

IDENTIFICAÇÃO DE ACESSOS DE PEREIRA POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES SSR

Fernanda Rech¹; Ivan Faoro²; Iraci Sinski³; Paulo Ricardo Dias de Oliveira³; Patrícia Ritschel³.

¹Embrapa Uva e Vinho/Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Rua Livramento, 515, CEP 95700-000, Bento Gonçalves, RS, fernandarec@gmail.com (apresentadora do trabalho); ²Epagri-EE Caçador, Bairro Bom Sucesso s/n, CEP 89500-000, Caçador, SC, eecd@epagri.rct-sc.br; ³Embrapa Uva e Vinho, Rua Livramento, 515, CEP 95700-000, Bento Gonçalves, RS, iraci@cnpuv.embrapa.br; paulo@cnpuv.embrapa.br; patricia@cnpuv.embrapa.br.

INTRODUÇÃO

Marcadores moleculares denominados SSR ou microssatélites (“Simple Sequence Repeats” – Sequências Simples Repetidas) amplificam regiões do genoma que contêm DNA repetitivo por meio do uso iniciadores (“primers”) específicos. Os microssatélites são freqüentemente multialélicos e segregam de modo co-dominante (MILACH, 1998). Estas características fazem destes marcadores uma excelente escolha para uso na solução de problemas de identificação e na estimativa de relações genéticas entre acessos mantidos em Bancos de Germoplasma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A EPAGRI-EE Caçador mantém um Banco Ativo de Germoplasma de Pêra contendo 200 acessos oriundos de diversas regiões. Em um estudo de uma amostra de 46 acessos de pêra, realizado com marcadores RAPD, foi confirmada a suspeita de identidade única dos acessos registrados com nomes diferentes, ‘William’s’ e ‘Bartlett’, os quais correspondem à variedade européia ‘Bon Cheretian Willians’. Desse modo, tais acessos representam uma mesma cultivar depositada no Banco de Germoplasma com nomes diferentes (RITSCHER et al., 2007). Ainda permanecem dúvidas sobre a identidade do acesso denominado ‘Japonesa’, mantido no Banco de Germoplasma de Pêra, já que avaliações agro-morfológicas sugerem que este acesso seja, na verdade, a cultivar Ya-li, de origem chinesa. Por outro lado, a Embrapa Uva e Vinho conserva *in vitro* algumas cultivares comercialmente importantes de pêra, entre elas, as cultivares William’s e Ya-lí. Durante o processo de propagação de cv. William’s houve a suspeita de troca de identificação, já que, após a aclimação, no início de desenvolvimento das plântulas, foram observadas características morfológicas semelhantes às da cv. Ya-lí.

Sessenta e uma seqüências de marcadores SSR desenvolvidos para espécies frutíferas como pêras, maçãs e pêssegos, e recuperados na literatura (YAMAMOTO et al., 2001, 2002a, b, c) foram testados para uso em pêra, resultando em 28 marcadores polimórficos (RECH et al., 2007). Estes marcadores tem sido usados rotineiramente na solução de questões de identificação genética de materiais como nos casos da cultivar Japonesa e as cultivares William's e Ya-li.

O objetivo deste trabalho é solucionar questões de identidade de um acessos mantidos no Banco de Germoplasma de Pêra, determinando a identidade correta de um acesso mantido *in vitro* e do acesso identificado como 'Japonesa', mantido a campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada a extração de DNA genômico de quatro plantas multiplicadas a partir do acesso de pereira mantido *in vitro* na Embrapa Uva e Vinho, sob suspeita de ter sido trocado durante o procedimentos de micropropagação. Para a extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo de DOYLE; DOYLE (1990) modificado.

Após a extração do DNA genômico, foi realizada uma reação de PCR com os marcadores SSR NH027a e RGL-1, aplicados às quatro amostras do acesso de pêra, juntamente com o material biológico de 'William's' e 'Ya-lí', coletados na Embrapa Uva e Vinho- Estação Experimental de Fruticultura Temperada (EEFT), em Vacaria

Para o trabalho de identificação da japonesa foi realizado extração de DNA genômico da cultivar e comparado com o material biológico de "Ya-lí", coletado na Embrapa Uva e Vinho-EEFT, em Vacaria-RS. Após a extração do DNA genômico, foram realizadas reações de PCR com os marcadores SSR NH021a, NH009 b, NB105 e NB109.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de poliacrilamida denaturante 5%, visualizado por coloração com prata. A comparação entre os acessos foi realizada através da comparação entre o tamanho dos fragmentos amplificados, por meio de análise visual.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado dos produtos de amplificação de PCR com o marcador RGL-1 pode ser visualizado na Figura 1A. Os acessos sob suspeita de troca de identidade são totalmente similares à cultivar William's, não se confirmando, portanto, esta suspeita. Os resultados obtidos com o marcador NH0027a foram similares.

Na Figura 1B, são mostrados os fragmentos obtidos com a amplificação do DNAs de Japonesa e cv. Ya-li com os marcadores SSR NH021a e NH009. As amostras se apresentaram diferentes confirmando que dois materiais mantidos pelo Banco de Germoplasma de Pêra, portanto, representam acessos geneticamente distintos. Este resultado foi confirmado com a utilização dos marcadores NB105 e NB109.

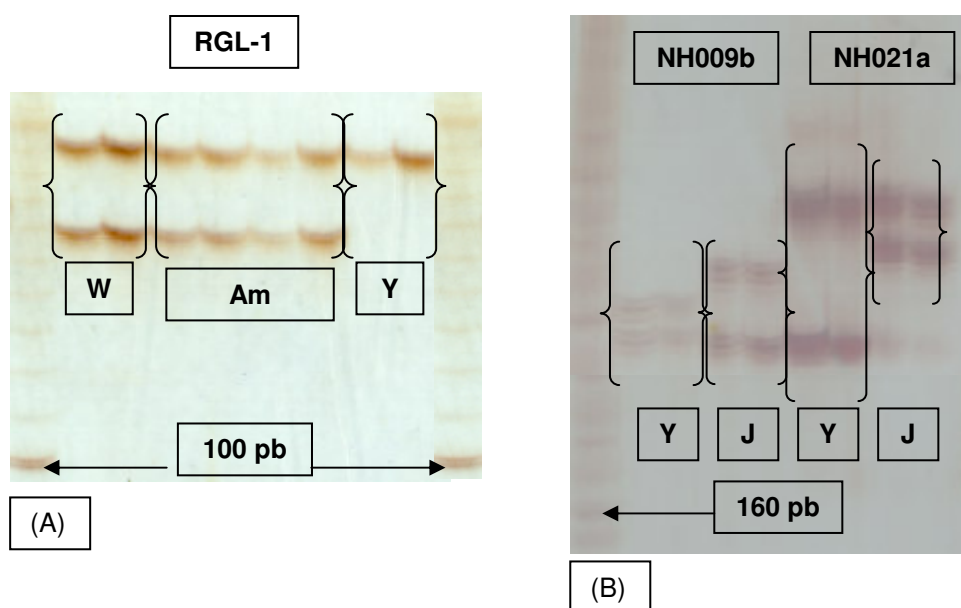


FIGURA 1 - (A) Gel de poliacrilamida denaturante com marcador RGL-1. Da esquerda para direita: pistas 1 e 2: 'William's' (W); pistas 3, 4, 5 e 6: Am: amostras suspeitas; e pistas 7 e 8: 'Ya-lí' (Y). (B) Gel de poliacrilamida denaturante com marcadores SSR NH021a e NH009b. Da esquerda para direita: Marcador SSR NH009b: pistas 2 e 3: 'Ya-lí' (Y); pistas 4, 5; 'Japonesa' (J); Marcador NH021a : pistas 6 e 7: 'Ya-lí' (Y) ; pistas 8 e 9: 'Japonesa' (J).

CONCLUSÕES

As amostras suspeitas de falsa identificação durante procedimentos de micropropagação confirmaram ser idênticos à cv. 'William's', a partir do qual foram propagadas. Não se confirmou, assim, a suspeita de corresponderem à cultivar Ya-li.

O acesso identificado como 'Japonesa' não corresponde à cultivar Ya-lí, constituindo acesso geneticamente diferente da mesma



O estudo mostra como os marcadores SSR constituem ferramentas úteis para identificação genética de acessos e cultivares de pêra e para a organização de coleções de germoplasma.

AGRADECIMENTOS

Embrapa Uva e Vinho, CNPq, Epagri, UERGS

REFERÊNCIAS

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA CENARGEN, p. 220, 1998.

MILACH, S. C. K. **Marcadores de DNA em plantas**. UFRGS, Porto Alegre, 141 p. 1998.

RECH, F.; RITSCHER, P. S.; REVERS, L. F.; OLIVEIRA, P. R. D. de; BERENHAUSER, G.; GABARDO, S. Análise genética de acessos do banco ativo de germoplasma de pêra com a utilização de marcadores moleculares SSR. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA UVA E VINHO, 5., ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO, 1., 2007, Bento Gonçalves. **Resumos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007. p. 21. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 63).

RITSCHER, P. S., REVERS, L. F., OLIVEIRA, P. R. de O., LEITE, G., FERREIRA, M. E. Genetic analysis of accessions in a Pear Germplasm Bank In: **10th International Pear Symposium Proceedings**, Peniche-Portugal, 2007.

YAMAMOTO, T.; KIMURA, T.; SAWAMURA, Y.; KOTOBUKI, K.; BAN, Y.; HAYASHI, T.; MATSUTA, N. SSRs isolated from Apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear, **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 865-870, 2001.



XX Congresso Brasileiro de Fruticultura
54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture
12 a 17 de Outubro de 2008 - Centro de Convenções – Vitória/ES

YAMAMOTO, T.; KIMURA, T.; SAWAMURA, Y.; MANABE, T.; KOTOBUKI, K.; HAYASHI, T.; BAN, Y.; MATSUTA, N. Simple Sequence repeats for genetic analysis in pear. **Euphytica**, v. 124, p. 129-137, 2002.

YAMAMOTO, T.; MOCHIDA, K.; IMAI, T.; HAJI, T.; YEAGAKI, H.; YAMAGUCHI, M.; KIMURA, T.; MATSUTA, N.; OGIWARA, I.; HAYASHI, T. Parentage Analysis in Japanese Peaches using SSR Markers. **Breeding Science**, v. 53, p. 35-4, 2003.

20080729_100533