

TRANSFERIBILIDADE E LIGAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM UMA POPULAÇÃO DE *Prunus persica* ('CAPDEBOSCQ' X 'FLORDAGUARD')

TRANSFERABILITY AND LINKAGE OF MOLECULAR MARKERS TO A *Prunus persica* POPULATION (CAPDEBOSCQ X FLORDAGUARD)

Luciane Arantes de Paula^{1*}; Valmor João Bianchi²; Luciana Rodrigues Nogueira³; Willian da Silva Barros⁴; José Carlos Fachinello⁵.

RESUMO

Objetivou-se verificar a transferabilidade e se a ligação entre marcadores moleculares, em uma população F_2 segregante ('Capdeboscq' x 'Flordaguard'), ocorre de forma similar ao obtido em outras populações de mapeamento para uso futuro na seleção de novos genótipos resistentes à *Meloidogyne* spp. Foi utilizada uma população segregante de 40 indivíduos F_2 . A genotipagem da população F_2 foi realizada com primers microssatélites da série UDP, BPPCT e para o loco STS. Nove marcadores moleculares e um marcador fenotípico foram avaliados quanto às frequências de recombinação e ligação na população F_2 . Os valores de segregação foram significativos apenas entre os marcadores UDP96-013, BPPCT-026, BPPCT-034 e o marcador fenotípico cor avermelhada das folhas (Gr), cobrindo uma distância de 27,58 cM. Os valores de recombinação variaram de 0,026, entre UDP96-013 e BPPCT-026, e 0,50 entre Gr e UDP96-013, e UDP96-013 e BPPCT-034. Verificou-se que os marcadores fortemente ligados foram UDP96-013 e BPPCT-026, a 2,6 cM. Com base no mapa de referência para *Prunus* spp. disponível na literatura, concluiu-se que os marcadores UDP96-013 e BPPCT-034 estão ligados de forma similar em diferentes populações de mapeamento, sendo potenciais candidatos para uso na seleção de novos genótipos resistentes à *Meloidogyne* spp.

Palavras-chave: Pessegueiro, mapeamento, microssatélites, melhoramento de plantas.

ABSTRACT

This study aimed at verified if the transferability and the linkage of molecular markers occurs in a similar way in an F_2 population (Capdeboscq x Flordaguard'), to that obtained in other mapping populations for future use in the selection of new

resistant genotypes for *Meloidogyne* spp. Used a segregating population of 40 F_2 individuals. Genotyping of the F_2 population was performed with microsatellite primers Series UDP, BPPCT and the STS site. Was estimated frequency of recombination and linkage analysis among markers. Nine molecular markers and one phenotypic marker were evaluated for the frequencies of recombination in the F_2 population. The values of segregation were significant only among UDP96-013, BPPCT-026, BPPCT-034 molecular markers and to the red leaves (Gr) phenotypic marker, covering a distance of 27,58 cM. Recombination values ranged from 0,026 between UDP96-013 and BPPCT 026, and between 0,50 and Gr UDP96-013, and UDP96-013 and BPPCT 034. It was found that the markers were strongly linked UDP96-013 and BPPCT-026, to 2,6 cM. Based on the molecular reference map for *Prunus* spp., available in the literature, it was concluded that UDP96-013 and BPPCT-034 markers are linked in a similar way in different mapping populations and are potential candidates for use in assisted selection of new resistant genotypes to *Meloidogyne* spp.

Key words: Peach, mapping, microsatellites, plant breeding.

O pessegueiro, *Prunus persica* (L.) Batsch, é uma espécie diplóide, nativa da China, com $2n=16$ e $n=8$ cromossomos, autógama, com índice de fecundação cruzada menor que 5%, ou seja, com predominância da autopolinização das flores (SCORZA et al., 1985). É uma frutífera de grande importância econômica no Rio Grande do Sul, onde tem maior destaque, pois o Estado possui aproximadamente 65% da área cultivada do país (JUNQUEIRA & PEETZ, 2003). Esse destaque se deve ao melhoramento genético de cultivares copa, que possibilitou ampliar o período de colheita e a qualidade das frutas. Porém, a produtividade no Estado ainda é baixa devido à incidência de pragas e doenças e a falta

^{1*} Parte da Tese de Doutorado. Eng^a. Agr^a. Dra. Depto de Fitotecnia, UFPel, C.P. 354, CEP 96010-900 Pelotas, RS. E-mail: lucianedepaula@yahoo.com.br

² Prof. Adjunto Depto. Botânica, IB-UFPel, Pelotas-RS, 96010-900. Email: valmorjb@yahoo.com

³ Mestre em Fisiologia Vegetal – UFPel. Email: luciana.r.nogueira@gmail.com

⁴ Professor Adjunto do Departamento de Matemática e Estatística/UFPel. Email: willian.barros@ufpel.tche.br

⁵ Prof. Titular Depto. Fitotecnia, FAEM-UFPel. Email: jfachi@ufpel.edu.br

(Recebido para publicação em 13/10/2010, Aprovado em 05/12/2011)

de porta-enxertos adequados para a cultura (CAMPOS, 2005).

Ao contrário de outros países, no Brasil o melhoramento genético de porta-enxertos para frutíferas de caroço tem assumido importância apenas há poucos anos, tendo a produção de mudas ainda baseada na enxertia sobre seedlings obtidos de caroços provenientes da indústria conserveira, não havendo controle de correspondência varietal. No que concerne ao melhoramento, em 1998, a Universidade Federal de Pelotas iniciou um trabalho de introdução e avaliação de novos porta-enxertos de *Prunus* spp., além da hibridação controlada, visando a obtenção de genótipos menos vigorosos, adaptados às condições climáticas locais e resistentes a *Meloidogyne* spp. (BIANCHI et al., 2003).

Para auxiliar os melhoristas a manter e explorar de forma eficiente o pool de genes disponíveis dentro do gênero *Prunus*, bem como acelerar os trabalhos de melhoramento, a tecnologia de marcadores moleculares tem sido amplamente utilizada na realização de importantes estudos de caracterização molecular (BIANCHI et al., 2004; CHENG & HUANG, 2009), construção de mapas genéticos (DIRLEWANGER et al., 2004) e físicos (CLAVERIE et al., 2004), para auxiliar e facilitar a introgressão de genes de interesse agrônomo mediante a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) (CLAVERIE et al., 2004; DIRLEWANGER et al., 2004).

Diversos marcadores moleculares vem sendo utilizados em trabalhos de melhoramento genético de plantas, permitindo análises completas e consistentes de sua base genética, bem como o mapeamento de características de interesse agrônomo (OLIVEIRA et al., 2001). Os marcadores de microssatélites (SSR) tem sido os mais empregados para tais objetivos, pois representam regiões de DNA de seqüência repetida em número variável, amplamente distribuídos pelo genoma, permitindo a construção de mapas genéticos bastante consistentes entre diferentes espécies de *Prunus* spp., além de inferências sobre a estrutura e sintonia entre genomas e o mapeamento de genes ou loci ligados a características quantitativas (QTLs). Sendo assim, uma forma para facilitar a elaboração de mapas moleculares para uma determinada espécie é pelo uso de informações já disponíveis, a exemplo do mapa de referência para *Prunus* spp., selecionando-se um subconjunto de marcadores que segregam na população de plantas sob análise, cobrindo total ou parcialmente o genoma (DIRLEWANGER et al., 2004). Essa estratégia permite verificar a transferabilidade de marcadores moleculares bem como a comparação com o mapa de referência para espécies em estudo ou relacionadas, facilitando a identificação de genes ou QTLs mapeados em cada população avaliada e sua respectiva localização no genoma.

Considerando que a resistência a *Meloidogyne* spp. em *Prunus* não é completa, para um grande

número de genótipos, é possível utilizar os marcadores moleculares localizados próximos aos genes de resistência, identificados no mapa de referência de *Prunus*, para avaliar a transferabilidade de marcadores, afim de auxiliar na seleção assistida.

Neste trabalho, buscou-se avaliar a transferabilidade de marcadores SSR e STS (Sequence Tagged Site), posicionados principalmente no grupo de ligação (GL) dois do mapa de referência de *Prunus*, em uma população F₂ ('Capdeboscq' x 'Flordaguard'), para verificar se a ligação entre marcadores moleculares ocorre de forma similar ao obtido em outras populações de mapeamento.

Avaliou-se uma população segregante de 40 indivíduos F₂ obtida por autofecundação a partir de um híbrido F₁ do cruzamento entre 'Capdeboscq' x 'Flordaguard' (susceptível a *Meloidogyne* spp. e folhas verdes x resistente a *Meloidogyne* spp. e folhas avermelhadas, respectivamente). A fenotipagem para coloração das folhas foi realizada nos seedlings seis meses após a semeadura.

O DNA foi extraído dos indivíduos parentais, F₁ e F₂, a partir do método descrito por DOYLE & DOYLE (1991). A genotipagem da população F₂ foi realizada com *primers* para dezoito locos microssatélites, sendo da série UDP (96-001, 96-003, 96-005, 96-008, 96-013, 96-019, 98-407, 98-409, 98-412 e 98-414 - CIPRIANI et al., 1999), e da série BPPCT (001, 002, 016, 023, 026, 034 e 041 -DIRLEWANGER et al., 2002) e para o loco STS-OPAP4 (YAMAMOTO & HAYASHI, 2002).

Nas reações de PCR foram utilizados 25. ng de DNA genômico; 2,5 µl de 10x PCR buffer; 1,7 mM de MgCl₂; 0,5 µM de cada *primer*; 0,2 µM de dNTP; 0,8U de Taq polimerase (kit Invitrogen) e água Milli-Q para o volume final de 25 µl. As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador, da marca BIO-RAD modelo ICYCLER, com 2 ciclos - 94°C/2 min, 55°C/1 min, 72°C/50s, 35 ciclos - 94°C/50s, 57-60°C/45s, 72°C/45s, 1 ciclo - 72°C/15 min. Uma alíquota de 4,5 µL de cada amostra amplificada foi aplicada em gel de poliacrilamida 6%, tampão TBE 1X a 65 volts, por três horas. Para a visualização das bandas utilizou-se a coloração com nitrato de prata, conforme descrito por BASSAM et al. (1991).

Utilizou-se o software GQMOL (CRUZ, 2009) para estimar as frequências de recombinação, e a análise de ligação entre marcadores. Para converter as unidades de recombinação em distâncias genéticas utilizou-se a função Kosambi, com um LOD score mínimo de três.

Um total de 18 locos SSR e STS foram avaliados, deste total, nove deles mais o marcador fenotípico, segregaram e foram avaliados quanto às frequências de recombinação. Pela análise do qui-quadrado (χ^2) os valores de segregação foram significativos apenas entre os marcadores UDP96-013, BPPCT-026,

BPPCT-034 e a cor avermelhada das folhas (Gr) (Tabela 1).

Os quatro marcadores acima indicados foram agrupados cobrindo uma distância de 27,58 cM (Figura 1). Os valores de recombinação variaram de 0,026 entre UDP96-013 e BPPCT-026, de 0,50 entre Gr e UDP96-013 e entre UDP96-013 e BPPCT-034, e 0,056

entre BPPCT-034 e BPPCT-026 (Tabela 1). Os marcadores fortemente ligados foram UDP96-013 e BPPCT-026, a 2,6 cM (Figura 1), entretanto, no mapa de ligação para o porta-enxerto GxN22 (DIRLEWANGER et al., 2004), esses dois marcadores foram localizados em grupos de ligação (GL) diferentes, dois e cinco, respectivamente.

Tabela 1. Segregação de marcadores em uma população F₂ de *Prunus persica* L. Batsch ('Capdeboscq' x 'Flordaguard'). FAEM/UFPEL. Pelotas-RS, 2009.

Marcador	Genótipo dos pais		Fenótipo F ₁	Segregação em F ₂ Gr:gr	Valor χ^2	VR** com Gr*	VR** com UDP96-13	VR** com BPPCT-26
	Flordaguard	Capdeboscq						
Gr*	Gr	gr	Gr	32:8	7,20	-	-	-
UDP96-13	AA	AB	AA	36:4	15,21	0,50	-	-
BPPCT-26	BC	AC	CC	3:1:36	15,70	0,256	0,026	-
BPPCT-34	AB	BB	AB	4:36	18,00	0,194	0,50	0,056

* Gr = Fenótipo cor avermelhada das folhas. ** VR = Valor de Recombinação

Estudando a resistência ao nematóide das galhas em porta-enxertos de *Prunus* spp. ESMENJAUD et al. (2009) utilizaram oito populações segregantes, sendo sete delas com número reduzido de indivíduos variando entre 6 e 25, verificando que em uma progênie de 23 indivíduos F₂ de GxN22 apresentou uma relação de 17(74%) resistentes (R) para 6(26%) suscetíveis (S), ou seja, uma relação muito próximo a 3(R):1(S), conforme esperado. LU et al (1999) utilizando duas progênies (com 55 e 100 indivíduos) derivadas de cruzamentos controlados entre os porta-enxertos Lovel e Nemared, verificaram uma segregação próxima de 1:2:1, em ambas populações, permitindo o desenvolvimento e a caracterização de marcadores codominantes ligados a resistência ao nematóides das galhas.

Baseado nos resultados obtidos por esses autores se verifica que, em *Prunus*, o uso de populações de mapeamento com número reduzido de indivíduos não é crítico para obter uma boa estimativa da ligação entre marcadores, no estudo da resistência a *Meloidogyne* spp.. Sendo assim, as divergências de segregação observadas no presente trabalho, podem ser atribuídas as características dos parentais e a possíveis translocações genômicas, conforme verificado por DIRLEWANGER et al (2004) no mapa de ligação de GxN22, mais do que por influência do tamanho da população.

Neste trabalho, esperava-se por uma ligação mais estreita entre UDP96-013 e BPPCT-034, ambos localizados no GL2 de GxN22 (DIRLEWANGER et al., 2004), onde este último marcador foi mapeado a aproximadamente 45 cM do gene R_{MiaNem}, que confere resistência a *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* no porta-enxerto 'Nemared', porém estando a uma distância de 9,8 cM de UDP96-013. A distância entre esses dois marcadores, no mapa de ligação de

GxN22, foi superior ao encontrado neste trabalho (8,19 cM). O marcador fenotípico 'Gr' foi mapeado a 19,39 cM do loco BPPCT-034, entretanto no mapa de GxN22 esses dois marcadores ficaram em GL diferentes, sendo 'Gr' localizado no GL6 no mapa de referência de *Prunus* (DIRLEWANGER et al., 2004). Considerando a distância do marcador fenotípico em relação aos demais marcadores, possivelmente, na medida em que um maior número de marcadores forem avaliados, o caracter será posicionado em outro grupo de ligação. O mesmo efeito pode ser observado para o marcador BPPCT-026 que ficou posicionado no mesmo grupo de ligação dos demais marcadores estudados neste trabalho, porém em trabalho realizado por DIRLEWANGER et al., (2004), esse marcador não ficou agrupado com UDP 96-013 e BPPCT-034, ficando em GL diferentes.

Com relação às características dos parentais utilizados, 'Flordaguard' é um porta-enxerto que vem sendo testado no Brasil devido a sua resistência a *Meloidogyne* spp., herdada de 'Okinawa'. Por outro lado, a cultivar 'Capdeboscq' tem sido utilizada como porta-enxerto, devido a sua adaptação ao clima do Rio Grande do Sul, a boa porcentagem de geminação das sementes e vigor das plantas, porém é suscetível a *Meloidogyne* spp. Comparativamente, 'GxN22' tem como ancestral a cv. 'Nemaguard', que junto com 'Okinawa' são as duas 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 que justifica essa diferença de associação de marcadores observado neste trabalho. Além disso, as diferenças podem ter sido geradas por eventos de translocações recíprocas no genoma, conforme verificado nos GL6 e GL8 de GxN22 (DIRLEWANGER et al., 2004).

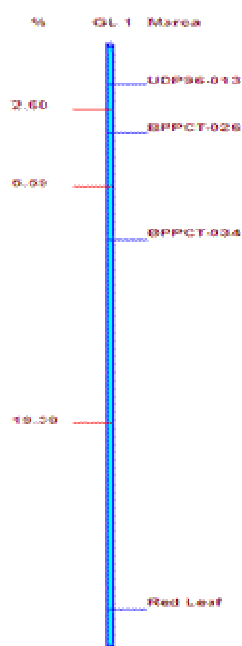


FIGURA 1. Ligação entre três marcadores de microssatélites e o caractere cor vermelha da folha, de uma população F_2 segregante ('Capdeboscq' x 'Flordaguard'). Valor máximo de recombinação 30% e valor mínimo do LOD 3. FAEM/UFPel. Pelotas-RS, 2009.

O nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.) é uma das principais pragas que afeta a cultura do pessegueiro e causam sérios prejuízos às plantas (CARNEIRO et al. 1993). A forma mais eficaz para contornar tal problema é o uso de porta-enxertos resistentes, sendo o motivo pelo qual deu-se início aos trabalhos de obtenção de novos porta-enxertos via cruzamentos controlados, buscando resistência a nematóides, baixo vigor e melhor adaptação as condições do clima local (BIANCHI et al. 2002). Estes novos híbridos encontram-se em fase de avaliação, que incluía fenotipagem para identificação de genótipos resistentes a *Meloidogyne* spp. (PAULA et al., 2011) e testes com novos locos de microssatélites para dar continuidade a esse trabalho, para saturação desse mapa, visando o mapeamento para resistência a *Meloidogyne* spp. e à utilização dessas informações para a seleção assistida em auxílio nos programas de melhoramento genético de porta-enxerto de pessegueiro.

Os dados gerados no presente trabalho representam o passo inicial para a identificação de marcadores úteis para auxiliar no desenvolvimento de novos porta-enxertos de *Prunus* com características agrônomicas desejadas. Foi possível comprovar que os dados moleculares disponíveis no mapa de referência para *Prunus* spp. podem ser eficientemente explorados para avaliar outras populações de mapeamento. Com os resultados obtidos, concluiu-se que os marcadores UDP96-013 e BPPCT-034 estão ligados de forma similar em diferentes populações de mapeamento, sendo

potenciais candidatos para uso na seleção de novos genótipos resistentes à *Meloidogyne* spp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BIANCHI, V.J.; MENEZES, G.G.; FACHINELLO, J.C. Obtenção de novos porta-enxertos para pessegueiro resistentes a nematóides: fase de implementação do projeto. In: Congresso de Iniciação Científica, 12, Encontro da Pós-Graduação, 6, 2003, Pelotas, **Anais ...**, 2003. p.313.

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

BIANCHI, V.J.; VENTURI, S.; FACHINELLO, J.C.; TARTARINI, S.; SANSVINI, S. I marcatori AFLP e SSR, rivolutivi nella identificazione genetica delle varietà di susino. **Frutticoltura**, Bologna, n.4, p.83-87, 2002.

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.

CARNEIRO, R.M.D.G.; FORTES, J.; ALMEIDA, M.R.A.A. Associação de *Criconebella xenoplax* com a morte precoce do pessegueiro no Rio Grande do Sul. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 122-131, 1993.

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

CIPRIANI, G., LOT, G.; HUANG, W.G.; MARRAZZO, M.T.; et al. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): Isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.99, p.65–72, 1999.

CLAVERIE, M.; BOSSELUT, N.; LECOULS, A.C.; et al. Location of independent root-knot nematode resistance genes in plum and peach. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.108, p.765-773, 2004.

CRUZ, C.D. Programa para análises de dados moleculares e quantitativos - *GQMOL*. (2009) Viçosa: UFV. Disponível em "<http://www.ufv.br/dbg/genes/gdown.htm>". Acesso: maio/2009.

DIRLEWANGER, E.; COSSON, P.; HOWAD, W.; et al. Microsatellite genetic linkage maps of myrobalan plum and an almond-peach hybrid – location of root-knot nematode resistance genes. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.109, p.827-838, 2004.

DIRLEWANGER, E.; COSSON, P.; TAVAUD, M.; et al. 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**, Heidelberg, v.105, p.127-138, 2002.

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

ESMENJAUD, D.; VOISIN, R.; VAN GHELDER, C.; et al. 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**, Heidelberg, v.5 p. 279-289, 2009.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S. Aspectos relevantes dos mercados interno e externo. In: **Pêssego. Produção**. RASEIRA, M.C.B.; QUEZADA, A.C., ed., CPACT. Brasília: Serviço de Produção de Informações. 162p. (Frutas do Brasil, 49), 2003.

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

OLIVEIRA, R.P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Marcadores RAPD para mapeamento genético e seleção de híbridos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 477-481, 2001.

PAULA, L.A. de; BIANCHI, V.J.; GOMES, C.B.; FACHINELLO, J.C. Reação de porta-enxertos de pessegueiro à *Meloidogyne incognita*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 680-684, 2011.

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.

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