



**VARIABILIDADE GENÉTICO-MOLECULAR DE ACESSOS DE PORTA-ENXERTOS DE
PESSEGUEIROS COLETADOS NOS MUNICÍPIOS DE PELotas E MORRO
REDONDO-RS**

VALMOR JOÃO BIANCHI¹; LUIS WILLIAN PACHECO ARGE²; DAIANE DE PINHO
BENEMANN³; JOSIANE CARLA ARGENTA⁴; ISADORA LEITE ESCOSTEGUY⁴; NEWTON
ALEX MAYER⁵

INTRODUÇÃO

A cultura do pessegueiro tem sido tradicionalmente cultivada no Estado do Rio Grande do Sul (RS). Pelotas e municípios vizinhos formam o principal pólo de produção de pêsego no Brasil, principalmente destinado à indústria de conservas. Embora essa seja uma região de referência na produção, a produtividade média dos pomares é baixa. Um dos fatores associados ao problema é o tipo de porta-enxerto empregado na formação de mudas. No RS predomina a enxertia de borbulhas sobre porta-enxertos obtidos a partir de sementes, provenientes do descarte dos caroços da agroindústria, os quais não tem garantia de idoneidade genética (TOFANELLI et al., 2001).

A variabilidade genética entre porta-enxertos de um mesmo pomar, juntamente com outros fatores de ordem climática e de manejo, influenciam negativamente a produção de frutas de corço no RS. Além disso, vem sendo registrado uma alta frequência de morte de plantas em pomares comerciais do RS, que tem sido associada ao porta-enxerto, produzido na sua grande maioria pelo uso de misturas de caroços de cultivares-copa tardias, obtidos nas indústrias de conservas, e que apresentam grande variabilidade genética. A caracterização da variabilidade dos porta-enxertos é de fundamental importância para definir estratégias de propagação, de seleção e de uso dos melhores genótipos, com características mais adequadas. Dentre as metodologias de caracterização genética, os marcadores moleculares se destacam pela eficiência, rapidez e baixo custo.

O presente estudo teve por objetivo caracterizar o polimorfismo de locos de microssatélites de porta-enxertos de pessegueiro, coletados em pomares comerciais na região de Pelotas-RS e com

¹ Eng. Agr., professor adjunto, Universidade Federal de Pelotas- RS, e-mail: valmorjb@yahoo.com

² Tecnólogo Agropec.: Frutic., Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas- RS, e-mail: l.willianpacheco@yahoo.com.br

³ Bióloga, Dra, Universidade Federal de Pelotas- RS, e-mail: daiane_bio@yahoo.com.br

⁴ Estudantes de agronomia, Universidade Federal de Pelotas- RS, e-mail: josiane_argenta@yahoo.com.br, isaescosteguy@gmail.com

⁵ Eng. Agr., pesquisador Embrapa Clima Temperado- RS, e-mail: alex@cpact.embrapa.br

ocorrência de morte precoce, a fim de elucidar a relação genética destes acessos com genótipos de Aldrighi e Capdeboscq.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados neste estudo 21 acessos do banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus*, da EMBRAPA Clima Temperado, originalmente selecionados em diferentes pomares comerciais localizados nos municípios de Pelotas e Morro Redondo (MAYER et al., 2009), conservados de forma *ex situ*. Os pomares onde se coletou os porta-enxertos apresentavam histórico de morte precoce, cujos porta-enxertos das mudas foram obtidos de misturas varietais de diferentes cultivares-copa tardias obtidos na indústria de conservas. Para a análise de locos microssatélites, DNA genômico foi extraído a partir de 150 mg de folhas jovens completamente expandidas utilizando o protocolo de Doyle e Doyle (1987). Após a extração o DNA foi quantificado e diluído para a concentração de 20 ng μL^{-1} .

A amplificação de DNA via PCR (Polymerase Chain Reaction) foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: tampão 10x 2,5 μM ; MgCl_2 2 mM; dNTPs 12 μM ; 0,125 μM de cada primer; 40 ng de DNA genômico; 1 unidade de Taq polimerase (Ludwig®) e água milli-Q estéril. A PCR foi realizada em termociclador Bio-Rad modelo ICycler® usando o seguinte perfil térmico: 1 ciclo de 94°C por 5 min.; 35 ciclos de 94°C por 45 seg.; temperatura de anelamento entre 58 a 60°C por 1 min.; 72°C por 2 min. e 30 seg.; 1 ciclo de 72°C por 10 min. Os pares de oligonucleotídeos iniciadores ou primers empregados neste estudo estão descritos na tabela 1.

Os produtos de PCR foram desnaturados com 32% de solução desnaturante por 5 min à 95°C, posteriormente 4,5 μL de cada amostra foi aplicada em gel de poliacrilamida 5%. A revelação foi realizada com nitrato de prata conforme o protocolo de Bassam et al. (1991). Os perfis eletroforéticos foram analisados e registrados quanto a presença e a ausência de bandas, ou seja, “1” para presença do alelo e “0” para ausência. Os parâmetros genéticos avaliados para cada locus foram: número de alelos por locus (N_a), heterozigosidade observada (H_o) e poder de discriminação (PD). Os parâmetros N_a e H_o foram calculados no software POPGENE Ver. 1.32 (YEH et al., 1997), e o parâmetro PD de acordo com a seguinte fórmula: $PD = 1 - \sum g_{ij}^2$. O dendograma foi gerado pelo software NTSYS-PC Ver. 2.1 (ROHLF, 2000) através da análise de agrupamento UPGMA a partir da matriz de similaridade genética gerada pelo coeficiente de Dice.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Treze loci foram avaliados neste estudo, sendo que todos se mostraram polimórficos (Tabela 1) e permitiram a identificação de 35 alelos, variando de 2 (BPPCT002, BPPCT24, BPPCT026, BPPCT30, UDP96019, UDP98025 e UDP98412) a 5 (UDP98414) com média de 2,7

alelos por locus. A heterozigosidade observada variou de 0,10 (BPPCT024) a 0,57 (UDP96018) e o poder de discriminação variou de 0,33 (BPPCT034) a 0,78 (UDP96003, UDP96013 e UDP96018).

A combinação dos resultados dos diferentes loci SSR avaliados foi capaz de distinguir os 21 acessos sob análise. A similaridade genética variou de 0,48 a 0,97 indicando existir variabilidade genética relativamente alta entre estes acessos de porta-enxertos coletados em diferentes pomares nos municípios de Morro Redondo e Pelotas, em relação aos genótipos Aldrighi e Capdeboscq, utilizados como padrão de comparação.

A análise de agrupamento permitiu distinguir os acessos em três grupos principais. O grupo I abrange o genótipo Capdeboscq e três acessos coletados nos dois municípios, o grupo II abrange dois acessos de Aldrighi, juntamente com outros sete acessos provenientes dos dois municípios. Os acessos do grupo III parecem ter maior contribuição genética de outras cultivares de pêssigo tipo indústria, cujos caroços foram utilizados para produção dos porta-enxertos. Os genótipos de Aldrighi e Capdeboscq foram utilizados por muito tempo como materiais de referência para obtenção de porta-enxertos, porém, no presente estudo, verificou-se que cerca de 44% dos acessos amostrados, possuem baixa similaridade com os referidos genótipos, comprovando a falta de identidade genética dos porta-enxertos obtidos à partir de caroços provenientes da indústria conserveira e a substituição dos dois genótipos antigos.

Tabela 1 - Parâmetros de variabilidade genética obtidos pela avaliação de 13 loci SSR em 21 acessos de porta-enxertos de pessegueiro.

Locus	Número de alelos por locus (Na)	heterozigosidade observada (Ho)	Poder de discriminação (PD)
BPPCT002	2	0,52	0,61
BPPCT024	2	0,10	0,33
BPPCT026	2	0,43	0,58
BPPCT030	2	0,19	0,54
UDP96003	3	0,52	0,78
UDP96008	3	0,43	0,62
UDP96013	3	0,43	0,78
UDP96018	3	0,57	0,78
UDP96019	2	0,33	0,50
UDP98025	2	0,14	0,39
UDP98407	3	0,43	0,71
UDP98412	2	0,19	0,58
UDP98414	5	0,29	0,72
Média	2,7	0,35	0,61

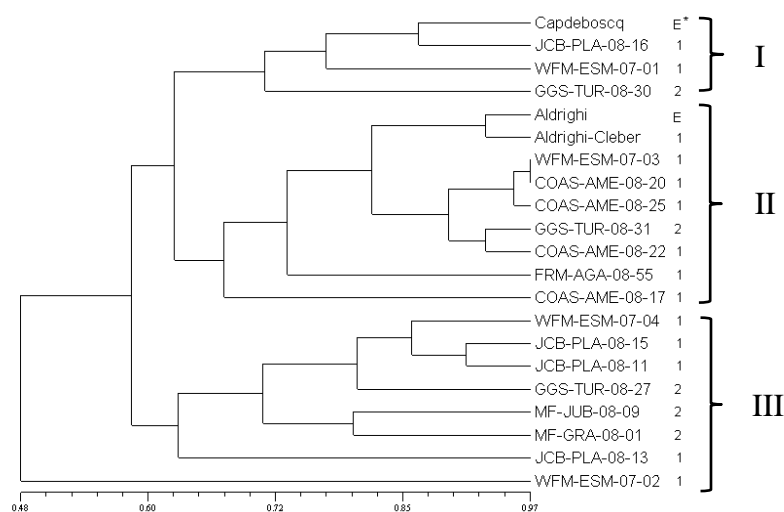


Figura 1 - Dendrograma obtido pelo método UPGMA a partir da similaridade calculada pelo coeficiente de DICE de 21 acessos pertencente ao banco de germoplasma de porta-enxerto de Prunus da EMBRAPA CPACT. (*) Município de coleta: 1- Pelotas, 2- Morro Redondo e E-EMBRAPA CPACT.

Os marcadores SSR tem sido empregados com eficiência na caracterização de diferentes espécies do gênero Prunus (BIANCHI et al., 2004a; BIANCHI et al., 2004b). Neste estudo a utilização desta classe de marcadores moleculares foi eficaz para diferenciação e na elucidação da relação genética dos 18 acessos avaliados, revelando que o material vegetal utilizado na produção de porta-enxertos de pessegueiro é bastante variável, podendo sim ser um dos fatores associados a heterogeneidade das plantas no pomar e à mortalidade de plantas.

CONCLUSÕES

Acessos de porta-enxerto de pessegueiro, selecionados e coletados em diferentes pomares comerciais dos municípios de Pelotas e Morro Redondo, apresentam variabilidade genética relativamente alta entre si e possuem baixa similaridade com Aldrighi e Capdeboscq.

A análise com marcadores microssatélites é eficiente para comprovar e estimar o nível de variabilidade existente entre genótipos de porta-enxertos de pessegueiro avaliados.

REFERÊNCIAS

- BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, Germany, v. 196, p. 80-83, 1991.
- BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; SANSAVINI, S. Microsatellite markers for identification of Prunus spp. rootstocks. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.61, n.3, p.303-306, 2004a.

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

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, EUA, v. 19, p. 11-15, 1987.

MAYER, N. A.; UENO, B.; ANTUNES, L. E. C. **Seleção e clonagem de porta-enxertos tolerantes à morte precoce do pessegueiro**. 2009. p.1-13. (Documento 209)

ROHLF, J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.1. New York: Exeter, 2000.

TOFANELLI, M. B. D.; CHALFUN, N.N.J.; HOFFMANN, A.; CHALFUN JÚNIOR, A. Uso do ácido indolbutírico na propagação de cultivares copa de ameixeira através de estacas lenhosas. **Científica Rural**, Bagé, v. 6, n. 1, p. 115-121, 2001.

YEH, F. C.; YOUNG, R. C.; TIMOTHY, B.; BOYLE, T. B. J.; YE Z. H.; ET AL. **Popgene, the user-friendly shareware for population genetic analysis**. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada, 1997.