

Notas Científicas

Similaridade genética entre cultivares de marmeleiro avaliadas por marcadores AFLP

Roberta Manica-Berto⁽¹⁾, Camila Pegoraro⁽²⁾, Claudete Clarice Mistura⁽¹⁾, Adriana Pires Soares Bresolin⁽³⁾, Andrea De Rossi Rufato⁽⁴⁾ e José Carlos Fachinello⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Campus Universitário, s/nº, CEP 96010-900 Pelotas, RS. E-mail: robertamanica@yahoo.com.br, c.mistura@uol.com.br, jfachi@ufpel.tche.br ⁽²⁾Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Campus Bento Gonçalves, Avenida Osvaldo Aranha, nº 540, Juventude Enologia, CEP 95700-000 Bento Gonçalves, RS. E-mail: camyagro@yahoo.com.br ⁽³⁾Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui, Rua Luiz Joaquim de Sá Britto, s/nº, CEP 97650-000 Itaqui, RS. E-mail: spadribr@hotmail.com ⁽⁴⁾Embrapa Uva e Vinho, Estação Experimental de Fruticultura de Clima Temperado, Caixa Postal 1513, CEP 95200-000 Vacaria, RS. E-mail: andrea.rufato@embrapa.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi determinar as relações genéticas de 21 cultivares de marmeleiro com base no marcador “amplified fragment length polymorphism” (AFLP), para melhoramento e conservação de recursos genéticos da espécie na região sul do Rio Grande do Sul. O DNA das cultivares foi extraído pelo método CTAB, e as reações de AFLP foram realizadas com os iniciadores EcoRI/MseI. Foram identificados dois grupos entre as 21 cultivares de marmeleiro, um com quatro e outro com sete cultivares geneticamente mais relacionadas. As cultivares de marmeleiro apresentam alta variabilidade genética, com máximo de 43% de similaridade.

Termos para indexação: *Cydonia oblonga*, divergência, germoplasma de marmeleiro.

Genetic similarity between quince cultivars evaluated by AFLP markers

Abstract – The objective of this work was to determine the genetic relationships of 21 quince cultivars based on the amplified fragment length polymorphism (AFLP) marker, for breeding and conservation of genetic resources of the specie in the south of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. The DNA from the cultivars was extracted using the CTAB method, and the AFLP reactions were performed with the primers EcoRI/MseI. Two groups were identified among the 21 quince cultivars, one with four and the other with seven cultivars more genetically related. The quince cultivars show high genetic variability, with maximum of 43% similarity.

Index terms: *Cydonia oblonga*, diversity, quince germplasm.

O marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) é uma espécie nativa da região do Transcaucaso, que inclui Armênia, Azerbaijão, Irã, sudoeste da Rússia e Turcomenistão. Pertencente à família Rosaceae e à subfamília Maloideae, tem como número de cromossomos base 17 (Evans & Campbell, 2002), enquanto outras subfamílias da Rosaceae têm números cromossômicos básicos de 7, 8 ou 9, o que sugere uma possível origem de anfidiplóida da Maloideae de duas formas primitivas da Rosaceae (Layne & Quamme, 1975).

Os porta-enxertos clonais de marmeleiros são amplamente utilizados em variedades de pereira europeia (*Pyrus communis*), e mais de 90% dos pomares de pera, na Itália, encontram-se enxertados sobre marmelos (Wertheim, 2002). Os marmeleiros

clonais permitem o controle do tamanho da planta, o que resulta na redução do vigor e na antecipação da produção (Lochard & Schneider, 1981) e possibilita o plantio em alta densidade.

Alguns estudos mostram que o marmeleiro apresenta alta variabilidade genética, conforme já verificado por Scaramuzzi (1957), que caracterizou 30 cultivares diferentes na Europa, 19 nos Estados Unidos e 86 na antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas. O autor salienta que a classificação botânica torna-se difícil pela quantidade de sinônimas, pelo polimorfismo de frutos e folhas e, sobretudo, pela existência de muitas plantas propagadas por sementes. A tradicional identificação e caracterização de uma cultivar baseada em atributos morfológicos e fenológicos requer extensas observações em plantas adultas, e pode levar

vários anos em se tratando de uma espécie perene. Além disso, os caracteres morfológicos podem variar por influência do ambiente, o que origina problemas de ambiguidade (Faleiro, 2007). Por essas razões, o uso de marcadores genéticos específicos, como o “amplified fragment length polymorphism” (AFLP), é uma opção para caracterizar espécies e germoplasmas.

Os marcadores AFLP se destacam pelo grande número de fragmentos que detectam em apenas um gel, o que os torna muito eficientes na amostragem do genoma. O grande poder de detecção de variabilidade genética advém da exploração simultânea da presença e da ausência de sítios de restrição, a exemplo dos marcadores “restriction fragment length polymorphism” (RFLP) e da ocorrência de amplificação de sequências arbitrárias, como nos marcadores “random amplified polymorphic DNA” (RAPD). Outra vantagem dos marcadores AFLP é a robustez, em relação ao RAPD. A utilização de iniciadores mais longos no AFLP, na fase de “polymerase chain reaction” (PCR), aumenta a especificidade da amplificação e evita a competição que ocorre durante a PCR na análise RAPD. Quanto aos marcadores microssatélites (SSRs), a grande limitação que apresentam, quando comparados ao AFLP, é a necessidade de serem isolados e desenvolvidos especificamente para cada espécie; também não é possível a utilização da estratégia de desenho de iniciadores universais, como ocorre no AFLP, o que torna o processo demorado, trabalhoso e com alto custo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O objetivo deste trabalho foi determinar as relações genéticas de 21 cultivares de marmeleiro com base no marcador AFLP, para melhoramento e conservação de recursos genéticos da espécie na região sul do Rio Grande do Sul.

O DNA foi extraído de folhas de plantas adultas (6 anos) de *C. oblonga* mantidas no Banco de Germoplasma pertencente ao Centro Agropecuário da Palma, da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), no Município de Capão do Leão, RS (31°48'S, 52°30'W e altitude de 60 m). As cultivares utilizadas foram: Constantinopla, Zuquerinetta, D'Angers, Alongado, Bereckzy, Du Lot, Smyrna, Meliforme, Champion, Pineapple, Lajeado, Mendonza Inta-37, Alaranjado, De Vranja, Apple, Portugal, De Patras, BA 29, Kiakami, CTS 207 e Radaelli. O clima da região conforme a classificação de Köppen & Geiger (1928) é do tipo Cfa, temperado úmido com verões quentes. A temperatura e

a precipitação média anuais são de 17,9°C e 1.500 mm, respectivamente. A área experimental foi constituída por 84 plantas, em que, de um total de quatro plantas de cada cultivar, foram sorteados três acessos, que constituíram as repetições.

Para a extração de DNA, foi utilizado o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) proposto por Doyle & Doyle (1990), seguido da análise de AFLP de acordo com o protocolo do fabricante Kit AFLP Analysis System I (Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP), com iniciadores EcoRI/MseI não marcados por radioisótopos. Os fragmentos foram visualizados em gel de poliacrilamida (6%) e corados com nitrato de prata conforme descrito por Creste et al. (2001). A separação dos fragmentos foi realizada em eletroforese por 2 horas, a 60 W.

Para a análise dos dados, utilizou-se o sistema binário, em que a presença ou a ausência de bandas foi representada pelos números 1 e 0, respectivamente. A partir dessa matriz de dados, tendo-se utilizado o coeficiente de Jaccard para análise de similaridade genética entre as cultivares de marmeleiro, foi gerada a matriz de similaridade. Posteriormente, com os dados de similaridade, foi realizada a análise de agrupamento no módulo “sequential, agglomerative, hierarchical and nested clustering methods” (SAHN), com auxílio do programa NTSYS-pc (Rohlf, 2000), por meio do método de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA). Em seguida, foi construído o dendrograma de similaridade entre os acessos. Para verificar a consistência dos agrupamentos gerados no dendrograma, foi construída a matriz de distância cofenética. A matriz de similaridade original foi correlacionada com a matriz de distância cofenética com uso do módulo “matrix comparison” (MXCOMP) do mesmo programa, para mensurar a qualidade do ajuste da análise de agrupamento.

O coeficiente de correlação cofenética obtido foi de 0,84, o que indica haver consistência dos agrupamentos gerados no dendrograma, ou que o dendrograma produzido representa adequadamente as reais distâncias, com boa representação dos dados de AFLP (Figura 1). Com o ponto de corte em torno de 0,26 de similaridade, obteve-se a formação de dois grupos principais, um mais homogêneo, formado pelas cultivares De Patras, Constantinopla, Smyrna e Champion, e outro mais heterogêneo, formado pelas cultivares Du Lot, Zuquerinetta, Portugal, CTS 207, Mendonza Inta-37, Lajeado e Pineapple. As demais

cultivares não foram agrupadas em nenhum dos dois principais grupos identificados, o que mostra serem mais distantes geneticamente.

Dentro do primeiro grupo, ocorreu a formação de dois subgrupos com similaridade genética mais próxima, um formado pelas cultivares De Patras e Constantinopla e outro, por Smyrna e Champion. No segundo grupo, a cultivar Du Lot foi a que mais se distanciou das demais cultivares (Zuquerinetta, Portugal, CTS 207, Mendonza Inta-37, Lajeado e Pineapple). A cultivar Meliforme foi a que apresentou maior distância genética entre todas as cultivares avaliadas. Já as cultivares CTS 207 e Mendonza Inta-37 apresentaram a maior similaridade, 43%.

De acordo com os resultados, foi possível verificar alta variabilidade entre as cultivares de marmeleiro, com apenas 43% de similaridade. Resultados semelhantes, de elevada variabilidade genética, foram observados por Bassil et al. (2011) entre 92 genótipos de marmeleiro e três intergenéricos para *x* marmelos híbridos [*x* *Pyronia veitchii* (Trab.) Guillaumin], embora os autores tenham utilizado marcadores SSR para este fim. Nesse contexto, Yamamoto et al. (2004) utilizaram 39 marcadores SSR de maçã e pera para diferenciar 20 cultivares de marmeleiro, que incluíram

três clones de Smyrna e dois de Kaori. Estes autores também identificaram grande variabilidade genética entre os genótipos de marmeleiro.

Para caracterizar a diversidade genética de 36 cultivares e seleções de marmeleiro, Halász et al. (2009) obtiveram 30 genótipos geneticamente diferentes. Porém, os SSR foram incapazes de diferenciar cultivares estreitamente relacionadas, como, por exemplo, Bereczki e Bereczki bôttermô, o que confirma a alta variabilidade genética entre cultivares de marmeleiro. Dumanoğlu et al. (2009) avaliaram variações clonais dentro de uma cultivar de marmeleiro (Kalecik), com uso de marcadores SSR, em cinco clones (1, 3, 4, 5 e 6), tendo utilizado as cultivares Esme e Quince A como genótipos padrões, e observaram que o clone 4 foi geneticamente distante dos demais (50%), o que sugere haver suficientes variações clonais dentro de 'Kalecik'.

Entre as 21 cultivares de marmeleiro estudadas, houve a distinção de dois grupos, um deles formado por quatro e outro por sete cultivares geneticamente relacionadas, e as cultivares CTS 207 e Mendonza Inta-37 apresentaram a maior similaridade (43%), o que é evidência da alta variabilidade genética da coleção de germoplasma avaliada.

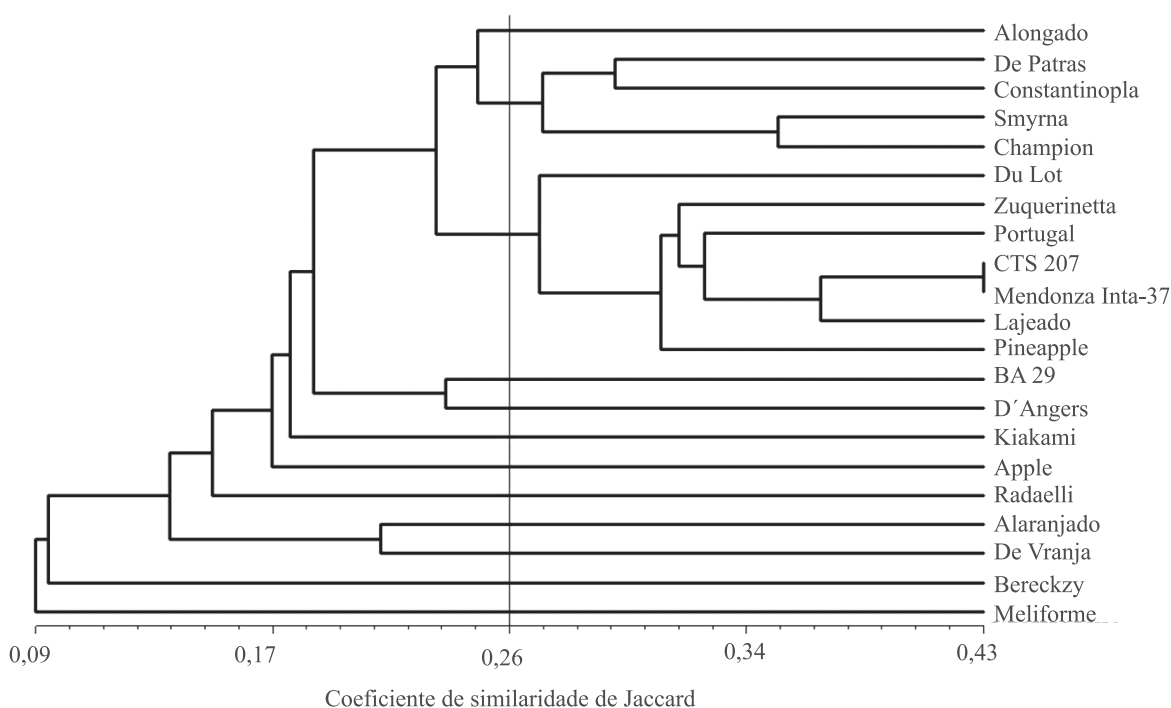


Figura 1. Dendrograma de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA) do coeficiente de similaridade de Jaccard, de 21 cultivares de marmeleiro.

Referências

- BASSIL, N.V.; POSTMAN, J.D.; HUMMER, K.E.; MOTA, J.; SUGAR, D.; WILLIAMS, R. Quince (*Cydonia oblonga*) genetic relationships determined using microsatellite markers. **Acta Horticulturae**, v.909, p.75-83, 2011.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.9, p.299-306, 2001. DOI: 10.1007/BF02772828.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- DUMANOĞLU, H.; GÜNEŞ, N.T.; AYGÜN, A.; ŞAN, B.; AKPINAR, A.E.; BAKIR M. Analysis of clonal variations in cultivated quince (*Cydonia oblonga* 'Kalecik') based on fruit characteristics and SSR markers. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v.37, p.113-120, 2009. DOI: 10.1080/01140670909510256.
- EVANS, R.C.; CAMPBELL, C.S. The origin of the apple subfamily (Maloideae; Rosaceae) is clarified by DNA sequence data from duplicated GBSSI genes. **American Journal of Botany**, v.89, p.1478-1484, 2002. DOI: 10.3732/ajb.89.9.1478.
- FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102p.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1998. 220p. (Embrapa-CENARGEN. Documentos, 20).
- HALÁSZ, J.; HOFFMANN, V.; SZABÓ, Z.; NYÉKI, J.; SZABÓ, T.; HEGEDŰS A. Characterization of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) cultivars using SSR markers developed for apple. **International Journal of Horticultural Science**, v.15, p.7-10, 2009.
- KÖPPEN, W.; GEIGER, R. **Klimate der Erde**. Gotha: Verlag Justus Perthes, 1928. Wall-map, 150 x 200 cm.
- LAYNE, R.E.C.; QUAMME, H.A. Pears. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University, 1975. p.38.
- LOCHARD, R.G.; SCHNEIDER, G.W. Stock and scion growth relationships and the dwarfing mechanism in apple. **Horticultural Reviews**, v.3, p.315-375, 1981. DOI: 10.1002/9781118060766.ch7.
- ROHLF, F.J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Port Jefferson: Applied Biostatistics, 2000. 38p.
- SCARAMUZZI, F. Contributo allo studio delle cultivar di cotogno da frutto. **Rivista della Ortoflorofruitticoltura Italiana**, v.41, p.575-615, 1957.
- WERTHEIM, S.J. Rootstocks for European pear: a review. **Acta Horticulturae**, v.596, p.299-309, 2002.
- YAMAMOTO, T.; KIMURA, T.; SOEJIMA, J.; SANADA, T.; BAN, Y.; HAYASHI, T. Identification of quince varieties using SSR markers developed from pear and apple. **Breeding Science**, v.54, p.239-244, 2004. DOI: 10.1270/jsbbs.54.239.

Recebido em 11 de dezembro de 2012 e aprovado em 17 de abril de 2013