

ESTRATÉGIA DE SAM PARA ANÁLISE DE NOVOS PORTAENXERTOS DE *PRUNUS* RESISTENTES A *Meloidogyne* spp.

LUÍSA FANCELLI COELHO¹, ELSA KUHN KLUMB², ILISANDRA ZANANDREA²,
DAIANE DE PINHO BENEMANN², VALMOR JOÃO BIANCHI³

¹ Instituto de Biologia – Universidade Federal de Pelotas – fancelli_luisa@hotmail.com

² Instituto de Biologia – Universidade Federal de Pelotas

³ Instituto de Biologia – Universidade Federal de Pelotas – valmorjb@yahoo.com

1. INTRODUÇÃO

A produção de pêssegos no Brasil e principalmente no Rio Grande do Sul tem crescido anualmente, e o Estado destaca-se por ser o maior produtor nacional, obtendo uma produção de aproximadamente 132.736 toneladas em 13.514 hectares de área cultivada (IBGE, 2012), entretanto, apresenta a menor produtividade média do país.

A importância dessa cultura no Brasil ainda contrasta com grande a necessidade de investimentos em novas tecnologias que contribuam para o aumento da produtividade (MAYER & PEREIRA, 2010). Entre os fatores associados à baixa produtividade, podemos destacar a falta de qualidade genética e sanitária, falta de portaenxertos adequados às condições edafoclimáticas da região Sul e resistência a fitopatógenos do sistema radicular.

Os fitonematóides causadores de galhas pertencem ao gênero *Meloidogyne* e estão entre os parasitas que causam os maiores danos em frutas de caroço em todo o mundo (CLAVERIE et al., 2011), pois possuem alta taxa reprodutiva e causam entre outros danos a redução do vigor das plantas e do tamanho dos frutos, diminuem a produtividade e a longevidade dos pomares. Portanto, a utilização de portaenxertos resistentes é a forma mais efetiva e econômica para evitar danos por *Meloidogyne* spp., e pode ser especialmente importante no estabelecimento inicial e na vida produtiva do pomar, em áreas com histórico de ocorrência destes patógenos (SALESSES et al., 1998), uma vez que no Brasil não existem nematocidas registrados para a cultura do pessegueiro.

Considerando que a fenotipagem de genótipos de *Prunus* para resistência nematoides é uma tarefa difícil e que demanda muito tempo, o uso de marcadores moleculares associados a resistência se constitui uma importante ferramenta para desenvolver a seleção assistida por marcadores (SAM), afim de acelerar o processo de melhoramento, bem como verificar a qualidade genética do material vegetal, para uso comercial e em cruzamento controlados.

Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi de verificar o uso prático de um marcador molecular do tipo STS (Sequence-tagged Site), associado a resistência a *Meloidogyne* spp., na avaliação do polimorfismo de portaenxertos de *Prunus* spp. contrastantes para a esta característica.

2. METODOLOGIA

O material vegetal utilizado no experimento constou das seguintes cultivares e seleções produzidas pelo Programa de Melhoramento de Portaenxertos da UFPEl: genótipos resistentes a *Meloidogyne* spp. (Okinawa, Okinawa Homozigoto, Tsukuba 2, GxN9, Barrier, Ishtara, Julior e RN_0250606) e genótipo suscetível (Piazito) (PAULA et al., 2011).

A extração de DNA foi realizada conforme protocolo de Doyle; Doyle (1987) utilizando folhas jovens completamente expandidas. A quantificação e a qualidade do DNA foram realizadas por eletroforese em gel de agarose 1,0%. O par de primers (STS - NRsauF2- 5'ATGAATCAAGCAGCCGATG3'/ NRSauR2- 5'ATGAATGCTGCTTTGATATAAACT3'), cujo polimorfismo está associado à presença de um sítio de restrição *Sau3A I* (GATC) no genótipo suscetível e ausência no genótipo resistente (GTTC) a *Meloidogyne* spp. (LU et al., 1999), foi utilizado para as reações de PCR.

Os produtos de PCR foram obtidos com as seguintes condições: 50 ng de DNA, 1,0 U de Taq polimerase (Invitrogen), 0,5 µM de cada primer (Forward and Reverse), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ e 2,5 µL de tampão 10X, em um volume final de 25 µL. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador modelo ICycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) com a seguinte programação: 4 min a 94 °C seguido de 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 53°C, e 45 s a 72 °C e um ciclo final de 5 min a 72 °C.

Os produtos da amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, e o tamanho dos fragmentos estimados por comparação com DNA Ladder 100 bp (Invitrogen). Confirmada a amplificação, uma alíquota do produto de PCR foi enviada diretamente para sequenciamento.

Realizou-se comparação das sequências no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e no genoma de referência de Rosaceas - GDR (<http://www.rosaceae.org>), para confirmar a localização e a homologia do fragmento, seguido do alinhamento e comparação com as sequências obtidas por clonagem, descritas por Lu et al. (1999), utilizando o software MEGA 6 (TAMURA et al., 2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme esperado, o produto da amplificação com o par de primer STS-NRsauF2/NRSauR2 produziu um fragmento de aproximadamente 180 pb, ou seja, inferior que a sequência do genótipo de referência suscetível (Ps_Lovell 217pb) (Tabela 1). Verificou-se uma homologia superior a 97% para todas as sequências avaliadas. Conforme descrito anteriormente, a cultivar resistente de referência é 'Pr_Nemaguard', que possui a sequência GTTC, e 'Ps_Lovell' é suscetível e possui a sequência GATC. Dentre os genótipos resistentes a *Meloidogyne* spp., 'RN_0250606', 'GxN9', 'Barrier' e 'Ishtara' apresentaram a sequência compatível com 'Pr_Nemaguard' (GTTC), confirmando a presença do mesmo alelo. Por sua vez, 'Piazito' que é uma cultivar suscetível, apresentou a sequência compatível contendo o sítio de restrição (GATC), correspondente ao genótipo suscetível de referência 'Ps_Lovell'.

Entretanto, 'Okinawa', 'Okinawa Homozigoto' e 'Tsukuba 2', embora sejam genótipos resistentes a *Meloidogyne*, apresentaram o sítio de restrição (GATC) compatível com o genótipo suscetível, portanto se tratam de genótipos recombinantes para este marcador. Tal resultado pode estar associado ao fato da fonte de resistência presente nestes três genótipos ser diferente daquela encontrada em 'Nemaguard' e seus descententes, fato que corrobora os resultados obtidos por LU et al. (1999), sendo um indicativo de que existem diferentes genes de resistência a *Meloidogyne* spp. em *Prunus*, que podem ser usadas no melhoramento (YAMAMOTO; HAYASHI, 2002; GILLEN; BLISS, 2005).

'RN_0250606' que é um cruzamento de 'Nemared' x 'Flordaguard', e apresenta a sequência resistente, a qual foi herdada de 'Nemared' (seedling F3 de 'Nemaguard'), também descrito por LU et al. (2000) como resistente.

Peach_NCBI	ACACC CAAGGACTTC	ATGAATCAAG	CAGCCGATGA	CTATATATAA	GGTACATGCA	GTAGTTTGGG	GCTTATCATG
Ps_Lovell	CAATAACACC CAAGGACTTC	ATGAATCAAG	CAGCCGATGA	CTATATATAA	GGTACATGCA	GTAGTTTGGG	GCTTATCATG
Pr_Nemaguard	CAATAACACC C-AGGACTTC	ATGAATCAAG	CAGCCGATGA	CTATATATAA	GGTACATGCA	GTAGTTTGGG	GCTTATCATG
Okinawa	—————	ATGAATCAAG	CAGCCGATGA	CTATATATAA	GGTACATGCA	GTAGTTTGGG	GCTTATCATG
Okinawa_Homozigoto	—————	ATGAATCAAG	CAACCGATGA	CTATATATAA	GGTACATGCA	GTAGTTTGGG	GCTTATCATG
Tsukuba_2	——AACAC- CAAGGACTTC-	ATGAATCAAG	CAGCCGATGA	CTATATATAA	GGTACATGCA	GTAGTTTGGG	GCTTATCATG
Piazito	—————TT-	ATGAATCAAG	CGGCCGATGA	CTATATATAA	GGTACATGCA	GTAGTTTGGG	GCTTATCATG
RN_0250606	—————CT-	ATGAATCAAG	CGGCCGATGA	CTATATATAA	GGTACATGCA	GTAGTTTGGG	GCTTATCATG
GxN9	—————	ATGAATCAAG	CAGCCGATGA	CTATATATAA	GGTACATGCA	GTAGTTTGGG	GCTTATCATG
Barrier	—————	ATGAATCAAG	CAGCCGATGA	CTATATATAA	GGTACATGCA	GTAGTTTGGG	GCTTATCATG
Ishtara	—————	TGAATCAAG	CCGCCGATGA	CTATATATAA	GGTACATGCA	GTAGTTTGGG	GCTTATCATG
Julior	—————	TTTAAACAAG	GCCCCGATGG	CCATATTTAA	GGGACAAGCC	GTAGTTTGGG	GCGTATCATG
Continuação							
Peach_NCBI	CTTCCTAGAA TTTATAGTGA	ATCTTGGATC	TCACTGAAAT	TTATAATGCA	TTCTTAGGTA	CCAAACAGAG	TGCAATTGTG
Ps_Lovell	CTTCCTAGAA TTTATAGTGA	ATCTTGGATC	TCACTGAAAT	TTATAATGCA	TTCTTAGGTA	CCAAACAGAG	TGCAATTGTG
Pr_Nemaguard	CTTCCTAGAA TTTATAGTGA	ATCTTGGATC	TCACTGAAAT	TTATAATGCA	TTCTTAGGTA	CCAAACAGAG	TGCAATTGTG
Okinawa	CTTCCTAGAA TTTATAGTGA	ATCTTGGATC	TCACTGAAAT	TTATAATGCA	TTCTTAGGTA	CCAAACAGAG	TGCAATTGTG
Okinawa_Homozigoto	CTTCCTAGAA TTTATAGTGA	ATCTTGGATC	TCACTGAAAT	TTATAATGCA	TTCTTAGGTA	CCAAACAGAG	TGCAATTGTG
Tsukuba_2	CTTCCTAGAA TTTATAGTGA	ATCTTGGATC	TCACTGAAAT	TTATAATGCA	TTCTTAGGTA	CCAAACAGAG	TGCAATTGTG
Piazito	CTTCCTAGAA TTTATAGTGA	ATCTTGGATC	TCACTGAAAT	TTATAATGCA	TTCTTAGGTA	CCAAACAGAG	TGCAATTGTG
RN_0250606	CTTCCTAGAA TTTATAGTGA	ATCTTGGATC	TCACTGAAAT	TTATAATGCA	TTCTTAGGTA	CCAAACAGAG	TGCAATTGTG
GxN9	CTTCCTAGAA TTTATAGTGA	ATCTTGGATC	TCACTGAAAT	TTATAATGCA	TTCTTAGGTA	CCAAACAGAG	TGCAATTGTG
Barrier	CTTCCTAGAA TTTATAGTGA	ATCTTGGATC	TCACTGAAAT	TTATAATGCA	TTCTTAGGTA	CCAAACAGAG	TGCAATTGTG
Ishtara	CTTCCTAGAA TTTATAGTGA	ATCTTGGATC	TCACTGAAAT	TTATAATGCA	TTCTTAGGTA	CCAAACAGAG	TGCAAT-GTG
Julior	CCTCCTAGAA TTTATAGTAA	ATTCTGGGTT	TCAACGAAA	ATTATAATGCA	TTCTTAGGTA	CCAAACAGAG	TGCAAT-GTG
Continuação							
Peach_NCBI	CAAGTGGCGG	GTA					
Ps_Lovell	CAAGTGGCGG	GTAATCAGTT	TATATCAAAG	CAGCATTTCAT	AACAGGATCA	ACCAATG	
Pr_Nemaguard	CAAGTGGCGG	GTAGTCAGTT	TATATCAAAG	CAGCATTTCAT	AACAGGATCA	ACCAATG	
Okinawa	CAAGTGGAGG	GTCTACAGTC					
Okinawa_Homozigoto	CAAGTGGTAG	GACTACAGTC					
Tsukuba_2	CAAGTGGTGG	-ACTATA	-TC				
Piazito	CAAGTGGTAG	GAATATCAAA					
RN_0250606	CAAGTGGTAG	G-AATCAGAC					
GxN9	CAAGTGGCGG	GTCTACAGTC					
Barrier	CAAGTGGCGG	GTATAAGTTA					
Ishtara	CAAGTGGCGG	GTATTCAGTT					
Julior	CAAGTGGCGG	GTGACAGTTA					

Tabela 1. Alinhamento das sequências de nucleotídeos obtidos por sequenciamento a partir dos produtos de PCR dos primers STS - NRsauF2/NRSauR2, utilizando como referência as sequencias Ps_Lovell e Pr_Nemaguard. * Letras em negrito identificam a presença e ausência do sítio de restrição a *Mbo* I (*Sau*3A I).

4. CONCLUSÕES

Concluiu-se que o marcador STS-NR_{SauF2}/NR_{SauR2} pode ser utilizado na identificação de genótipos resistentes e suscetíveis a *Meloidogyne* spp. em programas de melhoramento de *Prunus persica*, desde que se utilize nos cruzamentos genitores bem caracterizados quanto aos padrões fenotípicos e moleculares associados a resistência.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CLAVERIE, M.; DIRLEWANGER, E.; BOSSELUT, N.; GHELDER, C.V.; VOISIN, R.; KLEINHENTZ, M.; LAFARGUE, B.; ABAD, P.; ROSSO, M.N.; CHALHOU, B.; ESMENJAUD, D. 2011. The Ma Gene for Complete-Spectrum Resistance to *Meloidogyne* Species in *Prunus* Is a TNL with a Huge Repeated C-Terminal Post-LRR Region. **Plant Physiology**, Rockville, v.156, p.779–792, 2011.

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

GILLEN, A.M.; BLISS, F.A. Identification and mapping of markers linked to the Mi gene for root-knot nematode resistance in peach. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Davis, v.130, p.24–33, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=t&o=11&i=P>, acesso: 11/07/2012, às 14:00 hs.

LU, Z.X.; SOSSEY-ALAOUI, K.; REIGHARD, G.L.; BAIRD, Wm.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**, Heidelberg, v.99, p.115-122, 1999.

MAYER, N.A.; ANTUNES, L.E.C. EMBRAPA Clima Temperado. Diagnóstico do Sistema de Produção de Mudanças de Prunóideas no Sul e Sudeste do Brasil. **Documentos** 293. ISSN 1806-9193. Versão Eletrônica, 2010

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

SALESSES, G., DIRLEWANGER, E. BONNET, A. LECOULS, A. ESMENJAUD, D. Interspecific hybridization and rootstock breeding in peach. **Acta Horticulturae**, Bordeaux, v.465, p.209-217, 1998.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. Mega6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 30, p.2725-2729, 2013.

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