

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Tese

**FENOTIPAGEM DE PORTA-ENXERTOS DE PESSEGUEIROS PARA
REAÇÃO À *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood
(1949) E ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA COM
MARCADORES DE MICROSSATÉLITES**

Luciane Arantes de Paula

Pelotas, 2009

LUCIANE ARANTES DE PAULA

**FENOTIPAGEM DE PORTA-ENXERTOS DE PESSEGUEIROS PARA
REAÇÃO À *Meloidogyne incognita* (Kofoed e White) Chitwood
(1949) E ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA COM
MARCADORES DE MICROSSATÉLITES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Fruticultura de Clima Temperado).

Orientador: Prof. Dr. Valmor João Bianchi

Co-Orientador: Prof. Dr. José Carlos Fachinello

Pelotas, 2009

Dados de catalogação na fonte:
(*Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744*)

P324f Paula, Luciane Arantes de

Fenotipagem de porta-enxertos de pessegueiros para reação à Meloidogyne incognita (Kofoid e White) Chitwood (1949) e estudo da variabilidade genética com marcadores de microssatélites / Luciane Arantes de Paula. -Pelotas, 2009.

75f. : il.

Tese (Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Fruticultura de Clima Temperado. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2009, Valmor João Bianchi, Orientador; co-orientador José Carlos Fachinello.

1. Prunus persica 2.Porta-enxertos 3.Melhoramento genético 4.Caracterização molecular 5. Meloidogyne incognita. I. Bianchi, Valmor João (orientador) II .Título.

CDD 634.25

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Valmor João Bianchi
(Departamento de Botânica/IB – UFPel)
(Orientador/Presidente da Banca Examinadora)

Profa. Dra. Beatriz Helena Gomes Rocha
(Departamento de Zoologia e Genética – UFPel)

Dr. César Bauer Gomes
(Pesquisador – Embrapa Clima Temperado)

Profa. Dra. Andréa De Rossi Rufato
(Departamento de Fitotecnia/FAEM – UFPel)

Dr. Flávio Martins Santana
(Pesquisador - Embrapa Trigo)

DEDICO

Aos meus pais,

Aparecido Antonio de Paula

Marly Arantes de Paula

Pilares da minha existência, fonte inesgotável de amor e paz...

A minha irmã,

Heloisa Arantes de Paula

“A grande virtude do pesquisador é a sabedoria
pela sede do saber cada vez mais e ter humildade
de se aprender a cada dia”

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por iluminar minha vida, por mais esta oportunidade e por estar sempre presente, guiando meus passos, me dando forças para enfrentar os desafios e dificuldades que encontrei ao longo desse período.

Aos meus pais, pelo apoio nas horas boas e difíceis durante essa etapa, pelo amor, dedicação, compreensão e pelo incentivo constante, mesmo estando longe, sempre se fizeram presentes.

Ao professor e orientador Dr. Valmor João Bianchi pela amizade, pelos valiosos ensinamentos, pela paciência e orientação que me deram suporte para a realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Ao Dr. Cesar Bauer Gomes (EMBRAPA CLIMA TEMPERADO) pelo auxílio e colaboração nas avaliações referente ao trabalho com nematóides.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, especialmente à Área de Fruticultura de Clima Temperado e a todos os docentes desta Instituição que trouxeram um pouco de si para dentro das salas de aula e nos proporcionaram momentos que jamais serão esquecidos.

Aos professores e amigos Dr. Luiz de Souza Corrêa e Dra. Aparecida Conceição Boliani (UNESP - Campus de Ilha Solteira-SP) pela amizade, apoio e incentivo que me deram durante esse três anos.

Aos queridos amigos de laboratório: Monalize Salete Mota, Luciana Nogueira, Alexandre Zanardo, Juliana Bandeira, Aline Radtke, Renan Goulart, Liane Thurow, Daiane Benemann, Letícia Barbosa, Márcia Ribeiro, Letícia Benitez, Maristela Rey, pelo apoio, ajuda, amizade e pela agradável convivência.

Aos queridos amigos da pós-graduação: Lorena Donini, Ana Paula Schünemann, Juliana Bertolino, Tiago Telesca, Poliana Francescato, Luciano Picolotto, Gisely Correa, Mateus Pasa, Lúcia Somavilla, Clevison Giacobbo, Casiane Tibola, Juçara Ferri, Doralice Fischer, Elizete Radmann, Joseane Hipólito, Geórgia Figueiredo, pela ajuda, pelo companheirismo, amizade e agradáveis momentos de convivência durante o curso.

A banca examinadora Profa. Dra. Andréa De Rossi Rufato, Profa. Dra. Beatriz Helena Gomes Rocha, Dr. César Bauer Gomes e Dr. Flávio Martins Santana pelas sugestões e correções para melhoria do trabalho.

Em especial, quero agradecer muito aos queridos e estimados amigos: Mariana e Andrei Centenaro, Bianca Corrêa, Mery Peres, Lorena Donini, Ana Paula Schünemann e Juliana Bertolino pelo apoio, amizade e suporte que me deram nesses dois últimos meses onde enfrentei muitas dificuldades....graças ao carinho de vocês consegui superar e finalizar este trabalho!!!!

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!!!!!!

Resumo

Paula, Luciane Arantes. **Fenotipagem de porta-enxertos de pessegueiros para reação à *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood (1949) e estudo da variabilidade genética com marcadores de microssatélites**, 2009. 73f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O Rio Grande do Sul (RS) é o principal produtor de frutas de caroço do Brasil, com aproximadamente 65% da área cultivada com pêssego do país. Esse destaque se deve a contribuição dos programas de melhoramento genético de novas cultivares copa, que possibilitou ampliar o período de colheita e a qualidade das frutas. Mesmo assim, a produtividade média no RS ainda é considerada baixa, principalmente devido à falta de conhecimento sobre fatores relacionados à incidência de pragas, doenças e a falta de porta-enxertos adequados para a cultura, pois ao contrário de outros países, no Brasil o melhoramento genético de porta-enxertos para frutíferas de caroço tem assumido importância apenas há poucos anos. Esta tese está dividida em três capítulos, sendo que o capítulo 1 teve como objetivo avaliar a reação de cinco porta-enxertos de pessegueiro à *Meloidogyne incognita*, em condições de casa-de-vegetação. Pode-se concluir que ‘Seleção UFPel-0402’, ‘Okinawa’, ‘Flordaguard’, ‘Nagano Wild’ e ‘Seleção NR-0080407’ são imunes a *Meloidogyne incognita*, podendo ser utilizados em programas de melhoramento genético de porta-enxertos de pessegueiro e também como alternativa de uso para implantação de pomares em áreas com ocorrência da praga. A resistência do ‘Nagano Wild’ necessita de estudos complementares para identificar, de forma mais clara, a amplitude dessa característica. No capítulo 2 objetivou-se avaliar a variabilidade genética e diferenciar 14 porta-enxertos de pessegueiro, estabelecendo-se um padrão molecular de caracterização para cada genótipo, baseado em locos de SSR, SCAR e STS, para futuros trabalhos de melhoramento genético. Neste estudo concluindo-se que marcadores de microssatélites permitem estabelecer com relativa facilidade um padrão molecular de genótipos de porta-enxertos de pessegueiro e resolver problema de homonímia, a exemplo dos genótipos de Okinawa avaliados, bem como seu uso permite verificar quais genótipos são mais contrastantes para uso em melhoramento genético. O capítulo 3 teve como objetivo estimar frequências de recombinação, entre marcadores moleculares e o caractere cor de folha, a partir da análise de uma população F_2 segregante (‘Capdeboscq’ x ‘Flordaguard’), e também verificar se a ligação ocorre de forma similar ao obtido em outras populações de mapeamento. Foram avaliados nove locos de microssatélites, sendo possível verificar, com base nos dados do presente trabalho e em mapas moleculares para *Prunus* spp. disponíveis na literatura, que os marcadores UDP96-013 e BPPCT-034 estão ligados em diferentes populações de mapeamento, sendo potenciais candidatos para uso na seleção de novos genótipos resistentes à *M. incognita*.

Palavras-chave: *Prunus persica*, porta-enxertos, melhoramento genético, caracterização molecular, *Meloidogyne incognita*.

Abstract

Paula, Luciane Arantes. **Phenotyping of rootstock of peach for reaction to *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood (1949) and study of the genetic variability of with microsatellites marker**, 2009. 73f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The Rio Grande do Sul state (RS) represents great importance in the stone fruit, with approximately 65% of the area cultivated with peach country. This should highlight the contribution of the breeding of new cultivars crown, which extend the period allowed for collection and quality of fruit. Still, the average productivity in the RS is still considered low, mainly due to lack of knowledge about factors related to incidence of pests, diseases and lack of root stock suitable for cultivation, because unlike other countries, the improvement in Brazil genetic of the rootstocks for stone fruit of importance has taken only a few years ago. This thesis is divided into three chapters, with chapter 1 was to evaluate the reaction of five peach rootstocks, from front to inoculation with *Meloidogyne incognita*, in a home-de-vegetation. And we can conclude that 'Selection UFPel-0402', 'Okinawa', 'Flordaguard', 'Nagano Wild' and 'Select NR-0080407' are immune to *Meloidogyne incognita*, and may be used in genetic improvement programs for the rootstocks of peach and as alternative use for the deployment of orchards in areas with occurrence of the pest, and the strength of the 'Nagano Wild' needs further studies to identify more clearly this characteristic. Chapter 2 objective evaluated the genetic variability and differentiation of 14 rootstocks, peach, setting a standard for molecular characterization of each genotype, based on loci of SSR, SCAR and STS, for future work on genetic improvement and it is concluded that markers of microsatellites can be relatively easily a pattern of molecular genotypes of the rootstocks of peach and solve problem of homonymy, the example of the evaluated genotypes of Okinawa, and shows which are more contrasting genotypes for use in breeding. Chapter 3 objective to estimate frequencies of recombination among molecular markers, and the color of leaf, from the analysis of a F₂ segregating population ('Capdeboscq' x 'Flordaguard'), and check if the connection is similar to that obtained in other mapping populations. It can be concluded that based on molecular maps for *Prunus* spp. available in the literature and from results obtained in this work, it was concluded that the markers UDP96-013 and BPPCT-034 are linked in different mapping populations, and potential candidates for use in the selection of new resistant genotypes to *Meloidogyne* spp.

Keywords: *Prunus persica* Batsch., rootstocks, plant breeding, molecular characterization, *Meloidogyne incognita*.

LISTA DE FIGURAS

	Página
 Capítulo 1	
Figura 1. Raízes dos porta-enxertos: (A) 'Seleção UFPel-0402'; (B) 'Okinawa'; (C) 'Nagano Wild'; (D) 'Flordaguard'; (E) 'Seleção NR-0080407' e (F) do tomateiro cv. Santa Cruz (testemunha). Nas figuras C e F podem ser observadas a formação de galhas induzidas por <i>Meloidogyne incognita</i> . FAEM/UFPel. Pelotas-RS, 2009.....	24
 Capítulo 2	
Figura 1. Produtos da amplificação gerados pelos marcadores microssatélites UDP-98407 (A) e BPPCT 041 (B) nas cultivares: 1-Nemaguard, 2-Nemared, 3-Flordaguard, 4-Okinawa, 5-UFPel-0402, 6-Tsukuba, 7-Kutoh, 8-Ohatsumomo, 9-Nagano Wild, 10-Capdeboscq, 11-Aldrichi, 12-Rubira, 13-Montclar e 14-Seleção 0390302. FAEM/UFPel Pelotas, RS, 2009.	35
Figura 2. Dendograma de similaridade baseado em locos de microssatélites de porta-enxertos de pessegueiro. Método de agrupamento UPGMA. FAEM/UFPel. Pelotas-RS, 2009	36
Figura 3. Projeção de distâncias entre os porta-enxertos: 1-Nemaguard, 2-Nemared, 3-Flordaguard, 4-Okinawa, 5-UFPel-0402, 6-Tsukuba, 7-Kutoh, 8-Ohatsumomo, 9-Nagano Wild, 10-Capdeboscq, 11-Aldrichi, 12-Rubira, 13-Montclar, 14-Seleção 0390302. FAEM/UFPel Pelotas-RS, 2009	38
 Capítulo 3	
Figura 1. Representação da ligação entre três (A) e quatro (B) marcadores de microssatélites e o caractere cor vermelha da folha, obtido de uma população F ₂ segregante ('Capdeboscq' x 'Flordaguard'). Valor máximo de recombinação 30% e valor mínimo do LOD 3 (A) e LOD 1 (B). FAEM/UFPel Pelotas-RS, 2009	52

LISTA DE TABELAS

	Página
Capítulo 1	
Tabela 1. Resposta de porta-enxertos de pessegueiro a inoculação com uma população de 10.000 ovos e juvenis de <i>Meloidogyne incognita</i> , aos 6 meses após a inoculação e de tomateiro cv. Santa Cruz, após três meses da inoculação. FAEM/UFPel. Pelotas-RS, 2009.....	22
Capítulo 2	
Tabela 1. Porta-enxertos de <i>Prunus</i> spp. presentes no Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Pelotas, analisados com marcadores de microssatélites. FAEM/UFPel Pelotas-RS, 2009.....	30
Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos (Primers) e respectivas temperaturas de anelamento (T°A) de primers para locos de Microssatélites, STS e Scar. FAEM/UFPel. Pelotas-RS, 2009 ...	32
Tabela 3. Frequências alélicas, heterozigosidade (H), conteúdo de informação polimórfica (PIC), número de alelos e frequência máxima do alelo (Fmax) de 18 locos avaliados em 14 porta-enxertos de pessegueiro. FAEM/UFPel. Pelotas-RS, 2009	41
Capítulo 3	
Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos (Primers) e respectivas temperaturas de anelamento (T°A) de <i>primers</i> para locos de Microssatélites e STS. FAEM/UFPel. Pelotas-RS, 2009	49
Tabela 2. Dados da análise de segregação de marcadores microssatélites e cor da folha obtidos a partir de uma população F ₂ de <i>Prunus persica</i> L. Batsch ('Capdeboscq' x 'Flordaguard'). FAEM/UFPel. Pelotas-RS, 2009	51

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO GERAL.....	12
 CAPÍTULO 1	17
Introdução	18
Material e Métodos	20
Resultados e Discussão	22
Conclusão	26
 CAPÍTULO 2	27
Introdução	28
Material e Métodos	30
Resultados e Discussão	34
Conclusão.....	43
 CAPÍTULO 3	44
Introdução.....	45
Material e Métodos.....	47
Resultados e Discussão.....	50
Conclusão.....	55
 Considerações finais.....	56
 Referências.....	57
 Apêndice.....	69
 Anexos.....	71

INTRODUÇÃO GERAL

O pessegueiro é uma frutífera nativa da China, pertencente à família *Rosaceae*, cujas cultivares comerciais são da espécie *Prunus persica* (L.) Batsch (SIMÃO, 1998). No Brasil seu cultivo ocorre nos estados Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais e, principalmente, no Rio Grande do Sul, onde a cultura tem grande importância. A região Sul do país teve uma produção de 219.045,84 toneladas no ano de 2006, sendo 160.826,92 toneladas produzidas no Rio Grande do Sul, em 18.742 hectares de área colhida (AGRIANUAL, 2008). É possível encontrar pomares de pessegueiro em todas as regiões do Rio Grande do Sul, mas a produção comercial está concentrada em três pólos, entre eles o da Metade Sul (Pelotas e região), Grande Porto Alegre e Serra Gaúcha (SIDRA, 2008).

Embora a cultura apresente grande importância para o estado do Rio Grande do Sul, a produtividade média no estado ainda é considerada baixa devido à falta de conhecimento sobre alguns fatores, tais como: práticas de manejo, incidência de pragas e doenças e a falta de porta-enxertos adaptados as diversas condições edafoclimáticas das diferentes regiões de produção (CAMPOS, 2005).

Dentro desse contexto, a qualidade da muda é, sem dúvida, um dos principais fatores a ser observado na implantação de um pomar. Para Mayer et al. (2005a), na avaliação da qualidade das mudas de pessegueiro alguns aspectos como a identificação do porta-enxerto e da cultivar-copa, compatibilidade de enxertia comprovada, resistência ou tolerância do porta-enxerto às principais espécies de fitonematóides, quantidade e distribuição adequadas de raízes.

No Sul do Brasil, os porta-enxertos para pessegueiro são produzidos a partir de caroços de diversas cultivares-copa de maturação tardia obtidas nas indústrias conserveiras, sendo material sensível a fitonematóides. Os porta-enxertos assim obtidos apresentam grande variabilidade genética e sua identidade é desconhecida.

As conseqüências desta prática são notáveis nos pomares, como a desuniformidade das plantas, diferenças na reação aos fitonematóides e outras doenças e pragas de solo, além da relação com a doença conhecida por "morte precoce dos pessegueiros" (FACHINELLO et al., 2005).

O uso de porta-enxertos suscetíveis a nematóides, em áreas com a presença dessa praga, tem se constituído num problema importante a ser solucionado em virtude de sérios prejuízos causados às plantas e, indiretamente, ao produtor, pela redução dos lucros. Gomes e Campos (2003) relataram a presença de mais de 30 espécies de nematóides fitoparasitas em plantas de pessegueiro, destacando como mais importantes o *Meloidogyne* spp. (nematóide das galhas) e o *Mesocriconema* spp. (nematóide anelado), constituindo um sério problema em muitas áreas aptas para instalação de pomares de *Prunus* spp., sendo também um fator limitante para a utilização de áreas destinadas a produção de mudas. No caso de nematóides do gênero *Meloidogyne*. Carneiro et al. (1993) citam que em levantamentos realizados em pomares de pessegueiro no Rio Grande do Sul, as espécies detectadas com maior freqüência foram *M. javanica* e *M. incognita*.

Para a cultura do pessegueiro o uso de porta-enxertos é de grande importância no manejo das plantas, pois permite melhor adaptação das mesmas ao ambiente (clima e solo) e a superação de vários problemas fitossanitários, como por exemplo, a resistência a pragas de solo.

A utilização de porta-enxertos resistentes à nematóides das galhas é a forma mais efetiva e econômica para atenuar os danos provocados por estas pragas, na produção de frutas de caroço, e pode ser especialmente importante no estabelecimento inicial e na vida produtiva do pomar, em áreas com histórico da presença de nematóides (SALESSES et al., 1995), uma vez que o controle químico envolve elevados custos e o uso de princípios ativos muito tóxicos, causando forte impacto ambiental.

Durante muitos anos, os programas brasileiros de melhoramento genético do pessegueiro preocuparam-se com as cultivares-copa e deixaram de lado os estudos com porta-enxertos (RASEIRA; NAKASU, 2002). Segundo Bianchi et al. (2002), devido a poucas informações existente sobre o uso a campo de porta-enxertos resistentes a nematóides, em 1998, o setor de fruticultura da FAEM – UFPEL iniciou um trabalho de introdução e avaliação de porta-enxertos, possuindo atualmente um banco de germoplasma (BAG) com cerca de 40 genótipos de *Prunus* spp., muitos

deles portadores de genes de resistência a nematóides das galhas (Nemaguard, Nemared, Flordaguard, Okinawa, Tsukuba, entre outros), entretanto alguns apresentam problemas de adaptação, como por exemplo, a alta necessidade de frio. Por esse motivo, existe a necessidade de desenvolver novos genótipos mais adaptados às condições edafoclimáticas do Rio Grande do Sul e portadores de genes de resistência à nematóides das galhas. Para que esses genótipos introduzidos possam ser recomendados para cultivo ou utilizados no melhoramento genético, o primeiro passo é confirmar se os principais atributos agronômicos desses acessos são realmente expressos em diferentes condições edafoclimáticas e com diferentes isolados de nematóides das galhas.

Outro aspecto importante relacionado aos acessos presentes em bancos de germoplasmas é o reconhecimento das características expressas pelo genótipo (AFFONSO et al., 2005), bem como a verificação a idoneidade genética desses acessos.

De acordo com Bianchi e Fachinello (2005), até meados da década de 60, as características que diferenciavam variedades e cultivares eram baseadas somente nas avaliações morfofenológicas das plantas e descritas de acordo com o tipo de material a ser avaliado (porta-enxertos clonais ou *seedling*, cultivar copa para frutos destinados ao consumo in natura ou indústria, entre outras). Para Bianchi et al (2002) esta metodologia apresenta limitações operativas-temporais e um custo elevado; além de não permitir o acesso a todo o genoma, conduz a inevitáveis dúvidas de interpretação quando os genótipos em estudo possuem características morfofenotípicas muito similares.

Com o avanço da biotecnologia e o uso de marcadores moleculares, a possibilidade de desenvolvimento de variedades novas foi ampliada, reduzindo o tempo requerido para a descoberta e/ou identificação de características específicas dentro de progênies de plantas, bem como a possibilidade de distinguir cultivares geneticamente próximas (MOTA, 2008).

O uso de marcadores de DNA, comparados aos marcadores morfológicos, oferece informações mais estáveis quanto ao caráter fenotípico, uma vez que o fenótipo é a expressão do genótipo em condições ambientais específicas, podendo mudar com o ambiente, no entanto, o genótipo ou a constituição do DNA de um indivíduo se mantém estável durante o ciclo de vida (VIDOR et al., 2002). Outra vantagem dos marcadores moleculares é a possibilidade de utilizar amostras de

células de diferentes tecidos e partes da planta (folhas, embriões, cotilédones, pólen, etc.), em qualquer estágio de desenvolvimento, não interferindo no processo biológico que se deseja estudar (ROBINSON, 1998).

Os marcadores de locos microssatélites (SSR) são baseados na amplificação de seqüências repetidas em *tandem* (LITT; LUTY, 1989; WEBER; MAY, 1989) e o seu uso permite a construção de bancos de dados, mapeamento genético, podendo simplificar a identificação de casos de sinonímias e homonímias em um amplo número de cultivares.

Os locos de microssatélites têm assumido um papel importante em análises genéticas e no estudo de um grande número de espécies de plantas. Esse tipo de marcador é um dos mais polimórficos e, devido a sua característica de codominância, abundância e distribuição uniforme ao longo do genoma, são os mais apropriados para estudos genéticos de variabilidade e mapeamento de características de interesse (BORÉM; CAIXETA, 2006), possuindo o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo na terminologia de marcadores moleculares (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), constituindo uma ferramenta com grande aplicabilidade no estudos da genética molecular de *Prunus* spp.

A tecnologia de marcadores moleculares tornou possível a construção de mapas genéticos saturados em *Prunus* spp. (DIRLEWANGER et al., 2004; YAMAMOTO et al., 2001) que têm grande aplicação no estudo de locos que controlam caracteres de importância agrônômica. De acordo com Faleiro et al. (2003) o desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética das mais variadas espécies vegetais.

No melhoramento de plantas, os mapas genéticos são uma importante ferramenta para análise completa de genomas, na decomposição de características genéticas complexas nos seus componentes Mendelianos, na localização das regiões genômicas que controlam caracteres de importância e na quantificação do efeito destas regiões na característica estudada (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Ainda de acordo com os mesmos autores, a construção de um mapa genético estimula a aquisição de informações importantes para o melhoramento genético de uma espécie, principalmente por meio da associação de marcadores moleculares com caracteres qualitativos e quantitativos.

Considerando-se que existem porta-enxertos de pessegueiro resistentes as espécies mais freqüentes de *Meloidogyne* spp., que ocorrem associados a cultura do pessegueiro, a correta identificação desses genótipos e o estudo da reação destes a diferentes espécies de nematóides das galhas é de fundamental importância na seleção e recomendação dos melhores porta-enxertos. Além disso, o uso de estratégias mais rápidas e precisas de seleção, como é o caso da identificação de marcadores moleculares associados a genes de interesse, podem possibilitar melhoraria na eficiência de seleção de novos genótipos de *Prunus*.

Devido a importância que o pessegueiro representa para o Rio Grande do Sul, é importante que pesquisas sejam realizadas visando à identificação de porta-enxertos resistentes a nematóides, além de marcadores moleculares que possam diferenciar e caracterizar cultivares copa e/ou porta-enxertos utilizados comercialmente e na construção de mapas genéticos, para localização de caracteres de interesse para uso nos programas de melhoramento genético.

A garantia de idoneidade genética do material vegetal é um atributo qualitativo de grande importância em fruticultura. Portanto, a utilização de mudas de alta qualidade, obtida de material propagativo selecionados para condições específicas de cultivo, é determinante para se obter boa produtividade.

Este trabalho de tese está organizado em três capítulos, sendo o primeiro capítulo referente a reação de porta-enxertos de pessegueiro à *Meloidogyne incognita* (Kofoed e White) Chitwood (1949), o capítulo dois trata do estudo da frequência alélica e estimativa da similaridade genética entre porta-enxertos de pessegueiro baseado em marcadores moleculares codominantes e por fim o capítulo três refere-se a construção de um mapa genético preliminar de uma população segregante de *Prunus persica* ('Capdeboscq' x 'Flordaguard').

CAPÍTULO 1

REAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS DE PESSEGUEIRO À *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood (1949)

INTRODUÇÃO

A fruticultura moderna exige tecnologias que permitam a obtenção de produções elevadas, regulares, com alta qualidade e com menores investimentos possíveis (FINARDI, 2003). Nesse sentido, estudos com o objetivo de identificar fontes de resistência a pragas e doenças têm se constituído em importantes contribuições, não somente para o aumento da produtividade e da qualidade final das frutas, mas também sob o ponto de vista econômico (MAYER et al., 2005b) e ecológico da produção.

Dentre as pragas que causam danos e afetam a produtividade de frutíferas de clima temperado estão várias espécies de fitonematóides. A ocorrência desta praga em áreas de cultivo assume grande importância em virtude dos sérios prejuízos causados às plantas e, indiretamente, aos produtores, pela redução dos lucros. De acordo com Gomes e Campos (2003), os nematóides fitoparasitas prejudicam as plantas pela sua ação nociva sobre o sistema radicular, afetando a absorção e a translocação de nutrientes, alterando a fisiologia, podendo também predispor as plantas a doenças e estresses ambientais ou atuando como transmissores de outros patógenos.

Em levantamentos realizados em pomares de pessegueiro no Rio Grande do Sul, Carneiro et al. (1993) verificaram que as espécies do nematóide das galhas com maior frequência no sistema radicular das plantas foram *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood e *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood. De acordo com Salesses et al. (1995), a utilização de porta-enxertos resistentes a esses fitonematóides é a forma mais efetiva e econômica para evitar danos desta praga em frutíferas de caroço e pode ser especialmente importante no estabelecimento inicial e na vida produtiva do pomar, em áreas com histórico de ocorrência de fitonematóides.

No Rio Grande do Sul, os porta-enxertos para pessegueiro normalmente são formados a partir de caroços de diversas cultivares-copa de maturação tardia, obtidas nas indústrias de conservas. Em levantamento do sistema de produção de mudas de pessegueiros realizados em 2000 no RS e SC, detectou-se alta variabilidade no vigor das plantas na maioria dos viveiros visitados (CENTELLA-QUEZADA, 2000). Mayer et al. (2005b) relata que a segregação genética e susceptibilidade a fitonematóides decorrentes do uso de caroços de pêssego provenientes da indústria, não atendendo às exigências mínimas de qualidade para um bom porta-enxerto.

Devido a importância socioeconômica do cultivo de frutíferas de caroço na região Sul do Brasil, desde 1998, o setor de fruticultura da FAEM/UFPEL tem introduzido genótipos de porta-enxertos de *Prunus* spp. das mais variadas regiões do mundo, formando um banco de germoplasma (BAG), para testes desses porta-enxertos nas condições brasileiras e para uso no melhoramento genético (BIANCHI et al., 2003), sendo muitos dos acessos de porta-enxertos referenciados como resistentes a *Meloidogyne* spp. (LU et al., 1999; YAMAMOTO; HAYASHI, 2002; CLAVERIE et al., 2004; DIRLEWANGER et al., 2004). Entretanto, para que esses genótipos introduzidos possam ser recomendados para cultivo ou utilizados na constituição de novas cultivares, resistentes a fitonematóides, o primeiro passo é confirmar se os principais atributos agrônômicos desses acessos são realmente expressos em diferentes condições edafoclimáticas e com diferentes isolados de fitonematóides.

Diante desta realidade, pesquisas com o objetivo de caracterizar genótipos introduzidos de outros países, bem como de identificar fontes de resistência em materiais de uso local, são de grande importância no Brasil. Para Mayer et al. (2003) a partir dessa etapa de caracterização, é possível propagar as plantas vegetativamente, fixando a característica desejada e manter a identidade da planta-matriz. Portanto foi objetivo deste trabalho avaliar a reação de cinco porta-enxertos de pessegueiro a *Meloidogyne incognita*, em condições de casa-de-vegetação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas plantas dos porta-enxertos: 'Seleção UFPel 0402', 'Okinawa', 'Nagano Wild', 'Flordaguard' e 'Seleção NR-0080407', multiplicadas por meio de enraizamento de estacas herbáceas.

Em dezembro de 2007 as plantas, com 11 meses de idade, foram transplantadas para vasos de plástico, com 10 L de capacidade, contendo como substrato, solo de pomar autoclavado (120 °C por 1:30 hora). Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação, do Departamento de Botânica-UFPel, com controle de temperatura, entre 25-30°C. A irrigação foi realizada manualmente, conforme necessidade das plantas, durante todo o período de execução do experimento.

Como inóculo do nematóide, foi utilizada uma população pura de *M. incognita* (Est. I2) mantida e multiplicada em tomateiro 'Santa Cruz', em casa de vegetação (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001).

Aos 60 dias após o transplante, cada porta-enxerto de pessegueiro foi inoculado com 10 mL de uma suspensão contendo 10.000 ovos+J2 de *M. incognita*, depositando-se o inóculo em cinco orifícios de 3 cm de profundidade, ao redor das plantas. Plantas de tomateiro cv. Santa Cruz foram inoculadas para a comprovação da eficiência do inóculo, sendo essas consideradas como testemunhas.

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com um tratamento com cinco níveis ('Okinawa', 'Nagano Wild', 'Flordaguard' e 'Seleção UFPel-0402' e 'Seleção NR-0080407') e cinco repetições com uma planta cada.

Decorridos seis meses da inoculação, as raízes de cada planta foram separadas da parte aérea, lavadas cuidadosamente para retirada do solo e avaliadas quanto ao índice de galhas (IG), segundo metodologia descrita por Taylor e Sasser (1978), sendo nos tomateiros, essa avaliação realizada três meses após a inoculação. Logo após, procedeu-se a extração dos ovos do nematóide das raízes

(HUSSEY; BARKER, 1973) de cada planta, para quantificação e determinação do Fator de Reprodução (FR) do nematóide nos diferentes porta-enxertos, considerando $FR = \text{população final} / \text{população inicial}$ (OOSTENBRINK, 1966).

A reação das plantas foi estimada a partir do fator de reprodução (FR) de *M. incognita*, onde, considerou-se como imune aquelas plantas que apresentaram $FR=0,00$; resistentes, $FR<1,00$; e, suscetíveis, $FR>1,00$ (OOSTENBRINK, 1966).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, verificou-se que todos porta-enxertos testados comportaram-se como imunes a *M. incognita* contrastando com a testemunha, onde foram detectados índices máximos de galhas nas raízes e um FR de 56,77 (tab. 1).

Tabela 1. Reação de diferentes porta-enxertos de pessegueiro a *Meloidogyne incognita*. FAEM/UFPeL. Pelotas-RS, 2009.

Genótipos	Nº galhas	IG**	FR*	Nº de ovos+J2	Reação
Tomateiro (test.)	7036	5	56,77	568.000	S
Seleção UFPel 0402	0	0	0	0	I
Okinawa	0	0	0	0	I
Nagano Wild	36	4	0	0	I
Flordaguard	0	0	0	0	I
Seleção NR0080407	0	0	0	0	I

S=Suscetível I=imune *Fator de Reprodução (FR) **Índice de galha pela escala de TAYLOR & SASSER (1978)

De acordo com os dados da tab. 1, tanto a ‘Seleção UFPel-0402’ como ‘Okinawa’ foram imunes a *M. incognita*, e apresentaram FR= 0,00. Em trabalhos anteriores realizados por Mayer et al. (2005b) e Rossi et al. (2002), a cultivar ‘Okinawa’ foi considerada resistente a *M. incognita*. Rossi et al. (2002) relatam que ‘Okinawa’ pode ser uma referência de resistência, pois quando estes autores inocularam *M. javanica*, apesar de encontrarem poucas galhas e ausência de ovos nas raízes, verificaram que os juvenis de segundo estágio (J2) penetraram nas raízes e apresentaram desenvolvimento inicial, porém acabaram morrendo precocemente devido a algum mecanismo de resistência da planta. Essa resistência

também foi observada previamente por Scherb et al. (1994) e Menten et al. (1977) para *M. incognita* em 'Okinawa'.

A 'Seleção UFPel-0402' é um genótipo obtido de uma população de seedlings derivados por livre polinização da cultivar Okinawa, e, além da resistência a *M. incognita* verificada neste estudo (tab. 1), é mais precoce em relação à época de floração e a maturação dos frutos em relação a 'Okinawa' (AFFONSO et al., 2005).

Mayer et al. (2005b) estudaram a reação de cultivares de pessegueiro a *M. incognita*, observando que 'Okinawa' apresentou média de 0,33 galhas no sistema radicular, entretanto não foram encontrados ovos ou juvenis, resultando um fator de reprodução igual a zero, sendo a reação classificada como resistente, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho, onde a cultivar foi considerada imune.

A imunidade de 'Flordaguard' a *M. incognita* detectada neste estudo, confirma a informação de Sherman et al. (1991) e Ferguson e Chaparro (2009), onde os autores descrevem, dentre as características desse porta-enxerto, a resistência aos nematóides das galha, porém esse genótipo é suscetível a raça 3 de *M. incognita*. Considerando-se que 'Flordaguard' tem como ancestral a cultivar Okinawa, que é uma fonte de resistência importante à *Meloidogyne* spp., estes são potenciais porta-enxertos a serem utilizados nos programas de melhoramento genético e uma alternativa para uso na implantação de pomares em áreas infestadas pela praga.

A 'Seleção NR-0080407', híbrido F1, resultante do cruzamento entre os porta-enxertos 'Capdeboscq' e 'Flordaguard' (Programa de Melhoramento de Porta-Enxertos da UFPel), foi também considerada imune à *M. incognita*, não apresentando galhas nem massa de ovos nas raízes. Considerando que 'Capdeboscq' é susceptível a *Meloidogyne* spp. (MAUCH et al., 1991; GOMES; CAMPOS, 2003), a imunidade da referida seleção foi herdada do 'Flordaguard'. Apesar da suscetibilidade a nematóide das galhas, 'Capdeboscq' possui uma característica importante, que é o bom índice de germinação de sementes e a adaptação a região de Pelotas (RS), necessitando de aproximadamente 300h de frio (FINARDI, 2003) para uma boa floração e desenvolvimento da planta, e essa mesma região possui uma média em torno de 400 horas de frio (HERTER, 1998), por isso esse genótipo vem sendo utilizado no programa de melhoramento genético da UFPel, principalmente com genótipos com elevada exigência em frio para superação da dormência. Um dos fatos que justifica o uso desta cultivar em cruzamentos

com porta-enxertos resistentes a nematóides das galhas, se deve a germinação das sementes, pois ‘Okinawa’ necessita da quebra de caroços para se obter bons índices de germinação, já “Capdeboscq” não necessita desta prática para uma boa germinação. Outro fato é a necessidade de manejo diferenciado das plantas de ‘Flordaguard’ para se obter boa produção de frutos, enquanto que ‘Capdeboscq’ apresenta boa produção de frutos.

Nagano Wild’ foi o único porta-enxerto onde verificou-se a presença de galhas nas raízes (tab. 1; Fig. 1C), sendo atribuído o IG= 4, conforme a escala de Taylor e Sasser (1978); entretanto, neste genótipo não se observou multiplicação do nematóide. Nagano Wild’ foi introduzido no Banco de Gemoplasma de Porta-enxertos de *Prunus* da UFPel, a partir de plantas obtidas no Uruguai. Apesar de escassas informações na literatura sobre este porta-enxerto, relatos de produtores e pesquisadores indicam ser uma cultivar portadora de genes de resistência nematóide das galhas. Entretanto, com base nos resultados obtidos nesse trabalho, essa resistência parece não ser completa pelo fato de ter sido observado a presença de galhas, necessitando de estudos com novos isolados de nematóides.



Figura 1. Raízes dos porta-enxertos de pessegueiro: (A) ‘Seleção UFPel-0402’; (B) ‘Okinawa’; (C) ‘Nagano Wild’; (D) ‘Flordaguard’; (E) ‘Seleção NR-0080407’ e (F) do tomateiro cv. Santa Cruz (testemunha). Nas figuras C e F podem ser observadas a formação de galhas induzidas por *Meloidogyne incognita*. Pelotas-RS, 2009.

Na Fig. 1C, pode-se verificar a presença de galhas nas raízes de ‘Nagano Wild’. Essa característica está associada à dificuldade de translocação dos

nutrientes das raízes para as demais partes da planta, portanto, caracterizando dano. De acordo com Gomes e Campos (2003), pessegueiros infestados pelo nematóide das galhas, apresentam enfraquecimento, baixa produção, desfolhamento precoce e declínio prematuro, podendo ocorrer ocasionalmente, a morte da planta, sendo os sintomas potencializados sob condições de seca.

Apesar do índice de galhas 4, verificado nas raízes de 'Nagano Wild' (Fig. 1C), este material foi considerado imune a *M. incognita* tomando-se por base a avaliação da resistência pelo FR do nematóide. Para Rossi et al. (2002), *Meloidogyne* spp. é de extrema importância na cultura do pessegueiro, portanto avaliar a reação de resistência somente pelo índice de galhas não é suficiente para caracterizar um genótipo de fruteira resistente a *Meloidogyne* spp., sendo necessário, também, avaliar a reprodução do nematóide na planta. Entretanto, de acordo com observações de Gomes, C. B. (informação verbal)¹, no Rio Grande do Sul, é bastante comum a ocorrência de pessegueiros com sistema radicular severamente atacado por *Meloidogyne* spp. e com número reduzido de ovos, o que sugere a inclusão de avaliação de danos como parâmetro auxiliar no estudo da resistência desta cultura, muito embora a reação de resistência seja considerada pela reprodução do nematóide.

De acordo com observações de Ledbetter (2009), a resistência aos fitonematóides em *Prunus*, para ambos os gêneros e espécies, é específico. Essa diferença com relação à resistência a diferentes espécies de *Meloidogyne* spp foi verificada por Esmenjaud et al. (1997), Fernández et al. (1994) e Rossi et al. (2002). Assim, porta-enxertos devem ser testados, com cada espécie de nematóide, raça, ou população para a determinação de resistência ou suscetibilidade. Diante do exposto, além da avaliação destes porta-enxertos a *M. incognita*, mais espécies do nematóide das galhas devem ser avaliadas para complementar os resultados obtidos nesse trabalho, afim de se estabelecer um perfil completo para a resistência e/ou susceptibilidade, sendo estas informações importantes para auxiliar na definição dos melhores genótipos para uso no melhoramento genético ou para uso comercial dos porta-enxertos.

¹ Informação fornecida pelo Dr. César Bauer Gomes, pesquisador da EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas/RS, 2009.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- A Seleção 'UFPel-0402', 'Okinawa', 'Flordaguard', 'Seleção NR-0080407' e 'Nagano Wild' são imunes a *M. incognita*, podendo ser utilizados em programas de melhoramento genético de porta-enxertos para pessegueiro.
- Os genótipos e cultivares avaliados são uma alternativa de porta-enxertos para a implantação de pomares de pessegueiros e ameixeiras em áreas onde esta praga ocorre.
- A resistência a nematóides das galhas presente em 'Nagano Wild' necessita de estudos complementares para identificar de forma mais clara a amplitude dessa resistência.

CAPÍTULO 2

FREQUÊNCIA ALÉLICA E ESTIMATIVA DA SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE PORTA-ENXERTOS DE PESSEGUEIRO BASEADO EM MARCADORES MOLECULARES CODOMINANTES

INTRODUÇÃO

Prunus persica (L.) Batsch é uma espécie diplóide nativa da China, com $2n=16$ e $n=8$ cromossomos, predominantemente autógama, com menos de 5% de fecundação cruzada (SCORZA et al. 1985). Dentro do gênero *Prunus* é aquela que possui menor variabilidade genética e mais baixo polimorfismo das características morfofenológicas (VINATZER et al., 1999), de maneira que muitas vezes a identificação de cultivares, baseada somente no fenótipo, deixa muitas dúvidas quanto a verdadeira identidade dos genótipos (PANCALDI et al., 1998).

A certificação genética de porta-enxertos de pessegueiro, por meio da descrição molecular e/ou das características morfofenológicas permite reconhecer, com segurança, o material vegetal em todas as etapas de produção. Para Faleiro et al. (2005) a caracterização molecular é complementar aos estudos de caracterização morfológica e agrônômica, fornecendo informações mais precisas a respeito da base genética de genótipos para uso em programas de melhoramento genético, permitindo elaborar um tipo de impressão digital molecular da planta ou *fingerprinting* varietal.

Os marcadores de locos microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats) têm sido amplamente indicados para estudos de variabilidade genética, cálculos de frequência alélica, análise de segregação, mapeamento genético, identificação de genótipos e em estudos de genética de populações, pois são de natureza codominante e muito polimórficos (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998). Por outro lado, marcadores moleculares do tipo dominante, a exemplo de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), podem ser convertidos em novos tipos de marcadores denominados SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) e STS (Sequence Tagged Sites) respectivamente,

os quais podem apresentar comportamento codominante, gerando um maior conteúdo de informação alélica, comparado aos dominantes.

O conhecimento da variabilidade genética dos indivíduos de uma espécie é importante para trabalhos de conservação e programas de melhoramento, pois permite expressar o potencial de uma população, para a seleção (RAMALHO et al., 1996).

Para os melhoristas, interessa a identificação e obtenção de grande variabilidade genética nas plantas para a imposição de processos seletivos que efetivamente resulte em ganhos genéticos significativos (BERNARDO, 2002). De acordo com Cruz (2005) suas técnicas de seleção devem ser direcionadas para o desenvolvimento de materiais genéticos superiores.

Estudos de similaridade genética e de frequência alélica são de grande importância, pois possibilitam inferir com que frequência um alelo aparece em uma determinada população e permitem distinguir genótipos, podendo simplificar a identificação de casos de sinonímias e homonímias em um amplo número de cultivares, facilitando a seleção dos indivíduos que poderão ser utilizados para compor um banco de germoplasma ou serem utilizados em melhoramento genético.

Em 2003, na Universidade Federal de Pelotas (UFPeI), iniciou-se um trabalho de melhoramento de porta-enxertos para pessegueiro. Entretanto, na análise molecular de porta-enxertos de pessegueiro do Banco de Germoplasma da UFPeI, Bianchi et al. (2005b) comprovaram problemas de identificação inter e intravarietal. Dentre 12 acessos do porta-enxerto Okinawa, um grupo de seis plantas apresentaram padrão molecular idêntico, sendo considerados clones, enquanto outro grupo de seis plantas apresentaram variabilidade, concluindo se tratar de *seedlings*. Esses resultados reforçam a necessidade da comprovação da origem genética do material presente em bancos de germoplasma.

Para o uso de genótipos em programas de melhoramento ou na disponibilização de novos porta-enxertos de pessegueiro para viveiristas e fruticultores, a qualidade genética do material vegetal é de fundamental importância.

O presente trabalho objetivou diferenciar e agrupar 14 porta-enxertos de pessegueiro, estabelecendo um padrão molecular de caracterização para cada genótipo, baseado em marcadores codominantes, para futuros trabalhos de melhoramento genético.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 14 porta-enxertos de pessegueiro do Banco de Germoplasma de Porta-enxertos de Pessegueiro (tab. 1), localizado no Centro Agropecuário da Palma, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Capão do Leão-RS, Brasil. As análises moleculares foram realizadas no período de março de 2007 a janeiro de 2009.

Tabela 1. Porta-enxertos de *Prunus* spp. presentes no banco de germoplasma da Universidade Federal de Pelotas, analisados com marcadores de microsatélites. FAEM/UFPel. Pelotas-RS, 2009.

Porta-enxertos	Espécie	Origem
Nemaguard *	<i>P. persica</i> x <i>P. davidiana</i>	Estados Unidos
Nemared *	<i>P. persica</i> x <i>P. davidiana</i>	Estados Unidos
Flordaguard *	<i>P. persica</i> x <i>P. davidiana</i>	Estados Unidos
Okinawa *	<i>Prunus persica</i>	Estados Unidos
Seleção UFPel-0402	<i>Prunus persica</i>	Brasil
Tsukuba *	<i>Prunus persica</i>	Japão
Kutoh *	<i>Prunus persica</i>	Japão
Ohatsumomo *	<i>Prunus persica</i>	Japão
Nagano Wild *	<i>Prunus persica</i>	Japão
Capdeboscq	<i>Prunus persica</i>	Brasil
Aldrichi	<i>Prunus persica</i>	Brasil
Rubira *	<i>Prunus persica</i>	França
Montclar *	<i>Prunus persica</i>	França
Seleção UFPel 0390402	<i>Prunus persica</i>	Brasil

* Fonte: SHERMAN et al. (1991); LORETI (2005)

O DNA foi extraído a partir de amostras contendo 50 mg de folhas frescas completamente expandidas usando-se o método descrito por Doyle; Doyle (1991). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, coletadas para tubos de dois mL juntamente com 900 µL do tampão de extração (2% CTAB, 1,4M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris pH 8,0, 0,5% Mercaptoetanol, 1% PVP); seguida de incubação em banho-maria por 60 min a 65°C. Depois, quando a temperatura ambiente, foi adicionado 900 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) agitando-se por 5 minutos e centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm. Após, 700 µL de sobrenadante foi coletado para novo tubo com igual volume de etanol absoluto, mantendo a amostra a -20°C por duas horas, para precipitação do DNA. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm, sendo eliminado o sobrenadante. Cada precipitado de DNA foi lavado com 300 µL de etanol 70%. Para a suspensão final foi utilizado tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) contendo RNase (10 µg/mL). O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8%, usando como padrão o DNA de Fago *Lambda* digerido com *Hind* III, posteriormente uma solução de trabalho foi diluída para a concentração de 10 ng µL⁻¹.

Para as reações de PCR (Polymerase Chain Reaction), foram utilizados primers para locos microssatélites ou seqüências simples repetidas (SSR) da série UDP, da série BPPCT e também primers para locos STS (OPA P4) e SCAR (SCAL 19) (tab. 2).

Nas reações de PCR foram utilizados 25 ng de DNA de cada amostra; 2,5 µl de 10x PCR buffer; 1,7 mM de MgCl₂; 0,5 µM de cada *primer*; 0,2 µM de dNTP; 0,75U de Taq DNA polimerase (kit Invitrogen) e água Milli-Q para um volume final de 25 µl. Os *primers* utilizados na reação de PCR estão listados na Tabela 3, com suas respectivas temperaturas de anelamento (T^oA).

As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador, da marca BIO-RAD modelo ICYCLER, programado da seguinte forma: 2 ciclos de 94°C por 2 min, 55°C por 1 min, 72°C por 50s, 39 ciclos de 94°C por 50s, 52-60°C por 45s, 72°C por 45s, 1 ciclo de 72°C por 15 min.

Tabela 2. Seqüências de oligonucleotídeos (Primers) e respectivas temperaturas de anelamento (T°A) de *primers* para locos de Microssatélites, STS e Scar. FAEM/UFPel. Pelotas-RS, 2009.

Primers	Seqüência (5' - 3')	T°A	Referência
UDP 96001	F: AGTTTGATTTTCTGATGCATCC R: TGCCATAAGGACCGGTATGT	58°C	Cipriani et al. (1999)
UDP 96003	F: TTGCTCAAAAGTGTCGTTGC R: ACACGTAGTGCAACACTGGC	58°C	Cipriani et al. (1999)
UDP 96008	F: TTGTACACACCCTCAGCCTG R: TGCTGAGGTTTCAGGTGAGTG	58°C	Cipriani et al. (1999)
UDP 96013	F: ATTCTTCACTACACGTGCACG R: CCCCAGACATACTGTGGCTT	60°C	Cipriani et al. (1999)
UDP 96019	F: TTGGTCATGAGCTAAGAAAACA R: TAGTGGCACAGAGCAACACC	60°C	Cipriani et al. (1999)
UDP 98407	F: AGCGGCAGGCTAAATATCAA R: AATCGCCGATCAAAGCAAC	58°C	Cipriani et al. (1999)
UDP 98409	F: GCTGATGGGTTTTATGGTTTTC R: CGGACTCTTATCCTCTATCAACA	60°C	Cipriani et al. (1999)
UDP 98412	F: AGGGAAAGTTTCTGCTGCAC R: GCTGAAGACGACGATGATGA	60°C	Cipriani et al. (1999)
UDP 98414	F: AAAAGGCACGACGTTGAAGA R: TTCAGATTGGGAATTTGAAG	58°C	Cipriani et al. (1999)
BPPCT 001	F: AATTCCCAAAGGATGTGTATGAG R: CAGGTGAATGAGCCAAAGC	57°C	Dirlewanger et al. (2002)
BPPCT 002	F: TCGACAGCTTGATCTTGACC R: CAATGCCTACGGAGATAAAAGAC	57°C	Dirlewanger et al. (2002)
BPPCT 016	F: GATTGAGAGATTGGGCTGC R: GAGGATTCTCATGATTTGTGC	57°C	Dirlewanger et al. (2002)
BPPCT 023	F: TGCAGCTCATTACCTTTTGC R: AGATGTGCTCGTAGTTCGGAC	57°C	Dirlewanger et al. (2002)
BPPCT 026	F: ATACCTTTGCCACTTGCG R: TGAGTTGGAAGAAAACGTAACA	57°C	Dirlewanger et al. (2002)
BPPCT 034	F: CTACCTGAAATAAGCAGAGCCAT R: CAATGGAGAATGGGGTGC	57°C	Dirlewanger et al. (2002)
BPPCT 041	F: CAATAAGGCATTTGGAGGC R: CAGCCGAACCAAGGAGAC	57°C	Dirlewanger et al. (2002)
SCAR-SCAL 19	F: TCTGCCAGTGAAATATAAT R: CATTGGAGAAGATTGGCCC	52°C	Lecoals et al. (1999)
STS-OPA P4	F: TTAAGACACCCAAACGATTTCA R: TGGGCATTTTGAGGTATCTG	57°C	Yamamoto e Hayashi (2002)

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 cyanol), seguido de tratamento térmico a 95°C por 5 minutos. Uma aliquota de 4,5 µL de cada amostra amplificada foi aplicada ao gel de poliacrilamida 6%, em tampão TBE 1X a 65 volts, por três horas. Para a visualização das bandas utilizou-se nitrato de prata, segundo o método descrito por Bassam et al. (1991).

O perfil eletroforético dos genótipos sob análise foram registrados quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas, em cada loco, e utilizados para o cálculo da frequência alélica e da similaridade genética, esta calculada por meio do Coeficiente Simple Matching e o agrupamento das cultivares pelo método UPGMA (Unweighted pair group mean average), utilizando o software NTSYS. pc versão 2.1 (ROHLF, 2000). As frequências alélicas, heterozigosidade (H), conteúdo de informação polimórfica (PIC), número de alelos e frequência máxima do alelo (Fmax), bem como cálculo das distâncias genéticas entre porta-enxertos foi calculada pelo software Genes (CRUZ, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de alelos amplificados em cada loco variou de dois com Scal 19 até sete com UDP-96008, enquanto o número de alelos amplificados variou de um a dois por genótipo (Fig. 1A e 1B). Os 18 locos avaliados produziram um total de 82 polimorfismos. Não se obteve produtos amplificados no genótipo 'Nemaguard' com os primers BPPCT 002 e Scal 19, nem em 'Flordaguard' com os primers BPPCT 023 e BPPCT 034 e em 'Nemared' com UDP96-013 e UDP96-019.

Para McCouch et al. (2001) muitos estudos mostram diversidade alélica significativamente maior de marcadores de microssatélites comparado a outros marcadores moleculares, o que justifica seu uso na diferenciação das cultivares que tem na sua constituição genética ancestrais em comum, consequentemente, genótipos muito semelhantes. De acordo com Borém e Caixeta (2006) variações nas regiões dos microssatélites resultam em grande número de alelos detectados por loco genético, apresentando um elevado poder discriminatório, por isso, normalmente poucos locos garantem a diferenciação de genótipos, tornando-se importante devido à necessidade de distinção entre genótipos geneticamente muito próximos.

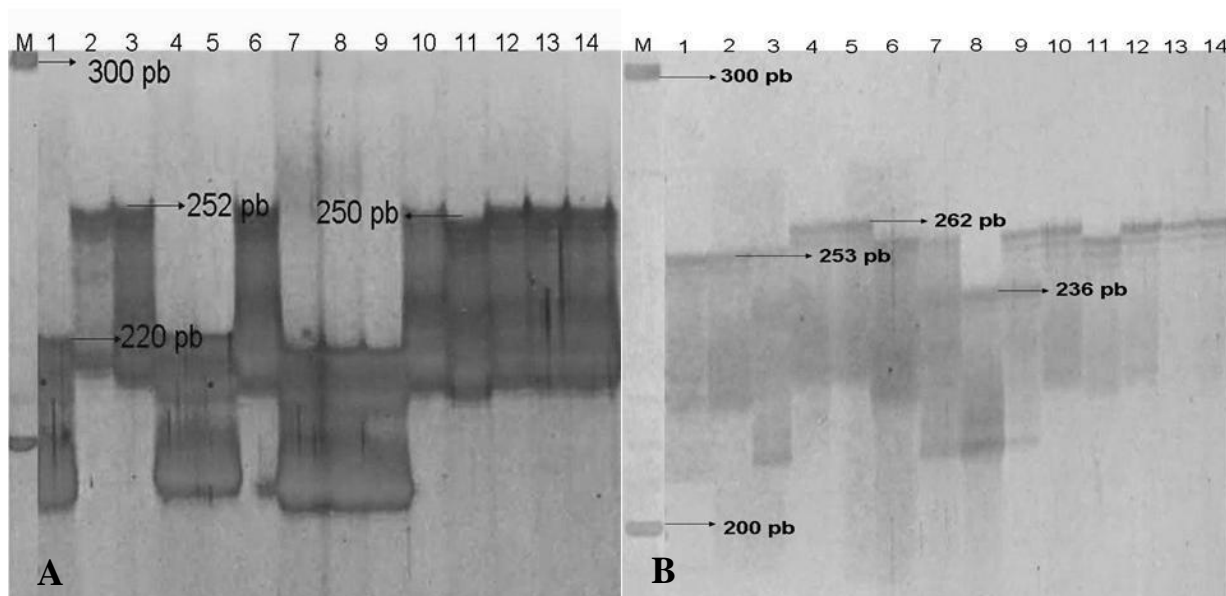


Figura 1. Produtos da amplificação gerados pelos marcadores SSR UDP-98407 (A) e BPPCT 041 (B) nas cultivares: 1-Nemaguard, 2-Nemared, 3-Flordaguard, 4-Okinawa, 5-UFPel-0402, 6-Tsukuba, 7-Kutoh, 8-Ohatsumomo, 9-Nagano Wild, 10-Capdeboscq, 11-Aldrighi, 12-Rubira, 13-Montclar e 14-Seleção 0390302. FAEM/UFPel. Pelotas, RS, 2009.

A confiabilidade da técnica de SSR foi verificada por vários autores na análise de diversidade genética de diferentes espécies do gênero *Prunus* (BOUHADIDA et al., 2009; ARANZANA et al., 2002; TESTOLIN et al., 2000). O poder discriminatório da técnica SSR foi demonstrada por Sosinski et al. (2000), na identificação de diferenças em pessegueiros da cultivar Springcrest, onde SSR revelou polimorfismo suficiente para detectar a variabilidade genética entre plantas da mesma cultivar, porém originadas de três fontes diferentes.

No presente trabalho, os 82 polimorfismos obtidos pela análise de 18 locos foram utilizados para elaborar um dendograma que permite visualizar três grupos principais de cultivares, onde a similaridade genética média (SMG) entre os 14 porta-enxertos foi de 67% (Fig. 2).

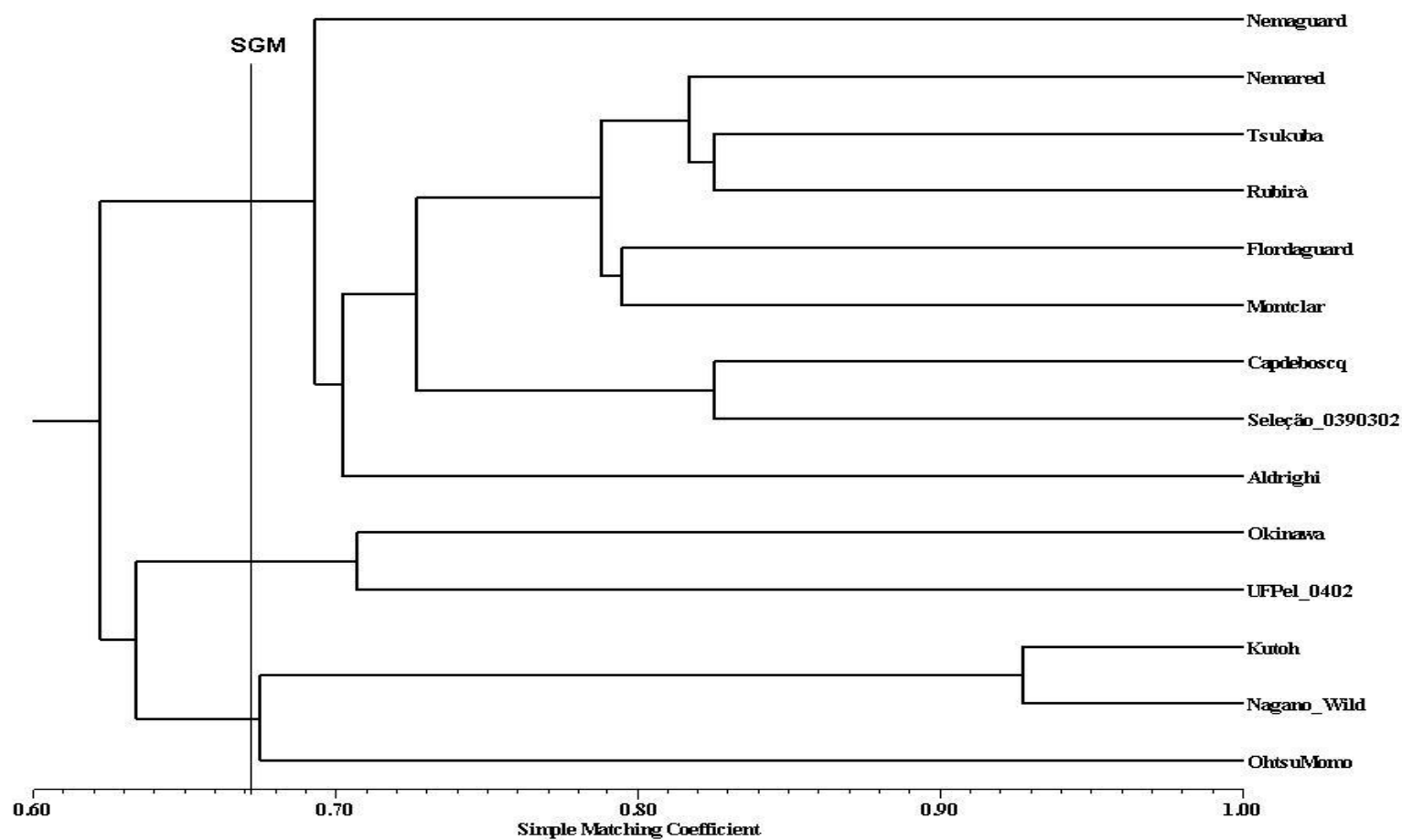


Figura 2. Dendrograma de similaridade baseado em locos de microssatélites de porta-enxertos de pessegueiro. Método de agrupamento UPGMA. FAEM/UFPel. Pelotas-RS, 2009.

‘Kutoh’ e ‘Nagano Wild’ formaram um grupo (Fig. 2) com similaridade genética de 93% (tab. 4A) e de 67% em relação a ‘Ohatsumomo’ que ficou no mesmo grupo, possivelmente pelo fato de terem a mesma origem genética. Esperava-se a formação de um único grupo juntamente com ‘Okinawa’, ‘Tsukuba’ e ‘UFPel-0402’ por serem todos de origem japonesa, mas possivelmente o número de polimorfismos gerados não foi suficiente para agrupar os genótipos desta mesma origem, necessitando que mais locos sejam avaliados afim de confirmar essa hipótese de agrupamento de genótipos.

‘Okinawa’ e ‘Seleção UFPel-0402’ ficaram agrupados separados dos demais porta-enxertos, com 70% de similaridade genética (tab. 4A). Este agrupamento (Fig. 2) se explica pelo fato de que ‘Seleção UFPel-0402’ é um genótipo obtido de uma população de *seedlings* derivados por livre polinização da cultivar ‘Okinawa’. Sendo assim, esperava-se obter um índice de similaridade superior, porém com base nos dados registrados para estes dois genótipos é possível inferir que *seedlings* de ‘Okinawa’ possuem nível significativo de variabilidade genética.

Outro agrupamento similar foi verificado entre ‘Capdeboscq’ e ‘Seleção 0390302’ (Fig. 2) com similaridade genética de 82% (tab. 4A). Essa proximidade é explicada pelo fato que este último genótipo ser obtido de uma população de *seedlings* derivados de livre polinização da cultivar ‘Capdeboscq’. Sendo assim verifica-se que existe consistência dos dados gerados, assim como verificado para ‘Seleção UFPel 0402’.

Os porta-enxertos ‘Nemared’, ‘Tsukuba’, ‘Rubira’, ‘Flordaguard’ e ‘Montclar’ apresentaram similaridade genética variando de 79% a 82% (tab. 4A), ficando agrupados próximos (Fig. 2). Esses genótipos possuem uma característica em comum que é a coloração avermelhada das folhas. No presente trabalho, os locos UDP-98409, 96019 e 96001 foram avaliados e segundo dados de Yamamoto et al. (2001) esses marcadores SSR ficaram posicionados no mesmo grupo de ligação do caractere coloração das folhas, confirmando assim a possível ligação desses marcadores com o referido caractere e a forma de agrupamento.

No referido grupo, ‘Rubira’ e ‘Montclar’, ‘Capdeboscq’ e ‘Seleção 0390302’ tem como característica contrastante, com ‘Tsukuba’, ‘Nemared’ e ‘Flordaguard’, a susceptibilidade ao nematóide das galhas. No caso de

‘Montclar’ é possível se tratar de um genótipo recombinante para cor da folha em relação aos demais presentes no mesmo subgrupo.

Na análise da projeção das distâncias genéticas entre os genótipos (Fig. 3), obteve-se um agrupamento similar ao verificado pelo método UPGMA (Fig. 2), confirmando a relação genética dos genótipos e dos grupos formados. Essa mesma confirmação, entre as duas técnicas de agrupamento, também foi observada por Silva et al. (2007) e por Bertan et al. (2006) em genótipos de trigo. Essa forma de agrupamento tem como critério minimizar as diferenças entre as distâncias originais e as distâncias no espaço bidimensional que, de acordo com Cruz e Viana (1994), é adequada para estudos de similaridade entre genótipos, possuindo como vantagem a simplicidade na interpretação dos resultados.

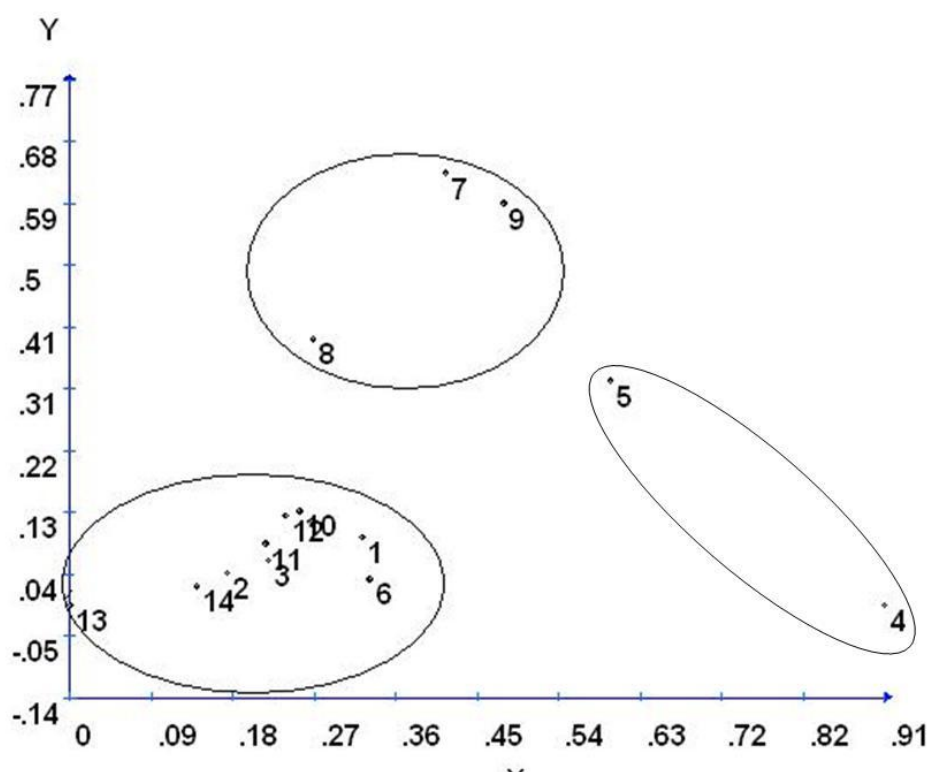


Figura 3. Projeção de distâncias entre os porta-enxertos: 1-Nemaguard, 2-Nemared, 3-Flordaguard, 4-Okinawa, 5-UFPel-0402, 6-Tsukuba, 7-Kutoh, 8-Ohatsumomo, 9-Nagano Wild, 10-Capdeboscq, 11-Aldrighi, 12-Rubira, 13-Montclar, 14-Seleção 0390302. FAEM/UFPel. Pelotas-RS, 2009.

Os dados de frequência alélica foram calculados para cada loco e os alelos receberam denominações simbólicas, (tab. 3). As maiores frequências

alélicas foram de 0,69 para o alelo A2 no loco UDP96-013 e de 0,67 para o alelo A4 no loco UDP98-409. A menor frequência foi de 0,0357 para o alelo A2 no loco UDP96-001, para o alelo A2, A3 e A4 no loco UDP96-008, para o alelo A6 no loco UDP98-409.

A frequência com que um alelo aparece em uma determinada população mostra o quanto é importante para diferenciar genótipos, pois quando um alelo é muito freqüente, não é um bom parâmetro diferenciador de cultivares. Por sua vez, a heterozigosidade é considerada uma medida de variabilidade genética, e dentre os porta-enxertos avaliados variou de 0,4941 no loco UDP96-013 a 0,8163 no loco UDP96-003, com uma média de 0,6634.

Em trabalhos realizados por Cipriani et al. (1999) e Testolin et al. (2000), avaliando uma população de pessegueiro através de marcadores de microsatélites, obtiveram maior heterozigosidade (0,68) no loco UDP96-003, resultado similar ao encontrado no presente trabalho, para o mesmo loco. Para microsatélites da série BPPCT, Dirlewanger et al. (2002) encontraram o maior valor de heterozigosidade (0,42) para o loco BPPCT 001. No presente trabalho, dentre os marcadores da mesma série, o maior valor também foi encontrado para o mesmo loco da série (0,7857), indicando que estes locos marcadores apresentam alta informatividade em estudos de variabilidade genética.

O PIC (conteúdo de informação polimórfica), de acordo com Botstein et al. (1980), é um indicador da qualidade do marcador em estudos genéticos (segregação, identificação de populações e controle de paternidade) e, segundo a classificação dos mesmos autores, locos marcadores com PIC superiores a 0,50 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25-0,50 mediantemente informativos e valores inferiores a 0,25 pouco informativos. No presente trabalho os maiores valores encontrados foram de 0,8094 para Scal 19 e 0,7898 para UDP96-003, e os menores valores foram de 0,4650 para UDP98-407 e 0,4652 para BPPCT 034, com média, entre todos marcadores, de 0,6174, portanto, os marcadores utilizados nesse trabalho são considerados muito e mediantemente informativos.

Com relação a utilização dos dados moleculares para a diferenciação de genótipos, ficou comprovada a diferença genética entre 'Seleção UFPel-0402' e 'Okinawa', que apresentaram alelos de 180 pb e 125 pb, respectivamente, no loco UDP96-008, sendo este último alelo também registrado por Bianchi et al.

(2004a). 'Seleção UFPel-0402' é um genótipo obtido de uma população de *seedlings* derivados por livre polinização da cultivar 'Okinawa', apresentando como característica fenotípica diferencial a época de floração e de maturação dos frutos, que é aproximadamente 30 dias mais precoce em relação a 'Okinawa' (AFFONSO et al., 2005).

Tabela 3. Frequências alélicas, heterozigosidade (H), conteúdo de informação polimórfica (PIC), número de alelos e frequência máxima do alelo (Fmax) de 18 locos avaliados em 14 porta-enxertos de pessegueiro. FAEM/UFPel. Pelotas-RS, 2009.

Loco	Frequência Alélica							H	PIC	Nº alelos	Fmax
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7				
UDP-98407	0,5000	0,0714	0,4286					0,5612	0,4650	3	0,5000
UDP-96008	0,2143	0,0357	0,0357	0,0357	0,0714	0,1071	0,5000	0,6837	0,6484	7	0,5000
UDP-98409	0,0714	0,0714	0,0714	0,6786	0,0714	0,0357		0,5179	0,4975	6	0,6786
UDP-96001	0,1071	0,0357	0,1429	0,3571	0,3571			0,7117	0,6617	5	0,3571
UDP-96013	0,0385	0,6923	0,0769	0,1154	0,0769			0,4941	0,4681	5	0,6923
UDP-96019	0,2692	0,1538	0,0385	0,0385	0,5000			0,6509	0,5973	5	0,5000
UDP-98414	0,1154	0,0769	0,0769	0,3462	0,3846			0,7071	0,6578	5	0,3846
UDP-96003	0,1429	0,0714	0,2143	0,2143	0,1429	0,2143		0,8163	0,7898	6	0,2143
UDP-98412	0,2143	0,5714	0,0714	0,1429				0,6020	0,5528	4	0,5714
BPPCT 002	0,1154	0,1538	0,4231	0,2308	0,0769			0,7249	0,6848	5	0,4231
BPPCT 041	0,1429	0,6071	0,0714	0,1786				0,5740	0,5298	4	0,6071
BPPCT 023	0,0769	0,2308	0,1538	0,5385				0,6272	0,5758	4	0,5358
BPPCT 026	0,0714	0,4286	0,2500	0,2500				0,6872	0,6293	4	0,4286
BPPCT 034	0,0769	0,3846	0,5385					0,5562	0,4652	3	0,5385
BPPCT 001	0,1429	0,1429	0,1429	0,1429	0,3571	0,0714		0,7857	0,7578	6	0,3571
BPPCT 016	0,0714	0,2857	0,2857	0,3571				0,7014	0,6461	4	0,3571
SCAR-Scal 19	0,4286	0,0714						0,8112	0,8094	2	0,4286
STS-OPA P4	0,1429	0,2500	0,3571	0,2500				0,7270	0,6770	4	0,3571
Média								0,6634	0,6174		

Com relação a variabilidade genética, a identificação de genótipos contrastantes é importante ferramenta para programas de melhoramento, e no presente trabalho, de acordo com o dendograma gerado (Fig. 2) e com os valores de similaridade (tab. 4A), é possível identificar os porta-enxertos mais contrastantes, portanto úteis para o melhoramento, a exemplo de ‘Nagano Wild’ que apesar de ter apresentado galhas, foi considerado imune a *Meloidogyne incognita* (capítulo 1) baseado no fator de reprodução (FR) igual a zero. Em contraste a esse genótipo, com similaridade de 55%, tem-se a cultivar Aldrighi que apresenta boa adaptação as condições climáticas da região de Pelotas-RS. Outro contraste observado, com similaridade de 55%, foi entre ‘Okinawa’, que possui como característica a resistência a *Meloidogyne* spp., com ‘Seleção 0390302’, que por ser descendente de ‘Capdeboscq’ apresenta boa adaptação as condições climáticas da região, e ‘Montclar’ que possui uma boa uniformidade de plantas e vigor das sementes (LORETI, 2008), características essas desejáveis para o melhoramento de porta-enxerto de pessegueiro.

No presente trabalho esperava-se obter um melhor agrupamento entre as cultivares resistentes a nematóides das galhas das raízes, o que não foi verificado, possivelmente ao fato da grande parte dos marcadores identificados nesse trabalho não estarem associados ao referido caractere. Por outro lado, obteve-se um agrupamento próximo entre as cultivares portadoras do caractere coloração avermelhada das folhas, o que indica que alguns dos marcadores utilizado no presente trabalho estão ligados a tal característica.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, pode-se concluir que marcadores codominantes permitem estabelecer com relativa facilidade um padrão molecular de caracterização de genótipos de porta-enxertos de pessegueiro e permite verificar quais genótipos são mais contrastantes para uso em melhoramento genético.

CAPÍTULO 3

CONSTRUÇÃO DE UM MAPA GENÉTICO PRELIMINAR DE UMA POPULAÇÃO SEGREGANTE DE *Prunus persica* ('CAPDEBOSCQ' X 'FLORDAGUARD')

INTRODUÇÃO

O pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch.) tem sido amplamente cultivado no mundo, desde zonas temperadas até zonas subtropicais, sendo um importante membro da família das Rosáceas e tem sido uma cultura com importante atividade econômica (CHENG; HUANG, 2009). É originado da China, onde se tem a mais longa história de pessegueiros cultivados no mundo (HUANG et al., 2008). No Brasil, o cultivo de frutíferas de caroço é realizado principalmente na região Sul e Sudeste, mas é no Rio Grande do Sul (RS) que o cultivo assume maior importância, pois possui aproximadamente 65% da área cultivada com pêssogo do país.

Esse destaque da persicultura gaúcha se deve a contribuição dos programas de melhoramento genético de novas cultivares copa, que possibilitou ampliar o período de colheita e a qualidade das frutas. Mesmo assim, de acordo com Campos (2005), a produtividade média no estado ainda é considerada baixa devido à influência sobre alguns fatores, dentre eles a incidência de pragas e doenças e a falta de porta-enxertos adequados para a cultura. Ao contrário de outros países, no Brasil o melhoramento genético de porta-enxertos para frutíferas de caroço tem assumido importância apenas há poucos anos.

Para melhor explorar a variabilidade genética disponível dentro do gênero *Prunus* e acelerar os trabalhos de melhoramento, a tecnologia de marcadores moleculares tem sido amplamente utilizada na realização de importantes estudos de caracterização genética (BIANCHI et al., 2004a,b; CHENG; HUANG, 2009), construção de mapas genéticos (DIRLEWANGER et al., 2004) e físicos (CLAVERIE et al., 2004), de forma a facilitar a introgressão de genes de interesse agrônomo mediante a seleção assistida por marcadores (SAM), a exemplo dos trabalhos realizados para a resistência a

Meloidogyne spp. (ESMENJAUD et al, 2009; CLAVERIE et al., 2004; DIRLEWANGER et al., 2004; YAMAMOTO; HAYASHI, 2002).

Principalmente em plantas lenhosas, SAM é uma importante estratégia para reduzir os custos e o tempo para selecionar indivíduos portadores de uma determinada característica fenotípica antes mesmo que ela se manifeste, ou seja, a seleção é feita indiretamente através da análise de um caractere correlacionado (marcador molecular) (FALEIRO et al. 2001). Esse método envolve a construção de um mapa genético, onde as características de interesse agrônômico são associadas à marcadores moleculares, a partir de uma população segregante para a(s) característica(s) alvo (CANLI, 2008).

O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética e no melhoramento de plantas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA (1998). Nos últimos anos, com o advento de marcadores com base no DNA, estudos genéticos têm sido muito facilitados e vários mapas genéticos têm sido publicados para *Prunus* (HOWAD et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2001; BLISS et al., 2002; WANG et al., 2002).

O desenvolvimento deste trabalho objetivou verificar se existe ligação de forma similar, entre marcadores moleculares em uma população F₂ segregante ('Capdeboscq' x 'Flordaguard'), ao obtido em outras populações de mapeamento para uso futuro na seleção de novos genótipos resistentes à *Meloidogyne* spp.

MATERIAL E MÉTODOS

Como material vegetal foi utilizado uma população segregante de 40 indivíduos F_2 obtida por autofecundação a partir de um híbrido F_1 derivado 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 aos seis meses de idade das plantas.

As análises moleculares foram realizadas no laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Departamento de Botânica/Instituto de Biologia/UFPel. O DNA foi extraído dos indivíduos parentais, F_1 e F_2 , a partir de amostras contendo 50 mg de folhas frescas usando o método descrito por Doyle e Doyle (1991). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, coletadas para tubos de dois ml juntamente com 900 μ L do tampão de extração (2% CTAB, 1,4M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris pH 8,0, 0,5% Mercaptoetanol, 1% PVP); seguida de incubação em banho-maria por 60 min a 65°C. Depois, em temperatura ambiente, foi adicionado 900 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), centrifugando por 10 minutos a 13.000 rpm. Após centrifugação, 700 μ L de sobrenadante foi coletado para novo tubo com igual volume de etanol absoluto, mantendo a amostra a -20°C por duas horas, para precipitação do DNA. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm, sendo eliminado o sobrenadante. Cada precipitado de DNA foi lavado com 300 μ L de etanol 70%. Para a suspensão final foi utilizado Tampão Tris/EDTA ou TE (10 mM tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) contendo RNase (10 μ g/mL). O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8%, usando como padrão o DNA de Fago *Lambda* digerido com *Hind* III, posteriormente uma solução de trabalho foi diluída para a concentração de 10 ng μ L⁻¹.

A genotipagem da população F_2 foi realizada com primers para oito locos microssatélites da série UDP, da série BPPCT e para o loco STS-OPAP4 (tab 1).

Nas reações de PCR foram utilizados 25 ng de DNA genômico de cada amostra; 2,5 μ l de 10x PCR buffer; 1,7 mM de $MgCl_2$; 0,5 μ M de cada *primer*; 0,2 μ M de dNTP; 0,8U de Taq polimerase (kit Invitrogen) e água Milli-Q para um volume final de 25 μ l. Os *primers* utilizados na reação de PCR estão listados na tab. 1, com suas respectivas temperaturas de anelamento ($T^{\circ}A$).

As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador, da marca BIO-RAD modelo ICYCLER, por 2 ciclos de 94°C por 2 min, 55°C por 1 min, 72°C por 50s, 39 ciclos de 94°C por 50s, 57-60°C por 45s, 72°C por 45s, 1 ciclo de 72°C por 15 min e 4°C por 5 min.

Aos produtos da reação de PCR foram adicionados 10 μ L 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 aliquota de 4,5 μ L de cada amostra amplificada foi aplicada ao gel de poliacrilamida 6%, em tampão TBE 1X a 65 volts, por três horas. Para a visualização das bandas utilizou-se nitrato de prata, segundo o método descrito por Bassam et al. (1991). Os perfis eletroforéticos da população sob análise foram registrados quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas, em cada loco.

O software GQMOL (CRUZ, 2009) foi utilizado para estimar as frequências de recombinação, bem como 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 3 e 1.

Tabela 1. Seqüências de oligonucleotídeos (Primers) e respectivas temperaturas de anelamento (T°A) de *primers* para locos de Microssatélites e STS. FAEM/UFPeL. Pelotas-RS, 2009.

Primers	Seqüência (5' - 3')	T°A	Referência
UDP 96005	F: GTAACGCTCGCTACCACAAA R: CCTGCATATCACCACCCAG	58°C	Cipriani et al. (1999)
UDP 96008	F: TTGTACACACCCTCAGCCTG R: TGCTGAGGTTTCAGGTGAGTG	58°C	Cipriani et al. (1999)
UDP 96013	F: ATTCTTCACTACACGTGCACG R: CCCAGACATACTGTGGCTT	60°C	Cipriani et al. (1999)
UDP 96019	F: TTGGTCATGAGCTAAGAAAACA R: TAGTGGCACAGAGCAACACC	60°C	Cipriani et al. (1999)
UDP 98414	F: AAAAGGCACGACGTTGAAGA R: TTCAGATTGGGAATTTGAAG	58°C	Cipriani et al. (1999)
BPPCT 016	F: GATTGAGAGATTGGGCTGC R: GAGGATTCTCATGATTTGTGC	57°C	Dirlewanger et al. (2002)
BPPCT 026	F: ATACCTTTGCCACTTGCG R: TGAGTTGGAAGAAAACGTAACA	57°C	Dirlewanger et al. (2002)
BPPCT 034	F: CTACCTGAAATAAGCAGAGCCAT R: CAATGGAGAATGGGGTGC	57°C	Dirlewanger et al. (2002)
STS-OPA P4	F: TTAAGACACCCAAACGATTTCA R: TGGGCATTTTGAGGTATCTG	57°C	Yamamoto e Hayashi (2002)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho nove marcadores moleculares e um marcador fenotípico foram avaliados quanto às frequências de recombinação em uma população F_2 segregante ('Capdeboscq' x 'Flordaguard'). Por meio da análise do qui-quadrado (χ^2) os valores de segregação foram significativos apenas entre os marcadores microssatélites (SSR) UDP96-013, BPPCT-026, BPPCT-034 e o marcador fenotípico cor avermelhada das folhas (Gr) (tab. 2). Para esta característica fenotípica houve segregação 3:1, essa mesma relação também foi obtida por Yamamoto et al. (2001), o qual está dentro dos valores esperadas para um caráter dominante.

Os quatro marcadores acima indicados foram agrupados cobrindo uma distância de 27,58 cM (Fig. 1A) enquanto que os outros seis marcadores moleculares não apresentaram ligação, indicando estar em outros cromossomos ou estar a uma distância muito grande entre si, no mesmo cromossomo.

A fig. 1A apresenta as distâncias entre três marcadores de microssatélites e Gr, sob um LOD score de 3. Com a diminuição do LOD score para 1 (Fig. 1B), mais um marcador foi agrupado (UDP96-008), pois quanto mais baixo for o LOD mais saturado será o GL, portanto, mais marcadores serão agrupados.

Os valores de recombinação variaram de 0,026, entre os marcadores UDP96-013 e BPPCT 026, e 0,50 entre Gr e UDP96-013, e UDP96-013 e BPPCT 034 (tab. 2).

Tabela 2. Dados da análise de segregação de marcadores microssatélites e cor da folha obtidos a partir de uma população F_2 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 X ²	Valor de recombinação com Gr*	Valor de recombinação com UDP96-13	Valor de recombinação com BPPCT26
	Flordaguard	Capdeboscq						
Red Leaf (Gr)	Gr*	gr	Gr	32:8	7,20	-	-	-
UDP96-13	AA	AB	AA	36:2	15,21	0,50	-	-
BPPCT-26	BC	AC	CC	2:1:36	15,70	0,256	0,026	-
BPPCT-34	AB	BB	AB	0:36	18,00	0,194	0,50	0,056

* Gr = Fenótipo cor vermelha da folha.

Fenótipo dos pais para cor da folha - Capdeboscq (gr) x Flordaguard (Gr).

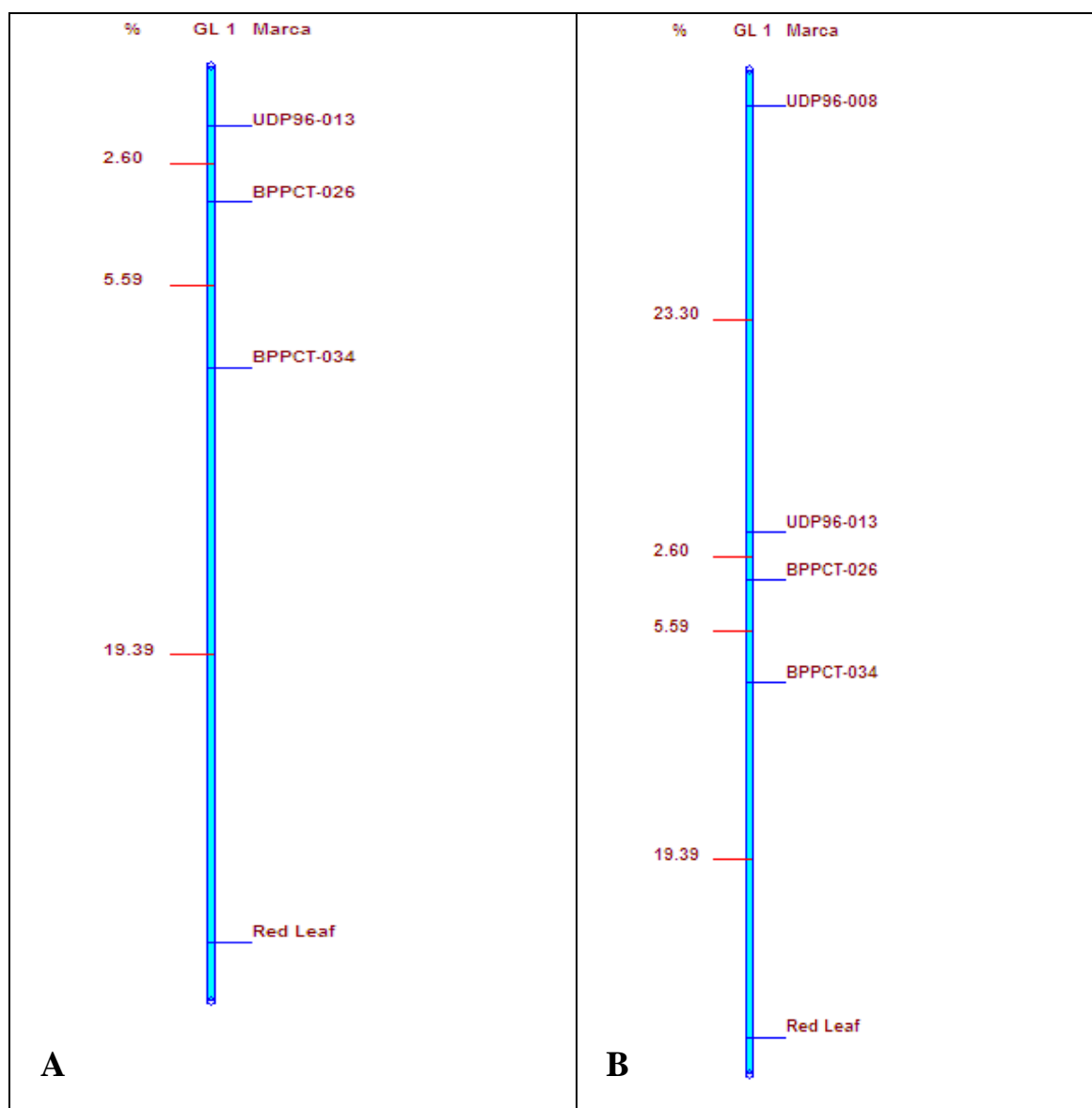


Figura 1. Representação da ligação entre três (A) e quatro (B) marcadores de microssatélites e o caractere cor vermelha da folha, obtido de uma população F_2 segregante ('Capdeboscq' x 'Flordaguard'). Valor máximo de recombinação 30% e valor mínimo do LOD 3 (A) e LOD 1 (B). FAEM/UFPel. Pelotas-RS, 2009.

Verificou-se que os marcadores mais fortemente ligados foram UDP96-013 e BPPCT-026, a 2,6 cM, conforme demonstrado na Fig. 1. No mapa de ligação para o porta-enxerto GxN22, elaborado por Dirlewanger et al. (2004), esses dois marcadores foram localizados em grupos de ligação (GL) diferentes, dois e cinco, respectivamente (Anexo A e B). Neste trabalho, esperava-se por uma ligação mais forte entre UDP96-013 e BPPCT-034, ambos localizados no GL 2 de GxN22 (Anexo A), 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', estando a uma distância de 9,8 cM de UDP96-013. A distância entre esses dois marcadores, no mapa de ligação de GN22, foi superior ao encontrado nesse trabalho (8,19cM).

No presente trabalho, 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 GL 6 (Anexo B) (DIRLEWANGER et al., 2004), essas diferenças em relação aos dados de outros autores, possivelmente se deve a origem dos parentais.

'Flordaguard' é um porta-enxerto que vem sendo testado no Brasil devido a sua resistência a *Meloidogyne* spp., que é herdada de 'Okinawa'.

A cultivar 'Capdeboscq' tem sido largamente utilizada como porta-enxerto, devido a sua adaptação ao clima do Rio Grande do Sul, a boa porcentagem de germinação das sementes e vigor das plantas, porém é suscetível a *Meloidogyne* spp., Por sua vez, 'GxN22' tem como ancestral o porta-enxerto '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, fato que justifica essa diferença de associação de marcadores. Além disso, as diferenças podem ter sido geradas por eventos de translocações recíprocas no genoma, conforme verificado nos GL 6 e GL 8 de GxN22 (DIRLEWANGER et al., 2004).

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. Baseado nisso, em 2003, na Universidade Federal de Pelotas, deu-se início a um projeto de seleção de novos porta-enxertos para frutíferas de caroço, buscando resistência a nematóides, baixo vigor e melhor adaptação as condições do clima local (BIANCHI et al. 2002), onde realizou-se cruzamentos entre porta-enxertos, e estes novos híbridos encontram-se em fase de avaliação.

Essas avaliações incluem também realização da fenotipagem para identificação de genótipos resistentes a *Meloidogyne* spp. 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. Outra alternativa para utilização dos marcadores moleculares é no mapeamento comparativo que, de acordo com Carneiro e Vieira (2002), é uma estratégia para obtenção de mapa de referência dentro das espécies vegetais cultivadas, ou pelo menos ao nível de famílias taxonômicas.

Os dados gerados no presente trabalho, representam o passo inicial para a identificação de marcadores potencialmente úteis para auxiliar no desenvolvimento de novos porta-enxertos de *Prunus* com características agronômicas desejadas, fazendo uso da SAM.

CONCLUSÃO

Com base nos mapas moleculares para *Prunus* spp. disponíveis na literatura e a partir dos resultados obtidos no presente trabalho, 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.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos no presente trabalho verifica-se que porta-enxertos de pessegueiro tem reações diferentes a *Meloidogyne incognita*, confirmado os dados da literatura em que os genes controladores dessas resistências possuem diferentes fontes. Dentro do gênero *Prunus*, as duas principais fontes de resistência a *Meloidogyne* spp. são ‘Nemaguard’ e ‘Okinawa’, sendo assim trabalhos futuros podem ser direcionados para a criação de genótipos híbridos buscando incorporar essas fontes de resistência em um único cultivar, pelo processo de piramidação gênica. Outra alternativa importante é a produção de híbridos interespecíficos com *P. cerasifera* e *P. mume*, que são considerados as fontes de resistência de mais amplo espectro a *Meloidogyne* spp., inclusive buscando produzir genótipos resistentes a fitonematóides de outros gêneros.

Muito embora, a tecnologia de marcadores moleculares seja uma estratégia importante para auxiliar no processo de seleção de novos genótipos, a fenotipagem dos porta-enxertos, fonte de resistência, são de fundamental importância e necessária para estabelecer a correta resposta de reação a diferentes isolados de fitonematóides. Entretanto, esta etapa exige infraestrutura adequada, grande demanda de mão-de-obra e recursos financeiros, dificultando sua execução.

Em genótipos de *Prunus* spp., a técnica de microssatélites (SSR) permite a fácil diferenciação entre as cultivares (análise de fingerprinting), devido a alta repetibilidade dos resultados e também pela quantidade de polimorfismos gerados entre os porta-enxertos analisados, características importantes para o uso na certificação do material vegetal. O controle da idoneidade genética pode ser realizada de maneira rápida e eficiente através da utilização de marcadores moleculares de SSR, quando comparados a análises das características morfofenológicas.

REFERÊNCIAS

AFFONSO, L. B.; BIANCHI, V. J.; CAPPELLARO, T. H.; FACHINALLO, J. C. Caracterização genética de porta-enxertos de pessegueiro para uso em programas de melhoramento genético. In: XIV Congresso de Iniciação Científica e VII Encontro de Pós-Graduação, 2005, Pelotas. **Anais...**, Pelotas, 2005. p.1-4.

AGRIANUAL: Anuário de agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2008. 409p.

ARANZANA, M.J., GARCIA-MAS, J., CARBÓ, J., ARÚS, P., Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. **Plant Breeding**, Berlin, v. 121, 87–92. 2002.

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

BERNARDO, R. Breeding for quantitative traits in plants. Woodbury: **Stemma Press**, 2002, 360p.

BERTAN, I.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; VIEIRA, E. A.; HARTWIG, I.; SILVA, J. A. G.; SHIMIDT, D. A. M.; VALÉRIO, I. P.; BUSATO, C. C.; RIBEIRO, G. Comparação de métodos de agrupamento na representação da distância morfológica entre genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 3, p. 279-286, 2006.

BIANCHI, V. J; FACHINELLO, J. C. Certificação Genético-Sanitária de Mudás. In: **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF.: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. v. 1. p. 175-205.

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

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

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, 5, 2003, Pelotas. **Anais...**, Pelotas, 2003, p. 313.

BIANCHI, V. J; RADMANN, E. B.; ANTHONISEN, D.; FACHINELLO, J. C. Avaliação genético-molecular intra e intervarietal de porta-enxertos de *Prunus* spp. In. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 1. **Resumos e Palestras...**, Pelotas, 2005. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 85-89, 2005b.

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

BLISS, F. A.; ARULSEKAR, S.; FOOLAD, M.R.; BECERRA, V.; GILLEN, A.M.; WARBURTON, M.L.; DANDEKAR, A.M.; KOCSISNE, G.M.; MYDIN, K.K. An expanded genetic linkage map of *Prunus* based on an interspecific cross between almond and peach. **Genome**, Ottawa, 45: 520–529, 2002.

BORÉM, A., CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 374p.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLMICK, H. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.

BOUHADIDA M.; CASAS, A. M.; GONZALO, M. J.; ARÚS, P.; MORENO, M. A.; GOGORCENA, Y. Molecular characterization and genetic diversity of *Prunus* rootstocks. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 120, p. 237-245, 2009.

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.

CANLI, F. A. Progress in genetic mapping of *Prunus* species. Erciyes **Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, Isparta, 24 (1-2) 414 – 424, 2008.

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

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides das galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**. Brasília, v. 25, n.1, p. 35-44, 2001.

CARNEIRO, S. M.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 2, p.89-100. 2002.

CENTELLA-QUEZADA, A. **Desenvolvimento e implantação da técnica de propagação por segmentos nodais na cultura de tecidos na produção do pessegueiro.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000. 37 p. Relatório de Consultoria PCT/IICA PRODETAB.

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., PETERLUNGER, E., e TESTOLIN, R. 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.; VOISIN, R.; LAFARGUE, B.; POIZAT, C.; KLEINHENTZ, M.; LAIGRET, F.; DIRLEWANGER, E.; ESMENJAUD, D. 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. **Princípios de genética quantitativa**. Viçosa: UFV, 2005, 394 p.

CRUZ, C. D. **Programa GENES**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 1997. 442 p.

CRUZ, C. D. Programa para análises de dados moleculares e quantitativos - **GQMOL**. (2009) Viçosa: UFV. Software em desenvolvimento, disponível em “<http://www.ufv.br/dbg/genes/gdown.htm>”. Acessado em maio de 2009.

CRUZ, C. D.; VIANA, J. M. S. A methodology of genetic divergence analyses based on sample unit projection on two-dimensional space. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 1, p. 69-73, 1994.

DIRLEWANGER, E.; COSSON, P.; HOWAD, W.; CAPDEVILLE, G.; BOSSELUT, N.; CLAVERIE, M.; VOISIN, R.; POIZAT, C.; LAFARGUE, B.; BARON, O.; LAIGRET, F.; KLEINHENTZ, M.; ARÚS, P.; ESMENJAUD, D. 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.; ARANZANA, M. J.; POIZAT, C.; ZANETTO, A.; ARÚS, P.; LAIGRET, F. 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**, Gaithersburg, v. 1, p.13-15, 1991.

ESMENJAUD, D.; MINOT, J. C.; VOISIN, R.; PINOCHET, J.; SIMARD, M. H.; SALESSES, G. Differential response to root-knot nematodes in *Prunus* species and correlative genetic implications. **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 29, n. 3, p. 370-380. 1997.

ESMENJAUD, D.; VOISIN, R.; Van GHELDER, C.; BOSSELUT, N.; LAFARGUE, B.; DI VITO, M.; DIRLEWANGER, E.; POESSEL, J.L.; KLEINHENTZ, M. 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.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF.: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. v. 1. 221 p.

FALEIRO, F. G. KARIA, C. T.; ANDRADE, R.P. Análises do DNA auxiliam os trabalhos de melhoramento genético de forrageiras. **Jornal do Fazendeiro**, Goiânia, Ano 23, n. 188. 2005. p.10. (Artigo técnico).

FALEIRO F.G.; SCHUSTER I.; RAGAGNIN V.A.; CRUZ C.D.; CORRÊA R. X.; MOREIRA M. A.; BARROS E. G. Caracterização de linhagens endogâmicas

recombinantes e mapeamento de locos de características quantitativas associados a ciclo e produtividade do feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 38, n.12, p. 1387-1397, Brasília, 2003.

FALEIRO, F.G.; YAMADA, M.M.; MELO, G.R.P.; ARAÚJO, I.S.; LOPES, U.V.; PIRES, J.L.; SANTOS, R.C.; FALEIRO, A.S.G. Avaliação de características quantitativas, morfológicas, moleculares e de resistência a doenças visando o mapeamento genético do cacauieiro (*Theobroma cacao* L.). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47, **Resumos...** Águas de Lindóia, 2001.

FERGUSON, J.; CHAPARRO, J. **Rootstocks for Florida Peaches, Nectarines, and Plums**. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/HS366>>. Acessado em 03 de maio de 2009.

FERNÁNDEZ, C.; PINOCHET, J.; ESMENJAUD, D.; SALETTES, G.; FELIPE, A. Resistance among new *Prunus* rootstocks and selections to root-knot nematodes in Spain and France. **HortScience**, Alexandria, v. 29, n. 9, p. 1064-1067. 1994.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA- CENARGEN, 1998. 220 p.

FINARDI, N. L. Descrição e método de propagação de porta-enxertos. In: **Pêssego. Produção**. RASEIRA, M.C.B.; QUEZADA, A.C., ed., CPACT. Brasília: Serviço de Produção de Informações, 2003. 162p. (Frutas do Brasil, 49).

GOMES, C. B; CAMPOS, A. D. Nematóides. In: **Pêssego. Produção**. RASEIRA, M.C.B.; QUEZADA, A.C., ed., CPACT. Brasília: Serviço de Produção de Informações, 2003. 162p. (Frutas do Brasil, 49).

HERTER, F.G.; SACHS, S.; FLORES, C.A. Condições edafo-climáticas para instalação do pomar. In: Medeiros, J. & Raseira, M.C.B. **A cultura do pessegueiro**, Pelotas: Embrapa CPACT, p. 20-28, 1998.

HOWAD, W., YAMAMOTO, T., DIRLEWANGER, E., TESTOLIN, R., COSSON, P., CIPRIANI G., MONFORTE, A. J., GEORGI, L., ABBOTT, A. G.; ARÚS, P. Mapping with a few plants: using selective mapping for microsatellite saturation of the *Prunus* reference map. **Genetics**, 171: 1305–1309, 2005.

HUANG, H.W., CHENG, Z.P., ZHANG, Z.H., WANG, Y. History of cultivation and trends in China. In: Layne, D.R. (Eds.), **The Peach: Botany, Production and Uses** (chapter 2). CABI, Wallingford, Oxfordshire, UK, 2008.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparasion of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp, including a new technique. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 57, n. 12, p.1025-1028,1973.

LEDBETTER, C. Screening *Prunus* Rootstock for Nematode Resistance. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/is/np/mba/jan97/screen.htm>>. Acesso em 02 de maio de 2009.

LECOULS, A. C.; RUBIO-CABETAS, M. J.; MINOT, J. C.; VOISIN, R.; BONNET, A.; SALESES, G.; DIRLEWANGER, E.; ESMENJAUD, D. RAPD and SCAR markers linked to the Ma1 root-knot nematodes resistance gene in Myrobalan plum (*Prunus cerasifera* Ehr.). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 99, p. 328-335. 1999.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a nucleotide repeat within the cardiac muscleaction gene. **Annual Journal Human Genetics**. Boston, v.44, n.3, p.397-401,1989.

LORETI, F. Portinnesti e propagazione. In: Il Pesco: Moderni indirizzi di allevamento, coltivazione, difesa, irrigazione, nutrizione, conservazione, transormazione e mercado. FIDEGHELLI, C.; SANSAVINI, S. **Edagricole**, Bologna, p. 69-114, 2005.

LORETI, F. Porta-enxertos para a cultura do pessegueiro do terceiro milênio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 274-284, 2008.

LU, Z. X.; SOSSEY-ALAOUI, G. L.; REIGHARD, G. L.; BAIRD, W. V.; ABBOTT, A. G. 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.

MAUCH, C.H.; MAUCH, N.; FINARDI, N.L. Reações de pessegueiros e da ameixeira ao nematóide das galhas *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.15, n.1, p.59-67, 1991.

MAYER, N. A.; PEREIRA, F. M.; BARBOSA, J. C. Pegamento e crescimento inicial de enxertos do pessegueiro 'Aurora-1' em clones de umezeiro (*Prunus mume* Sieb. Et Zucc.) e 'Okinawa' [*Prunus persica* (L.) Batsch] propagados por estacas herbáceas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 102-106, 2005a.

MAYER, N.A.; PEREIRA, F.M.; SANTOS, J.M. 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.; PEREIRA, F. M.; SANTOS, J. M. 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, 2005b.

McCOUCH, S.R.; TEMNYKH, S.; LUKASHOVA, A.; COBURN, J.; DECLERCK, G.; CARTINHOUR, S.; HARRINGTON, S.; THOMSON, M.; SEPTININGSI, E.; SEMON M.; MONCADA, P.; JIMING, L. Microsatellite markers in rice: Abundance, diversity and applications. In: **Rice Genetics IV**. IRRI. Manila, Philippines, p.117-135, 2001.

MENTEN, J.O.M.; LORDELLO, L.G.E.; CAMPO DALL'ORTO, F.A.; OJIMA, M.; RIGITANO, O. Resistência varietal de pessegueiro (*Prunus persica* Batsch) aos nematóides *Meloidogyne incognita* e *M. arenaria*. In: REUNIÃO DE

NEMATOLOGIA, 2, 1977, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Franciscana, 1977. v.2, n. 2, p. 186-174.

MOTA, M. S. **Caracterização molecular de alelos-S e de locos de microssatélites em *Prunus salicina* (Lindl.)**. Pelotas. 2008. 49p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Faculdade de Agronomia 'Eliseu Maciel', Universidade Federal de Pelotas.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mendelingen Landbouwhogeschool Wageningen**, v.66, p.1- 46, 1966.

PANCALDI, M.; VINATZER, B.; SANSAVINI, S.; CIPRIANI, G.; TESTOLIN, R. Approccio multi-analitico al "fingerpriting" del pesco e del susino. **Atti del Convegno Nazionale su "Biodiversità: germplasma locale e sua valorizzazione"**, 4, C. Delfino: Alghero, 8-11, p.605-610, 1998.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. B. **Genética na agropecuária**. 5. ed. São Paulo: Globo, 1996.

RASEIRA, M. do C.B.; NAKASU, B.H. Pessegueiro. In: BRUCKNER, C.H. **Melhoramento de fruteiras de clima temperado**. Viçosa: UFV, 2002. p.89-126.

ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A.C. ed. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, p. 329-380, 1998.

ROHLF, F.J. **NTSYS.PC**. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1 New York: Exeter Publications, 2000.

ROSSI, C.E; FERRAZ, L.C.C.B.; MONTALDI, P.T. Resistência de frutíferas de clima subtropical e temperado a *Meloidogyne incognita* raça 2 e *M. javanica*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.43-49, 2002.

SALESSES, G.; FELIPE, A.; ESMENJAUD, D.; PINOCHET, J.; FERNÁNDES, C. Avances en la selección de patrones de frutales de hueso frente a nematodos agalladores. **Fruticultura Profesional**, Barcelona, n.71, p.28-44, 1995.

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.

SHERMAN, W.B.; LYRENE, P.M.; SHARPE, R. H. Flordaguard peach rootstock. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 4, p. 427-428. 1991.

SIDRA – Sistema IBGE de Recuperação Automática. Desenvolvido pelo instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: www.sidra.ibge.gov.br. Acessado em 12 de agosto de 2008.

SILVA, J. A. G.; CARVALHO, F. I. F.; HARTWIG, I.; CAETANO, V. R.; BERTAN, I.; MAIA, L. C.; SCHIMIDT, D. A. M.; FINATTO, T.; VALÉRIO, I. P. Distância morfológica entre genótipos de trigo com ausência e presença do caráter “stay-green”. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 5, p. 1261-1267, 2007.

SIMÃO, S. **Tratado de fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 760p.

SCHERB, C. T.; CAMPOS, V. P.; CHALFUN, N.N.J.; Penetração e reprodução de *Meloidogyne incognita* em pessegueiro das variedades Okinawa e R-15-2. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 16, n. 1, p.134-138, 1994.

SHERMAN, W.B.; LYRENE, P.M.; SHARPE, R. H. Flordaguard peach rootstock. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 4, p. 427-428. 1991.

SOSINSKI, B., GANNAVARAPU, M., HAGER, L.D., BECK, L.E., KING, G.J., RYDER, C.D., RAJAPAKSE, S., BAIRD, W.V., BALLARD, R.E., ABBOT, A.G. Characterization of microsatellite in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg. V. 97, p.1034–1041, 2000.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)**. Raleigh, NC: Cooperativo Publication Department of Plant pathology, North Carolina State University/U.S. Agency International Division, 1978. 111p.

TESTOLIN, R.; MARRAZZO, T.; CIPRIANI, G.; QUARTA, R.; VERDE, I.; DETTORI, M.T.; PANCALDI, M.; SANSAVINI, S. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. **Genome**, Ottawa, v.43, p.512-520, 2000.

VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. V. et al.. Marcadores moleculares em estudos de caracterização de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.): o sabor. **Ciência Rural**, Santa Maria, vol.32, no.3, p.415-420, 2002.

VINATZER, B.; PANCALDI, M.; SANSAVINI, S. Potenzialità e limiti del “fingerprinting” nell’identificazione varietale del pesco. **Frutticoltura**, Bologna, n. 4, p. 97-101, 1999.

WANG, Y.; GEORGI, L. L.; REIGHARD, G. L.; SCORZA R.; ABBOTT, A. G. Genetic mapping of the evergrowing gene in Peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] **The Journal of Heredity**, Washington, v. 93, n.5, 2002.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant Class of Human DNA Polymorphisms Which Can be Typed Using the Polymerase Chain-Reaction. **American Journal of Human Genetics**, Boston, v.44, n.3, p.388-396, 1989.

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.

YAMAMOTO, T.; SHIMADA, T; IMAI, T.; YAEAGAKI, H.; HAJI, T. Characterization of morphological traits based on a genetic linkage map in peach. **Breeding Science**, Tokyo, v. 51, p. 271-278, 2001.

APÊNDICE

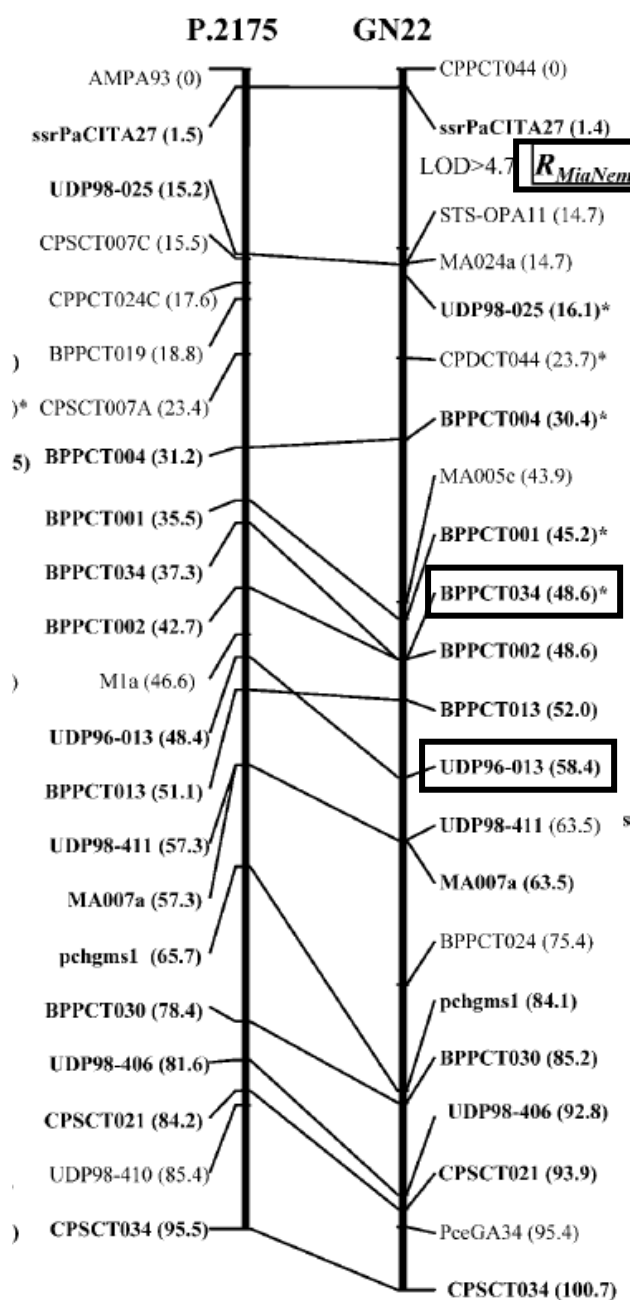
Tabela 4A. Similaridade genética de 14 porta-enxertos de pessegueiro, estimados pelo *Coeficiente Simple Matching*, a partir de marcadores SSR. FAEM/UFPel. Pelotas-RS, 2009.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	1.0000													
2	0.7384	1.0000												
3	0.6470	0.7692	1.0000											
4	0.6133	0.5833	0.6133	1.0000										
5	0.6933	0.6388	0.6933	0.7073	1.0000									
6	0.6666	0.8194	0.8133	0.6463	0.7195	1.0000								
7	0.6266	0.5972	0.6533	0.5975	0.7195	0.6829	1.0000							
8	0.5857	0.6119	0.6428	0.5844	0.6103	0.6233	0.6753	1.0000						
9	0.6000	0.5694	0.6533	0.5975	0.6951	0.6585	0.9268	0.6753	1.0000					
10	0.7066	0.6428	0.6849	0.5750	0.6000	0.7250	0.6125	0.6400	0.6375	1.0000				
11	0.6800	0.6571	0.6986	0.5875	0.6625	0.7375	0.6000	0.5866	0.5500	0.7125	1.0000			
12	0.7200	0.8142	0.7945	0.6000	0.6750	0.8250	0.6875	0.6000	0.6625	0.7250	0.6625	1.0000		
13	0.6666	0.8000	0.7945	0.5500	0.6250	0.7750	0.6125	0.6266	0.5875	0.7000	0.7125	0.7750	1.0000	
14	0.7200	0.7285	0.7123	0.5500	0.6000	0.7750	0.6375	0.6133	0.6125	0.8250	0.7375	0.7500	0.8250	1.0000

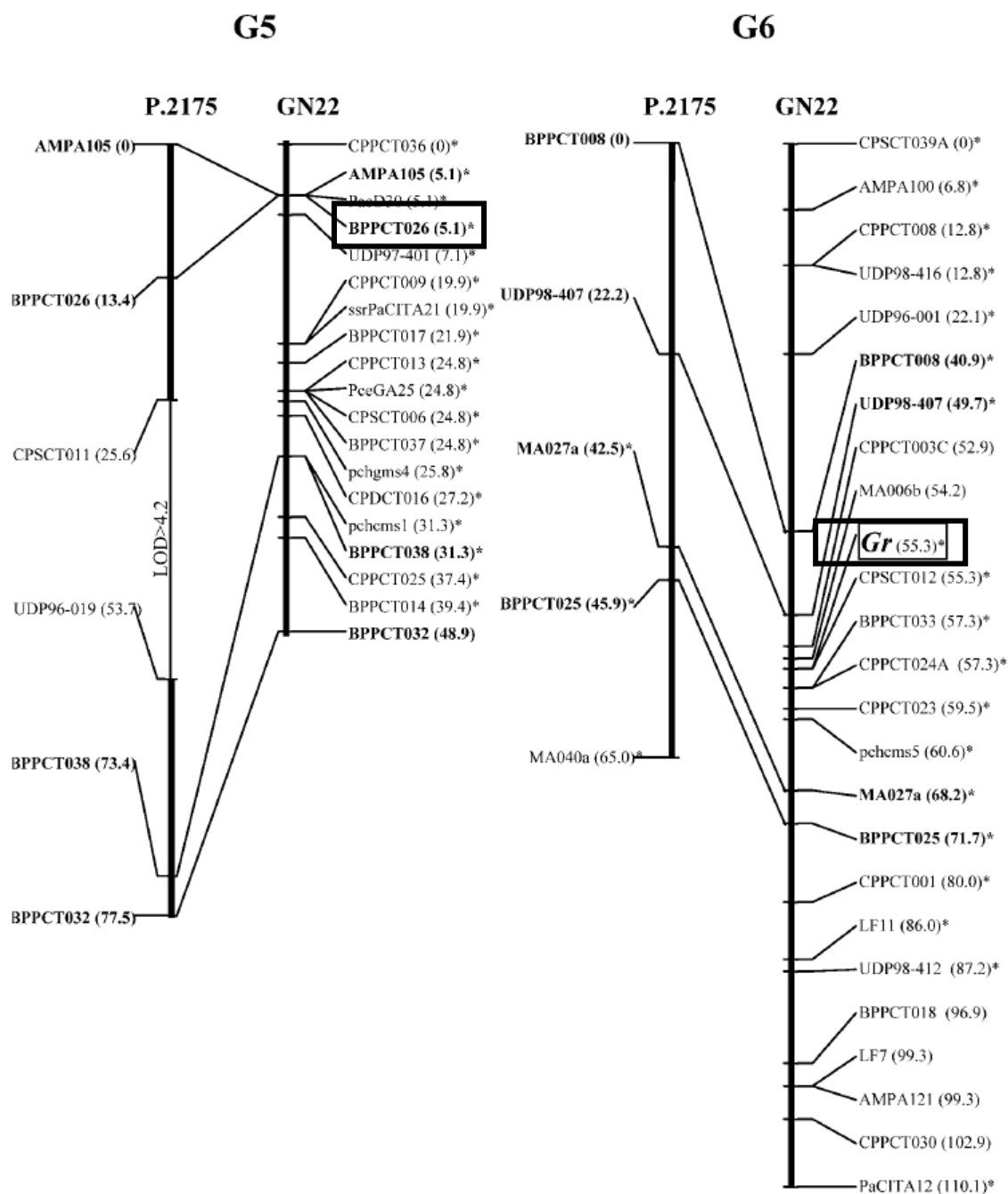
1-Nemaguard; 2-Nemared; 3-Flordaguard; 4-UFPel-0402; 5-Okinawa; 6-Tsukuba; 7-Kutoh; 8-Ohatsumomo; 9- Nagano Wild; 10-Capdeboscq; 11-Aldrichi; 12-Rubira; 13- Montclar; 14-Seleção 0390302

ANEXOS

G2



Anexo A. Grupo de ligação 2 (G2) do mapa genético obtido entre ameixeira Mirabolano (P2175) x amêndoa-pêssego (GN22), onde se localiza os marcadores BPPCT 013 e BPPCT 034, em GN22. Dirlewanger et al. (2004).



Anexo B. Grupo de ligação 5 e 6 (G5 e G6) do mapa genético obtido entre ameixeira Mirabolano (P2175) x amêndoa-pêssego (GN22), onde se localiza o marcador BPPCT 026 (G5) e o marcador fenotípico para cor da folha (Gr) (G6), em GN22. Dirlewanger et al. (2004).