

## GENOTIPAGEM DE PLANTAS DE *P. PERSICA* COM MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A *MEOLOIDOGYNE SPP.*

VALMOR JOÃO BIANCHI<sup>1</sup>; MARCOS AURÉLIO CORREIA DE LIMA<sup>2</sup>

1 Universidade Federal de Pelotas, Prof. Associado – valmorjb@yahoo.com

2 Universidade Federal de Pelotas, Bolsista IC PIBIC – marcos20aurelio@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

A fruticultura moderna exige tecnologias que permitam a obtenção de produções elevadas, regulares e com alta qualidade (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 (MAYER et al., 2017), mas também sob o ponto de vista econômico e ecológico da produção.

No Brasil, o Rio Grande do Sul (RS) é o principal estado produtor de mudas e de frutas de caroço (*Prunus spp.*), e responde por aproximadamente 61% da área de cultivo com pessegueiros, entretanto possui a mais baixa produtividade média do país, cerca de 10 ton ha<sup>-1</sup> (MAYER et al., 2017). O uso de porta-enxertos sem identidade genética e suscetíveis a fitonematóides são fatores associados à baixa produtividade dos pomares de *Prunus spp.*, sendo um problema comum às principais regiões produtoras de frutas de caroço ao redor do mundo (MARULL et al., 1994; WALTERS et al., 2008; MAYER et al., 2017).

Como no Brasil não existem nematicidas registrados para frutíferas de caroço, o uso de porta-enxertos com resistência genética é uma alternativa ao controle químico desses fitoparasitas. Dentro deste contexto, os marcadores moleculares são uma ferramenta com grande aplicabilidade para auxiliar na caracterização genética de material vegetal de diferentes espécies. Também permitem reduzir o tempo de seleção de novos genótipos, devido a eficiência na identificação de loci ou de genes associados a caracteres desejáveis, facilitando a introgressão destes caracteres em novas cultivares (DE PAULA et al., 2011).

A seleção de caracteres agronômicos baseado em marcadores moleculares possui como vantagem o fato deles não serem influenciados pelo ambiente, diferentemente da seleção fenotípica, cujo o ambiente tem forte influência sobre as características morfológicas, dificultando assim a detecção de polimorfismo de forma confiável (TOPPA et al., 2013).

A identificação de marcadores moleculares associados à resistência para nematóides causadores de galhas em plantas de pessegueiro é de grande importância, pois permite estabelecer relações com as características biológicas ou fenotípicas de forma mais rápida e econômica (KHALLOUK et al., 2013). Sendo assim, o presente estudo objetivou a genotipagem e avaliação da transferibilidade de marcadores moleculares associados à resistência a *Meloidogyne spp.* em diferentes porta-enxertos de *Prunus spp.*

### 2. METODOLOGIA

No presente estudo foram avaliadas plantas clonais de pessegueiro das cultivares de Capdeboscq, Cadaman, Tsukuba 1, Umezeiro e Flordaguard, além de 20 seedlings da seleção NR 0100302 (Tsukuba 1 x Capdeboscq), 24 da

seleção NR 0110309 (Tsukuba 1 x Nemaguard) e 10 de 'Flordaguard', todas mantidas na Coleção de Gemoplasma de Porta-enxertos de *Prunus* da UFPel.

Folhas completamente expandidas foram coletadas de cada planta e armazenadas em ultrafreezer. O processamento do material e as análises foram realizadas no período de Janeiro a Abril de 2019, no Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas do Departamento de Botânica-IB-UFPel. A extração do DNA foi realizada conforme protocolo de DOYLE e DOYLE (1991).

Após a extração, as amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose 1% e padronizadas para 20 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>. As reações de PCR foram realizadas com as seguintes concentrações de reagentes: 2  $\mu$ L de DNA; 2,5  $\mu$ L de 10x PCR Buffer; 1,5  $\mu$ L de MgCl (50mM); 1,5  $\mu$ L de dNTP (2,5 mmol cada); 1,25  $\mu$ L de cada prime (10  $\mu$ M); 0,2  $\mu$ L de Taq polimerase por reação e H<sub>2</sub>O para completar o volume final de 25  $\mu$ L. As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador da marca Biocycler com o seguinte perfil térmico: 1 ciclo a 94°C por 5 min.; 40 ciclos a 94°C por 45 s., 52°C por 1 min., e 72°C por 1 min e 30 s.; 1 ciclo final de 72°C por 8 min.

Para a genotipagem foram utilizados os seguintes primers nas reações de PCR: AMPP117 SSR, OPAS 14A, NBS 3, NBS 29, ppa 018595, ppa 023253 int F + ppa 018595 int R, InterMia F1, InterMia F2 e InterMia R, cuja localização em relação ao loco gênico de resistência a *Meloidogyne* spp., em pêssego, está representado na Figura 1.

Após realizar a PCR, 12,5  $\mu$ L de cada amostra amplificada foi aplicada em gel de agarose 1%, tampão TBE 1X, sendo a eletroforese realizada a 60-90 volts, por 1:30 hora. Para a visualização das bandas, o gel foi submerso em brometo de etídio por 10 minutos, posteriormente visualizados e fotografados em aparelho fotodocumentador.

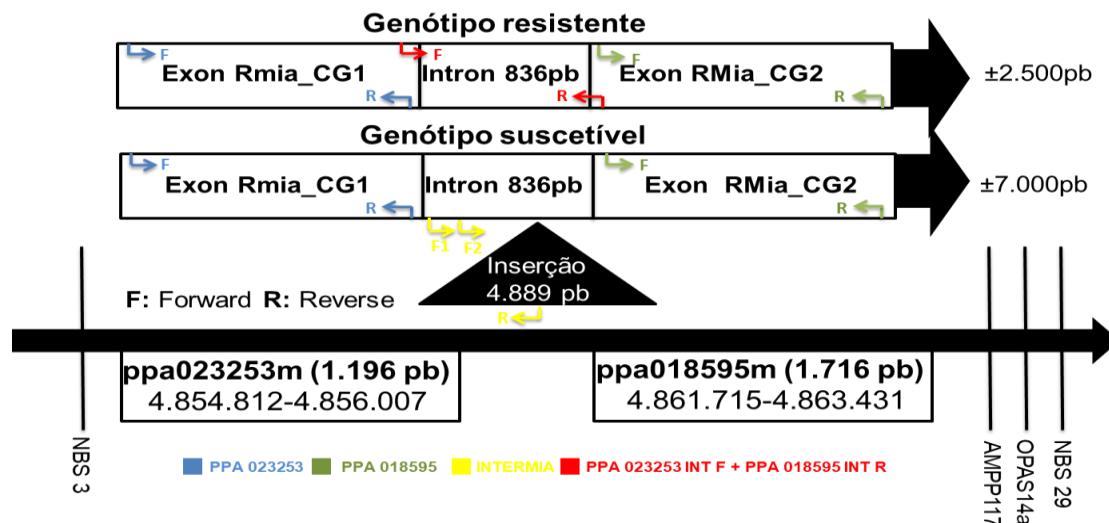


Figura 1 – Representação dos locais de ancoramento dos primers no loco gênico de resistência a *Meloidogyne* spp. em *Prunus persica*.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene de resistência à *Meloidogyne* spp. foi mapeado fisicamente no grupo de ligação 2 (LG 2) do porta-enxerto de pêssego 'Nemared', sendo caracterizado por dois exons, separado por um íntron de aproximadamente 836pb (DUVAL et al., 2014). Em genótipos suscetíveis, os dois exons continuam presentes, porém o íntron apresenta uma inserção de aproximadamente 4.889pb (Figura 1), determinando durante o processo de transcrição, a produção de um

mRNA que ao ser traduzido produz uma proteína truncada, sem significado biológico.

Quando as diferentes cultivares e populações de seedlings foram avaliadas verificou-se que dentre os seedlings de 'Flordaguard' o loco AMPP117 SSR revelou uma banda polimórfica de  $\pm 185$ pb (Figura 2A). Este mesmo loco foi polimórfico entre as cultivares avaliadas e entre os seedlings de NR 0100302, NR 0110309, sugerindo ser um loco marcador importante. Entretanto, diversas amostras não apresentaram amplificação, demonstrando a possível ocorrência de alelos nulos para este loco, em parte das amostras, ou a necessidade de otimização da reação de PCR.

Inconsistências na amplificação também foi registrada para o loco OPAS 14A, entretanto também foi observado a ocorrência de polimorfismo entre amostras amplificadas (dados não apresentados).

Os loci NBS 3 e NBS 29 apresentaram bandas monomórficas ( $\pm 340$  pb e  $\pm 290$ pb, respectivamente) entre seedlings de NR 0100302, NR 0110309 e Flordaguard (Figura 2B), bem como para as diferentes cultivares avaliadas.

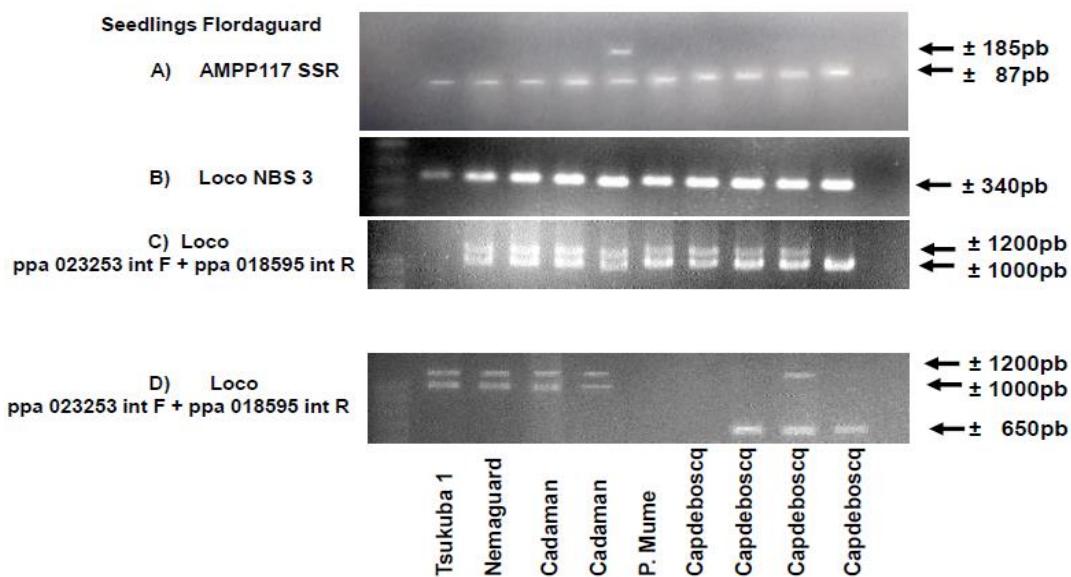


Figura 2 – Alelos amplificados de diferentes loci gênicos associados a resistência a *Meloidogyne* spp. em diferentes cultivares e seleções de *Prunus persica*.

Na análise do loco InterMia, verificou-se que a presença de um único alelo ( $\pm 2000$  pb) nos seedlings de 'Flordaguard', indicando que este material vegetal possui pelo menos um dos alelos contendo a inserção no íntrom, portanto é heterozigoto para a resistência, conforme já preconizado por LU et al. (1999). Nos seedlings da seleção NR 0110309, esse alelo apresentou segregação condizente com os parentais, confirmando que 'Tsukuba 1' também é um genótipo resistente recombinante que apresenta um dos alelos ligados a suscetibilidade.

Pela combinação de primers ppa 023253int F e ppa 018595int R foi possível identificar polimorfismo dentro da população de seedlings de 'Fordaguard' (Figura 2C), NR 0100302 e de NR 0110309, bem como entre as diferentes cultivares avaliadas (Figura 2D), onde verificou-se a presença de dois alelos ( $\pm 1000$ pb e  $\pm 1200$ pb) nas cultivares resistentes 'Tsukuba 1', 'Nemaguard' e 'Cadaman'. Entre os diferentes clones de 'Capdeboscq', considerados suscetíveis a *Meloidogyne* spp., observou-se um alelo de  $\pm 650$ pb (Figura 2D), comum a três clones, sendo que em um dos clones apresentou um alelo ( $\pm 1200$ pb) similar as cultivares resistentes, evidenciando que se trata de um genótipo recombinante para o referido loco.

Muito embora faz necessário otimizar as condições de amplificação para os loci marcadores InterMia e OPAS 14A, os polimorfismos identificados, entre cultivares e seedlings avaliados, são marcadores moleculares úteis na caracterização varietal e no mapeamento genético, visando obter novos genótipos resistentes e/ou suscetíveis a *Meloidogyne* spp..

#### 4. CONCLUSÕES

Os loci NBS 3 e NBS 29 não são úteis para revelar polimorfismo nos genótipos avaliados.

É possível caracterizar genótipos de *Prunus persica*, que segregam para a resistência à *Meloidogyne* spp., com pelo menos cinco das sete combinações de primers utilizadas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DUVAL, H.; HOERTER, M.; POLIDORI, J.; CONFOLENT, C.; MASSE, M.; MORETTI, A.; VAN GHELDER, C.; ESMENJAUD, D. High-resolution mapping of the RMia gene for resistance to root-knot nematodes in peach. **Tree Genetics & Genomes**, v.10, n.2, p.297-306, 2014.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithesburg, v.1, p.13-15, 1991.
- 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).
- KHALLOUK, S.; VOISIN, R.; PORTIER, U.; POLIDORI, J.; GHELDER, C.R.; ESMENJAUD, D. Multiyear evaluation of the durability of the resistance conferred by *Ma* and *RMia* genes to *Meloidogyne incognita* in *Prunus* under controlled conditions. **The American Phytopathological Society**, v.103, n.8, p.833-840, 2013.
- LU, Z.-X.; SOSSEY-ALAQUI, K.; 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 Genetic**, v.99, p.115-122, 1999.
- MARULL, J.; PINOCHET, J.; FELIPE, A.; CENIS, J.L. Resistance verification in *Prunus* selections to a mixture of 13 *Meloidogyne* isolates and resistance mechanisms of peach-almond hybrid to *M. javanica*. **Fundamental and Applied Nematology**, v.17, n.2, p.85-92, 1994.
- MAYER, N.A.; BIANCHI, V.J.; FELDBERG, N.P.; MORINI, S. Advances in peach, nectarine and plum propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.39, n.4, p.1-25, 2017.
- TOPPA, E.V.B.; JADOSKI, C.J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.12, n.1, p.1-5, 2013.
- DE PAULA, L.A.; BIANCHI, V.J.; NOGUEIRA, L.R.; BARROS, W.S.; FACHINELLO, J.C.. Transferabilidade e ligação de marcadores moleculares em uma população de *Prunus persica*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.17, n.3-4, p.321-325, 2011.
- WALTERS, S.A.; BOND, J.P.; RUSSELL, J.B.; TAYLOR, B.H.; HANDOO, Z.A. Incidence and influence of plant-parasitic nematodes in southern Illinois peach orchards. **Nematropica**, v.38, n.1, p.63-74, 2008.