

SEÇÃO 2 MELHORAMENTO VEGETAL

DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE GENÓTIPOS DE PERA

Juliana Stracieri¹; Natália Botega Alves² e Luciane Vilela Resende¹

¹ Universidade Federal de Lavras - UFLA . Departamento de Agricultura DAG/UFLA. Caixa Postal 3037, CEP: 37200-000 Lavras – MG. E-mail: juliana_unesp@hotmail.com

² Universidade Federal de Lavras – UFLA. Departamento de Biologia DBI/Genética e Melhoramento de Plantas. Caixa Postal 3037, CEP: 37200-000 Lavras – MG. E-mail: natalia.b@hotmail.com

RESUMO: A pereira é uma frutífera pertencente à família Rosaceae e ao gênero *Pyrus*. No Brasil, a produção de peras é de aproximadamente 20 mil toneladas por ano, que representa menos de 10% do total da fruta consumida no país, a baixa produção se deve à falta de cultivares adaptadas às condições climáticas. Com o presente trabalho objetivou-se identificar e avaliar a diversidade genética entre acessos de pera (*Pyrus communis* L.), no município de Lavras, localizado no Sul de Minas Gerais, região promissora para esse cultivo. A caracterização genética foi efetuada em 34 acessos, com base em 21 primers microssatélites, as análises de agrupamento dos genótipos foram realizadas pelo método Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages com base no coeficiente de Jaccard. O coeficiente de dissimilaridade para todos os genótipos variaram de 0,125 a 0,752. Os genótipos UFLA 17 e UFLA 27, ambos coletados no Pomar da Universidade Federal de Lavras, foram as que apresentaram maior distância genética em relação as demais, e os genótipos CG7 e CG10 foram o que apresentaram a menos dissimilaridade genética, ambas coletadas no Pomar comercial da Casa da Goiaba. Observou-se que há uma grande variabilidade genética entre a maioria dos genótipos de pera estudados.

PALAVRAS-CHAVE: Marcador microssatélite, caracterização genética, diversidade genética, *Pyrus communis* L.

GENETIC DIVERSITY AMONG GENOTYPES PEAR

ABSTRACT: The pear is a fruit that belonging to the family Rosaceae and the genus *Pyrus*. In Brazil, pear production is approximately 20,000 tons per year, which represents less than 10% of the total fruit consumed in the country, the low production is due to the lack of cultivars adapted to climatic conditions. The present work aimed to identify and evaluate the genetic diversity among accessions of pear (*Pyrus communis* L.), in Lavras, located in southern Minas Gerais, promising region for this crop. Genetic characterization was performed on 34 accessions based on 21 microsatellite primers, the cluster analysis of genotypes were performed by using Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages based on Jaccard. The dissimilarity coefficient for all genotypes varied from 0.125 to 0.752. Genotypes UFLA17 and UFLA27, both collected in Federal University of Lavras Orchard, showed the greatest genetic distance in relation to the other, and the genotypes CG7 and CG10 were what showed less genetic diversity, both collected in commercial orchard Casa da Goiaba. It was observed that there is a great variability among the majority of pear genotypes studied.

KEY WORDS: Microsatellite marker, genetic characterization, genetic diversity, *Pyrus communis* L.

INTRODUÇÃO

A pereira pertence à família *Rosaceae* e gênero *Pyrus*. É uma planta perene, oriunda de países de clima temperado, onde o frio hibernal é acentuado. Compreende mais de 20 espécies, todas nativas do Velho Mundo do Hemisfério Norte, sendo as mais importantes pertencentes às seguintes espécies: *Pyrus communis* L. (Europeias – nativas do sul da Europa e Ásia), *P. pyrifolia* ou *P. serotina* (Asiáticas – nativas da Mongólia), *P. bretschneideri* (Chinesa) e híbridos entre *P. communis* e *P. pyrifolia*. Outra espécie menos conhecida comercialmente, porém muito utilizada em programas de melhoramento, em razão de sua rusticidade é a *P. ussuriensis* (Siberiana), motivo pelo qual é muito cruzada com *P. communis* (Mitcham e Mitchell, 2007; Nakasu e Faoro, 2003).

A pera (*Pyrus communis* L.) é a fruta fresca importada em maior quantidade pelo Brasil, segundo dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013), em 2011, foram produzidos 20.532 toneladas da fruta no país, aproximadamente 10% do total da fruta consumida no país. Sua produção nacional se concentra na região Sul do país, existindo uma pequena produção em alguns estados do Sudeste. Em Minas Gerais seu cultivo é pouco expressivo, em razão da falta de cultivares adaptadas a aspectos climáticos e à presença de materiais crioulo e de origem desconhecida.

De acordo com Fachinello et al. (2011), os entraves que impossibilitam a produção satisfatória no Brasil são problemas relacionados ao vigor das plantas, tipo de porta-enxerto, abortamento floral, insuficiência de frio hibernal, falta de cultivares adaptadas às condições climáticas; no Sul de Minas Gerais diversas culturas exigentes em frio estão sendo cultivadas com êxito. O desenvolvimento de novas cultivares e de trabalhos de pesquisa que assegurem a produção contínua dessa espécie em condições adversas pode ajudar no aumento de áreas cultivadas em nosso país.

Apesar da grande diversidade genética nas espécies frutíferas, a produção de frutas, em geral, é dependente de um número limitado de cultivares. Em particular, a produção mundial de *Pyrus communis* L. é baseada em menos de dez variedades (Mourgues et al., 1996).

A caracterização molecular tem sido utilizada com diversas finalidades, dentre elas a quantificação e caracterização da diversidade genética, que é realizada por meio de medidas de similaridade ou dissimilaridade, as quais são visualizadas por métodos de agrupamentos. Com isso, os marcadores moleculares permitem acessar o genótipo e a variabilidade do ácido desoxirribonucleico de acessos de plantas, assim, identificar polimorfismo (Pinheiro et al.,

2011). O uso de marcadores moleculares é uma ferramenta que possibilita o programa de melhoramento reduzir o tempo para a identificação da diversidade genética entre os indivíduos de interesse.

Um dos marcadores moleculares que se destacam por sua utilidade em estudos de diversidade genética são os marcadores moleculares microssatélites (SSR). Esses marcadores fornecem um elevado nível de informação genética por locus em razão de: Sua natureza codominante, que lhes permite a separação de indivíduos heterozigotos e homozigotos; são altamente multialélicos, que os tornam altamente polimórficos dentre todos os marcadores moleculares. Os marcadores microssatélites são obtidos de forma simples, por meio de amplificação via *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e são altamente reproduzíveis e passíveis de automatização, que permite rapidez na avaliação de um grande número de genótipos e locos (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Uma das formas de aumentar o número de variedades de pera existentes é por meio do melhoramento convencional, o qual requer vários anos, em função do longo período juvenil e alto nível de heterozigose da pera. Deste modo, a introdução de importantes características agrônômicas, por meio da transformação genética, poderá ser um método alternativo, rápido e sem causar um grande número de recombinações gênicas (Mourgues et al., 1996).

Objetivou-se com esse trabalho identificar e avaliar a diversidade genética de acessos de pera, obtidos de cultivos localizados em um município do Sul de Minas, pelo uso de marcadores moleculares microssatélites.

MATERIAL E MÉTODOS

Folhas de indivíduos das populações de *Pyrus sp.* foram coletadas no município de Lavras, no Sul de Minas, os sítios de coleta foram o pomar da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e um produtor da região conhecido como Casa da Goiaba (CG), no total foram coletados 34 materiais para este estudo.

Para a coleta de material vegetal foi necessária uma padronização de metodologia visto que não existia protocolo para a mesma e o material vegetativo das pereiras oxida-se rapidamente. Assim, foi retirado um ramo com aproximadamente 20 cm de comprimento, contendo folhas recém- formadas. Este foi envolvido em folhas de papel umedecido, devidamente identificado e armazenado em caixas isotérmicas enquanto era transportado para

o Laboratório de Eletroforese do Setor de Sementes - LAS da Universidade Federal de Lavras - UFLA.

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o método CTAB 2% (Ferreira e Grataplaglia, 1998). Para a quantificação do DNA foi utilizado o NanoVue da marca GE Healthcare e a pureza foi calculada por meio da relação OD260/OD280. A avaliação da quantidade de DNA foi realizada, por meio de gel de agarose 0,8% e visualizado em equipamento de fotodocumentação Vilber Lourmat. Após a quantificação o DNA foi diluído para a concentração de 25ng.

As reações de amplificação dos fragmentos de DNA foram realizadas em termociclador Perkin Elmer Modelo Gene Amp PCR System ® 2400, em um meio com volume final de 20µL, contendo: DNA genômico (25 ng), *primer* (10 pmol de *primer forward*, 10 pmol de *primer reverse*) (Tabela 01), juntamente com um *mix* composto de: Água ultrapura esterilizada; tampão 10X; MgCl₂ (25mM), dNTP (10 mM); Taq polimerase (Invitrogen Life Technologies 5 U/µL). Em seguida, o material foi amplificado e realizada a eletroforese a 120 V por 1 h e 45 min em gel de poliacrilamida. As reações foram preparadas em ambiente refrigerado, em recipiente com gelo, com ponteiras autoclavadas e pipetas separadas para esta finalidade. O intuito foi manter o material livre de qualquer tipo de contaminação.

O programa de amplificação consistiu 94°C de temperatura inicial por cinco min, cinco ciclos de amplificação a 94 °C por 30 seg; 60 °C por 30 seg. Em seguida o material foi submetido a mais 35 ciclos, iniciando a 94°C por 30 seg, 52°C por 30 seg, 72°C por 30 seg. A extensão foi feita a 72°C por cinco mim. Após as reações, os produtos de amplificação do DNA foram armazenados em freezer a, aproximadamente, 4°C.

Tabela 01 - Características referentes aos 21 pares de *primers* testados. F: *primer forward*; R: *primer reverse*;

Identificação do <i>primer</i> Operon	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')
NH001c	F:AATACTAATCCTTTTTGCTAA R:TCCATTCAATCTGTCTCGGTC
NH002b	F:GGAGTCAGCGGCAAAAAAAG R:CCCCTCCCTCCTCTTATTGT
NH005b	F:TGAGAAGAATTAGCCATGATGA R:TACTACTTGCCTGCGTTCC
NH007b	F:TACCTTGATGGGAAGTGAAC R:AATAGTAGATTGCAATTACTC
NH008b	F:GGAAAGAGAAGGAAGAAGAGAAGG R:TGATAGGGGCATTTCCGGTAA
NH009b	F:CCGAGCACTACCATTGA R:CGTCTGTTTACCGCTTCT
NH011b	F:GGTTCACATAGAGAGAGAGAGAG R:TTTGCCGTTGGACCGAGC
NH013b	F:GGTTTGAAGAGGAATGAGGAG R:CATTGACTTTAGGGCACATTC
NH012a	F:CCGCCAGTACCCATCTCCA R:ACCACTCAAACCCCCCTC
NH014a	F:CAAACCTAACCTAAATACC R:TGTTTCATATATTCATCACTC
NH015a	F:TTGTGCCCTTTTTCTACC R:CTTTGATGTTACCCCTTGCTG
NH017a	F:CAGAAAGGAGAGGGGCTACAG R:CCCTCACCCAATCAAACCTC
KA4b	F:AAAGGTCTCTCTCACTGTCT R:CCTCAGCCCAACTCAAAGCC
KA5	F:CAACAACAACAAAAACAGTAA R:AGCCTTAGAAATAGAAACAACA
KA14	F:TCATTGTAGCATTTTTATTTTT R:ATGGCAAGGGAGATTATTAG
KA16	F:GCCAGCGAACTCAAATCT R:AACGAGAACGACGAGCG
KB16	F:AAAGAACAGCAAGAACCA R:GATTTTGTCCGCAGGT
KU10	F:AGAGTCGGTTGGGAAATGATTG R:AGTATGTGACCACCCCGATGTT
BGA35	F:GCTTCATCACCGTCTGCT R:AGAGGGAGAAAGGCGATT
BGT23b	F:CACATTCAAAGATTAAGAT R:ACTCAGCCTTTTTTCCCAC
HGA8b	F:CATAGAGAAAGCAAAGCAA R:AACAAGCAAAGGCAGAACAA

Fonte: Gianfranceschi, Seglias e Tarchini (1998) e Yamamoto et al. (2002)

Em cada microtubo contendo 20 μL de DNA amplificado foram adicionados cinco μL de corante *stop solution*. Desta mistura, 10 μL foram aplicados nas canaletas do gel de poliacrilamida 1,5% e submetidos à eletroforese em tampão TBE 1X a 120V por uma hora e quarenta e cinco minutos. Para efeito de comparação do tamanho dos fragmentos, foi utilizado como padrão o DNA Ladder 100 bp. Após a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi submetido à coloração com prata e visualizado no transiluminador da marca Hoefer MacroVue modelo Vis-45.

Os produtos da amplificação, visualizados no gel, produzidos por cada *primer*, foram utilizados na elaboração de uma matriz de similaridade genética, por meio do registro da presença (1) e da ausência (0) de bandas no perfil eletroforético de cada genótipo. Os dados foram empregados para estimar todas as análises subsequentes.

As matrizes binárias foram usadas para a obtenção das estimativas de similaridades genéticas (S_{gij}), com auxílio do programa XLSTAT (Addinsoft®, versão 2013.2 Free), empregando-se o coeficiente de Jaccard. Com base na matriz de similaridade genética Jaccard, foi realizado o agrupamento dos genótipos, utilizando o método *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages* (UPGMA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 21 pares de *primers* selecionados para a análise de diversidade genética nos 34 acessos de pera foram selecionados com base nos trabalhos de Gianfranceschi et al. (1998) e Yamamoto et al. (2002).

No total foram encontrados 189 fragmentos, sendo 151 (79,8%) polimórficos, os quais forneceram uma média de 7,19 fragmentos polimórficos por *primer*. O maior número de fragmento polimórficos, 16, foi registrado no *primer* NH09b, seguidos pelo loco KA16 que amplificou 15 alelos, enquanto o menor número ocorreu no *primer* NH014a, um total de quatro fragmentos polimórficos, seguido pelos *primer* NH002b e KA4b com cinco alelos e os *primer* NH007b, KB16 e KA5 com sete alelos. Yakovin et al. (2011) desenvolveu um trabalho de diversidade genética utilizando 47 acessos de pera e apenas cinco *primers*, um número bem menor de iniciadores que o utilizado no presente trabalho, a consequência do uso de um número reduzido de *primers* é o baixo número de informação dos genótipos em questão.

Santos et al. (2011), na caracterização molecular de acessos de *Pyrus* spp. provenientes da Espanha, utilizaram 20 *primers* SSR, diferentes dos utilizados neste trabalho,

para analisar a diversidade molecular de 221 acessos e 21 cultivares comerciais de pera, o que gerou informação suficiente para um resultado conciso.

Pelos valores publicados, conforme observado em diversos resultados das pesquisas mencionadas, o número de primers e fragmentos totais, utilizados no presente trabalho, é maior que os utilizados em diversas literaturas como Santos et al. (2011), Miranda et al. (2010) e Pinheiro et al. (2012).

Os coeficientes de dissimilaridade de Jaccard para todos os 34 genótipos variaram de 0.125 entre os acessos sete e 10, à 0,752 entre os acessos 27 e 17. O dendrograma foi gerado pelo método UPGMA. Um corte feito a 0,543 (média de dissimilaridade genética) separou os genótipos em quatro grupos (Figura01). Como o principal objetivo do trabalho é identificar a diversidade genética para posterior estabelecimento de um banco de germoplasma na região de Sul de Minas visando progredir no melhoramento genético com essa frutífera

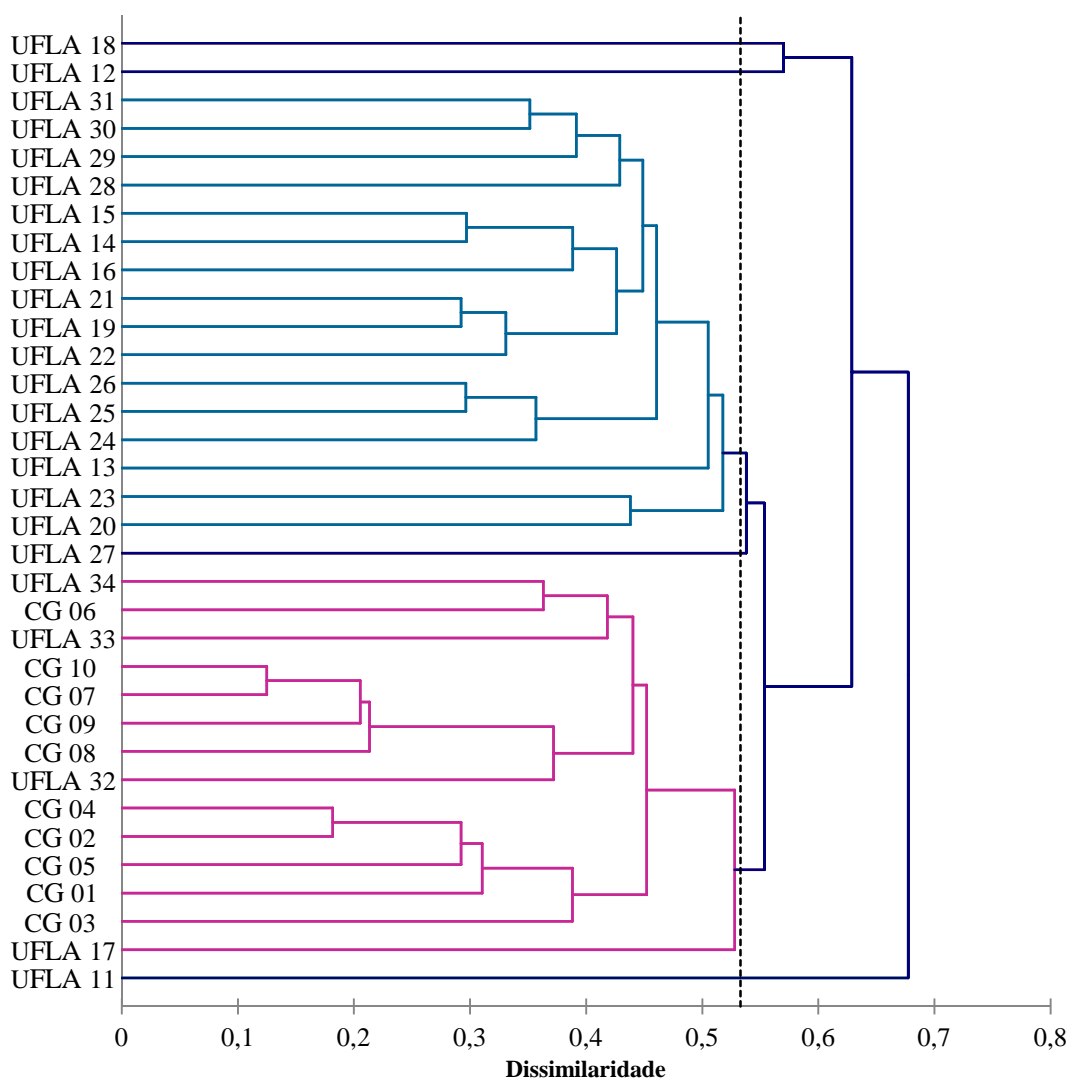


Figura 01 - Dendrograma gerado pelo método UPGMA por meio da matriz de dissimilaridade de Jaccard, por *primers* SSR, entre os genótipos de *Pyrus communis* L.

Os indivíduos foram divididos em 6 grupos (Figura 02) aonde o grupo 2, 3, 4, 5 e 6 são formados apenas por genótipos coletados na Universidade Federal de Lavras, aonde se encontram os genótipos com maior dissimilaridade genética (grupo 2 e grupo 4), e o grupo 1 é formado pelos 10 genótipos provenientes da Casa da Goiaba e quatro genótipos da UFLA, nesse grupo se encontra os dois indivíduos com menos dissimilaridade genética.

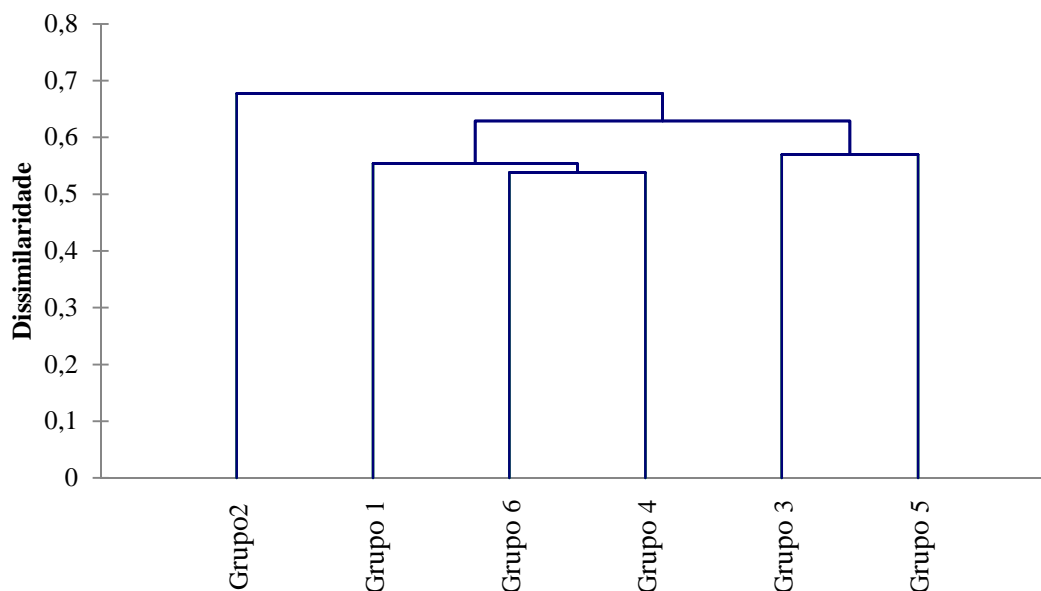


Figura 02 – Dendrograma de agrupamento gerado pelo método UPGMA por meio da matriz de dissimilaridade de Jaccard.

A alta dissimilaridade genética entre alguns genótipos do município de Lavras é devido a diversidade do material cultivado na região e a aquisição de mudas das mais diferentes origens, já que estes acessos foram coletados em diversas propriedades do município. Além disso, a espécie em questão apresenta autoincompatibilidade, o que favorece a alogamia e consequentemente uma maior diversidade genética.

O grande interesse em identificar os genótipos com maior divergência genética é o posterior estabelecimento de um banco de germoplasma no Sul de Minas Gerais com os materiais de maior interesse para o programa de melhoramento genético.

CONCLUSÕES

Há uma grande variabilidade genética entre a maioria dos genótipos de *Pyrus communis* L. estudados;

A média de divergência genética entre os genótipos estudados é maior que 50%.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPQ pela bolsa de estudos e a FAPEMG pelo financiamento do projeto que este trabalho faz parte.

REFERÊNCIAS

FACHINELLO, J. C.; PASA, M. S.; SHMTIZ, J.D.; BETEMPS, D.L. **Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil**. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 33, p. 109-120, out. 2011. Edição especial.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.

Production crops. Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 6 abril. 2013.

GIANFRANCESCHI, L.; SEGLIAS, N.; TARCHINI, R. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, n. 8, p. 1069-1076, Oct. 1998.

MIRANDA, C.; URRESTARAZU, J.; SANTESTEBAN, L. G.; ROYO, J. B. Genetic Diversity and Structure in a Collection of Ancient Spanish Pear Cultivars Assessed by Microsatellite Markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Spain, v. 135, n. 5, p. 428-437, 2010.

MITCHAM, E. J.; MITCHELL, F. G. Conditioning and ripening of Bartlett pears. In: MITCHAM, E. J.; ELKINS, R. B. (Ed.). **Pear production of handling manual**. Davis: University of California, 2007. chap. 26.

MOURGUES, F.; CHEVREAU, E.; LAMBERT, C. Efficient Agrobacterium-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L). **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, n. 3/4, p. 245-249, Dec. 1996.

NAKASU, B. H.; FAORO, I. D. Cultivares. In: CENTELLAS-QUEZADA, A.; NAKASU, B. H.; HERTER, F. G. (Ed.). **Pêra: produção**. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado; Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2003. p. 20-31. (Frutas do Brasil, 46).

PINHEIRO, L. R. RABBANI, A. R. C.; SILVA, A. V. C.; LÉDO, A. S.; PEREIRA, K. L. G. Genetic diversity and population structure em the Brazilian *Cattleya labiata* (*Orchidaceae*) using RAPD and ISSR markers. **Plant Systematics and Evolution**, Brazil, v. 275, p. - , July 2012.

SANTOS, A. R. F.; CABRER, A. M. R.; HERNÁNDEZ, M. B. D.; LORENZO, S. P. Genetic variability and diversification process in local pear cultivars from northwestern Spain using microsatellites. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 7, p. 1041-1056, May 2011.

YAKOVIN, N. A.; FESENKO, A.; ISACHKIN, A. V.; KORLOV, G. I. Polymorphism of microsatellite Loci in Cultivars and Species of Pear (*Pyrus L.*). **Russian Journal of Genetics**, Moscow, v. 47, n. 5, p. 564-570, Sept. 2011.

YAMAMOTO, T.; KIMURA, T.; SHODA, M.; BAN, Y.; HAYASHI, T.; MATSUTA, N. Development of microsatellite markers in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 14-16, 2002.

Recebido para publicação em: 02/05/2013

Aceito para publicação em: 20/07/2013