus Ladder (Invitrogen). CN = controle negativo da PCR, 1 = Clone 05; 2 = cv. Rigitano; 3 = Clone 15; 4 = 'Okinawa'; 5 = 'Aurora-1'.

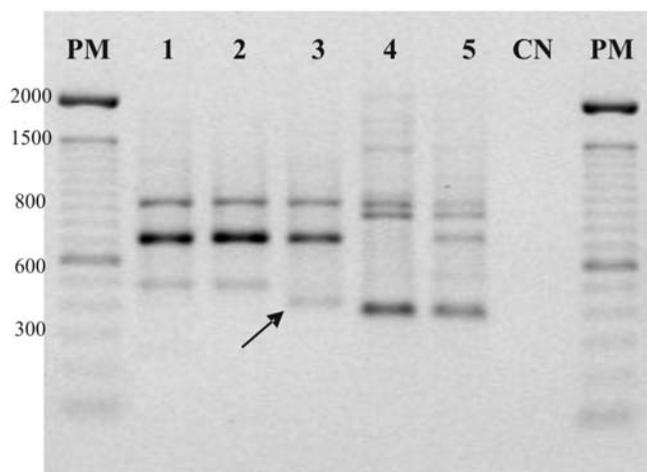


FIGURA 2- Produto da amplificação por RAPD utilizando-se do primer OPC07 com presença de fragmentos exclusivos indicados por seta. PM = padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Plus Ladder (Invitrogen). CN = controle negativo da PCR, 1 = Clone 05; 2 = cv. Rigitano; 3 = Clone 15; 4 = cv. Okinawa; 5 = cv. Aurora-1.

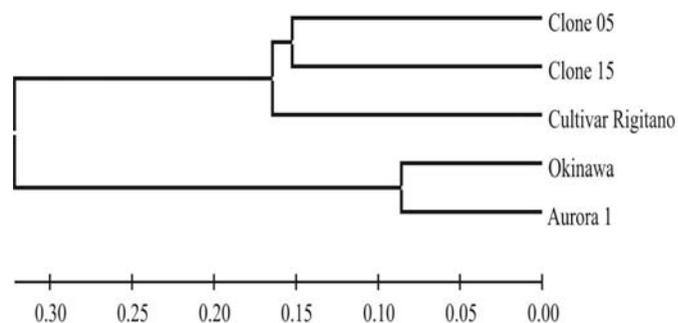


FIGURA 3- Relações filogenéticas estabelecidas entre os genótipos de umezeiro verificadas por marcadores moleculares RAPD. Pessegueiros 'Aurora-1' e 'Okinawa' foram utilizados como "outgroup".

CONCLUSÕES

1-Os marcadores RAPD permitiram a distinção do Clone 05, do Clone 15 e da cv. Rigitano de umezeiro, selecionados na FCAV/UNESP, como porta-enxertos para pessegueiro.

2-Os primers OPC07 e OPB12 revelaram bandas polimórficas que permitiram a distinção do Clone 05, do Clone 15 e da cv. Rigitano entre si.

3-Dentre os três genótipos de umezeiro estudados, constatou-se que a similaridade genética é maior entre o Clone 05 e o Clone 15.

AGRADECIMENTOS

À Fapesp, pelo apoio financeiro (Processos nºs 05/50157-7 e 06/50427-7).

REFERÊNCIAS

- CASAS, A.M.; IGARTUA, E.; BALAGUER, G.; MORENO, M.A. Genetic diversity of *Prunus* rootstocks analyzed by RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, n.110, p.139-149, 1999.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR., F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 6th ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. 770p.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; AND NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, London, n.5, p.150-163, 2004.
- MARINIELLO, L.; SOMMELLA, M.G.; SORRENTINO, A.; FORLANI, M.; PORTA, R. Identification of *Prunus armeniaca* cultivars by RAPD and SCAR markers. **Biotechnology Letters**, Surrey, n.24, p.749-755, 2002.

- MAYER, N.A.; PEREIRA, F.M.; NACHTIGAL, J.C. Propagação do umezeiro (*Prunus mume* Sieb & Zucc.) por estaquia herbácea. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.673-676, 2001.
- MAYER, N.A.; PEREIRA, F.M.; SANTOS, J.M. dos. Reação de clones de umezeiro (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) e cultivares de pessegueiro a *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.1, p.181-183, 2003.
- MAYER, N.A. **Crescimento de clones de umezeiro (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) propagados por estacas herbáceas, enxertia com o pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch], reação a três espécies de fitonematóides e desenvolvimento inicial no campo.** 2004. 114 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- MAYER, N.A.; PEREIRA, F.M.; SANTOS, J.M. dos. Resistência de clones de umezeiro e cultivares de pessegueiro a *Meloidogyne incognita* (Nemata: Heteroderidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.2, p.335-337, 2005.
- MAYER, N.A.; PEREIRA, F.M. Vigor de clones de umezeiro e pessegueiro 'Okinawa' propagados por estacas herbáceas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.5, p.883-887, 2006.
- MAYER, N.A.; PEREIRA, F.M.; KOBAYASHI, V.Y. Desenvolvimento inicial no campo de pessegueiros Aurora-1 enxertados em clones de umezeiro e Okinawa propagados por estacas herbáceas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.2, p.231-235, 2006.
- NACHTIGAL, J.C.; PEREIRA, F.M.; CAMPO DALLORTO, F.A.; OJIMA, M.; MARTINS, F.P. Propagação vegetativa do umezeiro (*Prunus mume*) por meio de estacas herbáceas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21, n.2, p.226-228, 1999.
- OJIMA, M.; CAMPO DALLORTO, F.A.; BARBOSA, W.; MARTINS, F.P.; SANTOS, R.R.; RIGITANO, O. Aurora-1 e Aurora-2: novas cultivares de pêssego doce de polpa amarela. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 10., 1989, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBF, 1989. p.422-425.
- OJIMA, M.; CAMPO DALLORTO, F.A.; BARBOSA, W.; MARTINS, F.P.; SANTOS, R.R. dos. **Propagação do pessegueiro:** pesquisas no Instituto Agronômico. Campinas: Instituto Agronômico, 1999. 42p. (Documentos, 64).
- PEREIRA, F.M.; MAYER, N.A.; CAMPO DALLORTO, F.A. Rigitano: nova cultivar de umezeiro para porta-enxerto de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n.1, p.172-175, 2007.
- SADLER, M. T.; ATEYYEH, A. F. Molecular assessment of polymorphism among local Jordanian access of common fig (*Ficus carica* L.). **Acta Horticulturae**, The Hague, v.107, p.345-351, 2006.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.4, p.406-425, 1987.
- SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. **Molecular cloning:** a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SHILLITO, R.D.; SAUL, M.W. Protoplast isolation and transformation. In: GRIERSON, D., COVEY, S.N. **Plant molecular biology:** a practical approach. Oxford: IRL Press, 1988. p.161-186.
- SHIMADA, T.; HAYAMA, H.; HAJI, T.; YAMAGUCHI, M.; YOSHIDA, M. Genetic diversity of plums characterized by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Euphytica**, Wageningen, n.109, p.143-147, 1999.
- SHIMADA, T.; HAYAMA, H.; NISHIMURA, K.; YAMAGUCHI, M.; YOSHIDA, M. The genetic diversities of 4 species of subg. *Lithocerasus* (*Prunus*, *Rosaceae*) revealed by RAPD analysis. **Euphytica**, Wageningen, n.117, p.85-90, 2001.
- SWOFFORD, D. L. **PAUP:** phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) 4.0 beta. Sunderland: Sinauer, 2002.
- WÜNSCH, A.; HORMAZA, J.I. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. **Euphytica**, Wageningen, n.125, p.59-67, 2002.