

Marcadores moleculares para análise genética de germoplasma de pereira: uso na organização dos recursos genéticos e no melhoramento genético

Introdução

A pera é um dos itens mais importantes da pauta de importações de frutas do Brasil, destacando-se como a fruta mais importada para consumo in natura. Em 2009, a pera estava na lista das dez frutas mais produzidas no mundo (FAO, 2011; IBRAF, 2011). Um dos fatores que contribuem para a pequena produção de pera no país é a falta de cultivares adaptadas às condições edafoclimáticas do Sul do Brasil. O sucesso no desenvolvimento de cultivares melhoradas depende, entre outros aspectos, do apoio de um banco de germoplasma organizado, com diversidade genética conhecida e variabilidade para as características de interesse (COHEN et al., 1991; HOISINGTON et al., 1999; GEPTS, 2006). A Embrapa, nos últimos anos, vem desenvolvendo atividades para organizar, caracterizar e enriquecer o Banco Ativo de Germoplasma de Pera (BAG-Pera), visando dar suporte ao programa de melhoramento genético (OLIVEIRA et al., 2010).

O gênero *Pyrus* consiste de 22 espécies, originárias da Europa, de regiões de clima temperado da Ásia e de áreas de alto relevo na África, além de seis híbridos interespecíficos naturais. Dentre estes, *P. communis* e *P. pyrifolia* são as espécies mais disseminadas, enquanto *P. ussuriensis* e *P. x bretschneideri* apresentam importância regional (CHEVREAU; BELL, 2005; BELL; ITAI, 2011).

O BAG-Pera é formado por uma coleção principal, mantida a campo pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), com cerca de 200 acessos. Outras duas coleções são conservadas na Embrapa Uva e Vinho. A primeira constituída por 27 acessos mantidos no campo, e a segunda por 40 acessos, que foram introduzidos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, e estão sendo micropropagados para aclimação e enxertia a campo.

Diversos tipos de marcadores moleculares podem ser usados para a estimativa da diversidade genética mantida em bancos de germoplasma (KARP et al., 1997). Atividades apoiadas pela caracterização de recursos genéticos incluem a identificação de acessos duplicados e divergentes para uso em cruzamentos e o enriquecimento de coleções, especialmente quando os resultados das caracterizações morfológica e molecular são analisados em conjunto. Em pera, diferentes tipos de marcadores moleculares foram usados com propósitos variados, inclusive em estudos de diversidade genética (CHEVREAU et al., 1997; SAWAZAK et al., 2002; LEE et al., 2004; BAO et al., 2007; RITSCHHEL et al., 2008; EVANS et al., 2009; CAI et al., 2010; DEQUIGIOVANNI et al., 2012).

Marcadores RAPD são obtidos pela amplificação de segmentos de DNA por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) distribuídos ao acaso no genoma-alvo, com a utilização de iniciadores de oligonucleotídeos de sequência aleatória (WILLIAMS et al., 1990). Esses marcadores são definidos como dominantes, visto que um indivíduo homocigoto não é distinto do heterocigoto no mesmo loco. Um aspecto que facilita o acesso aos marcadores RAPD pelos laboratórios de análise

Bento Gonçalves, RS
Outubro, 2012

Autores

Ivan Dagoberto Faoro

Eng. Agr., Dr., Pesquisador
EPAGRI-EE Caçador,
Caçador, SC
faoro@epagri.sc.gov.br

Vera Quecini

Eng. Agr., Dr., Pesquisador
Embrapa Uva e Vinho,
Bento Gonçalves, RS
vera@cnpuv.embrapa.br

Paulo Ricardo Dias de Oliveira

Eng. Agr., Dr., Pesquisador
Embrapa Uva e Vinho,
Bento Gonçalves, RS
paulo@cnpuv.embrapa.br

Márcio Elias Ferreira

Eng. Agr., Dr., Pesquisador
Embrapa Recursos Genéticos
e Biotecnologia,
Brasília, DF
ferreira@cenargen.embrapa.br

Patricia Ritschel

Eng. Agr., Dr., Pesquisador
Embrapa Uva e Vinho,
Bento Gonçalves, RS
patricia@cnpuv.embrapa.br
Autor para correspondência

genética é a sua universalidade, o que significa que o mesmo grupo de primers RAPD pode ser usado para realizar a análise genética de espécies diferentes. Além disso, um número variável de bandas polimórficas pode ser observado com a aplicação de um único primer randômico, o que torna aconselhável o uso de marcadores RAPD com alta capacidade multiplex em uma análise extensiva do germoplasma de várias espécies, considerando-se, particularmente, a baixa relação custo/benefício (KARP et al., 1997).

Marcadores moleculares do tipo SSR (*Simple Sequence Repeat*) amplificam regiões do genoma que contêm DNA repetitivo por meio do uso de iniciadores específicos, sendo frequentemente multialélicos e segregando de modo co-dominante (LITT; LUTY, 1989). Por apresentarem alto conteúdo de informação de polimorfismo e extensa cobertura genômica, esses marcadores são muito usados em análise genética de bancos de germoplasma. Marcadores SSR desenvolvidos para uma determinada espécie podem ser usados em espécies geneticamente próximas, mas o grau de transferibilidade é bastante variável. O custo inicial do desenvolvimento de marcadores SSR em geral envolve um alto investimento de recursos humanos, financeiros e operacionais, especialmente quando bibliotecas enriquecidas para essas sequências são desenvolvidas e avaliadas para a seleção de marcadores informativos (RITSCHER et al., 2004). Contudo, quando as sequências dos marcadores SSR para uma espécie determinada estão disponíveis na literatura, o custo financeiro para aplicação desses marcadores é consideravelmente reduzido (POWELL, 1996; KARP et al., 1997). Mais recentemente, o sequenciamento de segunda geração (*Next Generation Sequencing*) vem possibilitando o desenvolvimento de marcadores microssatélites em abundância e a um custo baixo para espécies órfãs desses marcadores (SILVA et al., 2012).

O objetivo deste estudo foi o de ajustar as metodologias científicas para a obtenção de marcadores microssatélites e RAPD para análise genética do germoplasma conservado em coleções de pera, visando à organização dos recursos genéticos da espécie do Brasil e ao apoio de atividades de melhoramento genético.

Ajustes de protocolos para análise genética de coleções de germoplasma de pera usando marcadores moleculares RAPD e SSR

Material vegetal e extração do DNA

Para o ajuste das metodologias de análise de marcadores SSR e RAPD, foi utilizada uma amostra de 42 acessos, selecionados dentre os 200 acessos mantidos na coleção de germoplasma de pereira pela EPAGRI-EE Caçador. Durante a seleção dos acessos, buscou-se formar uma amostra o mais representativa possível, que incluísse variedades de origem europeia (*Pyrus communis*), asiática (*P. pyrifolia* e *P. ussuriensis*) e também variedades híbridas. A amostra foi composta pelos acessos listados na Tabela 1, conforme identificados no Banco Ativo de Germoplasma.

Amostras de tecidos coletados de folhas jovens de pera foram cortadas em tiras, maceradas em nitrogênio líquido e o DNA, extraído conforme descrito por Doyle e Doyle (1990). A quantificação do DNA extraído foi realizada por eletroforese em minigel (agarose 1%).

Marcadores SSR

Amplificação, separação e visualização de fragmentos gerados por PCR

Foram empregados iniciadores correspondentes a 62 locos SSR, desenvolvidos para as seguintes espécies frutíferas: cereja (um), pêssego (cinco), maçã (14) e pera (42). Esses marcadores foram anteriormente testados em acessos de pera (YAMAMOTO et al., 2001, 2002a,b,c). Com o objetivo de investigar-se o perfil de amplificação dos locos microssatélites e ajustar-se a temperatura de anelamento dos iniciadores, utilizou-se uma subamostra de seis acessos de pera ('Williams', 'Packham's', 'Kieffer', 'Carrick', 'Njisseiki' e 'Machiro') para os estudos preliminares.

Os locos SSR foram genotipados por amplificações de PCR ajustadas para um volume final de 13 μ L, contendo DMSO (5%), dNTP (0,25 mM de cada nucleotídeo), o par de iniciadores (0,3 μ M), Tris-HCl (10 mM, pH 9,0), MgCl₂ (1,5 mM), Taq polimerase (1 U) e 7,5 ng de DNA. As condições de amplificação foram: 94°C por 4 minutos, 29 ciclos de amplificação foram: 94°C por 1 minuto, 50–58°C (dependendo

Tabela 1. Lista de acessos de pera utilizados na análise com marcadores moleculares.

Identificação na Coleção	Identificação no Dendrograma	Tipo	Espécie
Bartlett	Bartlett	Ocidental	<i>P. communis</i>
Williams	Williams	Ocidental	<i>P. communis</i>
Packham's Triumph	Packhams	Ocidental	<i>P. communis</i>
Max Red Bartlett	MRBartlett	Ocidental	<i>P. communis</i>
Winter Bartlett	WBartlett	Ocidental	<i>P. communis</i>
Passe Crassane	PCrassane	Ocidental	<i>P. communis</i>
Beurre d'Anjou	BAnjou	Ocidental	<i>P. communis</i>
Curé	Curé	Ocidental	<i>P. communis</i>
Beurre Rose	BRose	Ocidental	<i>P. communis</i>
Beurre Hardy	BHardy	Ocidental	<i>P. communis</i>
Abate Fetel	AFetel	Ocidental	<i>P. communis</i>
Doyenné Du Comice	DComice	Ocidental	<i>P. communis</i>
Clapp's Favorite	CFavorite	Ocidental	<i>P. communis</i>
Triunfo	Triunfo	Híbrida	<i>P. communis</i> x (<i>P. communis</i> x <i>P. pyrifolia</i>)
Seleta	Seleta	Híbrida	<i>P. communis</i> x (<i>P. communis</i> x <i>P. pyrifolia</i>)
Le Conte	LConte	Híbrida	<i>P. communis</i> x <i>P. pyrifolia</i>
Kieffer	Kieffer	Híbrida	<i>P. communis</i> x <i>P. pyrifolia</i>
Okusankichi	OSankichi	Ocidental	<i>P. pyrifolia</i>
Suisei	Suisei	Ocidental	<i>P. pyrifolia</i>
Imamura Aki	IAki	Ocidental	<i>P. pyrifolia</i>
Shinsui	Shinsui	Ocidental	<i>P. pyrifolia</i>
Kousui	Kousui	Ocidental	<i>P. pyrifolia</i>
Nijisseiki	Nijisseiki	Ocidental	<i>P. pyrifolia</i>
Kikusui	Kikusui	Ocidental	<i>P. pyrifolia</i>
Shinka	Shinka	Ocidental	<i>P. pyrifolia</i>
Shinseiki	Shinseiki	Ocidental	<i>P. pyrifolia</i>
Housui	Housui	Ocidental	<i>P. pyrifolia</i>
Ya-li	YLi	Ocidental	<i>P. ussuriensis</i>
Tsu-li	TLi	Ocidental	<i>P. ussuriensis</i>
Hachiko	Hachiko	Ocidental	Desconhecida
Machiro	Machiro	Ocidental	Desconhecida
Pirus 1	Pirus1	-	Desconhecida
Pirus 3	Pirus3	-	Desconhecida
Pirus 4	Pirus4	-	Desconhecida
Pirus 5	Pirus5	-	Desconhecida
Pirus 7	Pirus7	-	Desconhecida
Pirus 8	Pirus8	-	Desconhecida
Pirus 9	Pirus9	-	Desconhecida
Madame Sieboldt	MSieboldt	-	Desconhecida
Óstia1	Óstia1	-	Desconhecida
Óstia2	Óstia2	-	Desconhecida
Pera d'água	PÁgua	-	Desconhecida

do iniciador) por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 7 minutos. As reações foram realizadas em um aparelho MJ Research Thermocycler PTC 100, com cada par de iniciadores de locos microssatélites em várias temperaturas de anelamento, na faixa entre 50°C e 58°C, para determinação da mais adequada.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de poli-acrilamida desnaturante a 6% e ureia 7 M em TBE 1X, nas dimensões de 20 cm × 34 cm × 0,4 mm. A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 45 watts e os fragmentos visualizados por coloração com nitrato de prata. Os alelos nos locos selecionados foram identificados pelo número de pares de bases, estimados com base em padrões de tamanhos de fragmentos conhecidos.

Caracterização e seleção de marcadores

Um grupo de 23 marcadores polimórficos, reproduzíveis nas condições padronizadas, foi selecionado a partir dos 62 marcadores identificados na literatura e testados na subamostra de seis acessos de pera (Tabela 2). Esses marcadores foram, então, aplicados na amostra de 42 acessos do BAG-Pera.

As frequências alélicas dos diferentes locos foram estimadas utilizando-se o programa GDA-Genetic Data Analysis (LEWIS; ZAYKIN, 2011). Construiu-se um banco de dados das frequências alélicas com os 23 locos polimórficos genotipados em 42 acessos de pera. As heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e) e parâmetros genéticos, como a faixa de tamanho e o número de alelos, também foram estimadas para cada loco SSR, com o uso do

Tabela 2. Caracterização dos locos SSR estudados (Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS).

Loco ¹	Alelo ²	F ³	TA ⁴	He ⁵	Ho ⁶	PIC ⁷	Loco ¹	Alelo ²	F ³	TA ⁴	He ⁵	Ho ⁶	PIC ⁷				
CH01B12	120	0,01	56	0,61	0,68	0,57	CH02D11	100	0,33	54	0,73	0,33	0,66				
	125	0,59						110	0,28								
	130	0,18						120	0,31								
	135	0,10						130	0,03								
	140	0,08						135	0,01								
	155	0,04						150	0,03								
	165	0,01						160	0,01								
CH01H01	135	0,03	54	0,89	0,95	0,87	CH02F06	130	0,31	56	0,76	0,29	0,71				
	145	0,03						140	0,27								
	160	0,13						150	0,16								
	175	0,09						160	0,23								
	180	0,19						175	0,01								
	185	0,11						185	0,01								
	190	0,13					CH2B10	120	0,16	54	0,78	0,80	0,74				
	195	0,06						125	0,28								
	210	0,04						130	0,16								
	215	0,14						135	0,30								
CH02B03	115	0,01	54	0,81	0,46	0,76	140	0,05	54	0,57	0,51	0,48					
	125	0,04					150	0,01									
	130	0,16					155	0,02									
	140	0,03					165	0,01									
	145	0,01					KA14	280					0,39	54	0,62	0,77	0,57
	150	0,14						290					0,52				
	160	0,26						300					0,09				
	170	0,30					KA16	150					0,02	54	0,62	0,77	0,57
	180	0,04						155					0,22				
							160	0,57									

Continuação Tabela 2. Caracterização dos locos SSR estudados (Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS).

Loco ¹	Alelo ²	F ³	TA ⁴	He ⁵	Ho ⁶	PIC ⁷	Loco ¹	Alelo ²	F ³	TA ⁴	He ⁵	Ho ⁶	PIC ⁷	
KA16	165	0,05	56	0,74	0,90	0,68	NH021	145	0,04	54	0,81	0,48	0,78	
	170	0,13						150	0,22					
	180	0,02						155	0,02					
KA4B	100	0,30	56	0,72	0,53	0,66		160	0,18					
	110	0,22						165	0,15					
	160	0,33						170	0,16					
	180	0,15						175	0,04					
KU10	130	0,32	56	0,88	0,93	0,86		180	0,02					
	140	0,39						NH022	190					0,01
	150	0,09							200					0,01
	160	0,16					205		0,06					
	170	0,04					210		0,30					
NB105	140	0,06	56	0,63	0,22	0,54	220		0,19					
	145	0,04					NH023A	230	0,18					
	150	0,14						250	0,02					
	155	0,21						270	0,02					
	160	0,11						NH026A	130	0,43				
	165	0,06							145	0,15				
	170	0,08							150	0,11				
	175	0,13							155	0,15				
	180	0,16							160	0,10				
NB109A	170	0,01	56	0,66	0,55	0,62		165	0,06					
	195	0,02					NH027A	160	0,02					
	200	0,01						165	0,01					
	210	0,46						170	0,34					
	220	0,06						180	0,13					
	230	0,02						190	0,21					
	240	0,40						NH029	130	0,02				
NB11	110	0,08	56	0,59	0,32	0,52			135	0,12				
	120	0,02					140		0,01					
	125	0,05					145		0,02					
	130	0,01					150		0,10					
	135	0,55					155	0,07						
	140	0,02					160	0,35						
	145	0,20					165	0,01						
	150	0,03					170	0,26						
170	0,01	175	0,02											
185	0,02	185	0,01											
190	0,01	NH021	140	0,15										
NH013	235		0,13	54	0,59	0,32	0,52	120	0,05					
	240		0,59					140	0,07					
	250		0,24					150	0,09					
	260		0,01					160	0,17					
	300	0,02	170					0,28						

Continuação Tabela 2. Caracterização dos locos SSR estudados (Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS).

Loco ¹	Alelo ²	F ³	TA ⁴	He ⁵	Ho ⁶	PIC ⁷	Loco ¹	Alelo ²	F ³	TA ⁴	He ⁵	Ho ⁶	PIC ⁷
NH029	180	0,17					NZ2814	150	0,22				
	190	0,13						160	0,20				
NH030	190	0,01	52	0,82	0,65	0,78		170	0,30				
	200	0,01						180	0,22				
	210	0,08					RGL1	215	0,01	52	0,80	0,73	0,75
	220	0,16						220	0,03				
	230	0,09						230	0,03				
	240	0,26						240	0,04				
	250	0,01						250	0,16				
	260	0,09						260	0,26				
270	0,28					270		0,30					
270	0,28					280		0,18					
NZ2814	130	0,02	52	0,78	0,41	0,73							
	135	0,05											

¹ Locos com prefixos NZ e CH foram transferidos de maçã para pera e locos com prefixos KA, KB, KA, KU, NH, NB e RGL foram originalmente desenvolvidos para pera.

² Tamanho do fragmento em pb.

³ Frequência do alelo.

⁴ Temperatura de anelamento em °C.

⁵ Heterozigosidade esperada.

⁶ Heterozigosidade observada.

⁷ *Polymorphism Information Content*.

programa GDA. A porcentagem de Ho foi calculada como a proporção entre os genótipos heterozigotos individuais e o número total de heterozigotos analisados em cada loco. A He foi estimada com base na probabilidade de dois indivíduos, tomados ao acaso em uma dada amostra, apresentarem alelos diferentes em um loco (NEI, 1987). O parâmetro PIC (*Polymorphism Information Content*) foi estimado com base na probabilidade de que um indivíduo seja informativo em relação à segregação de seus alelos herdados (BOTSTEIN et al., 1980).

Não foi observada a transferibilidade dos marcadores desenvolvidos para cereja e pêssego para a subamostra de pera. Por outro lado, foi observada a produção de fragmentos de amplificação em 50% dos marcadores desenvolvidos para maçã e de 70% dos marcadores desenvolvidos para pera.

Os marcadores selecionados já haviam sido testados com sucesso na amplificação do DNA de pera (YAMAMOTO et al., 2001, 2002a,b,c). Como o objetivo final deste trabalho é a identificação de marcadores SSR para análise genética de acessos de pera do Banco de Germoplasma, procurou-se

padronizar as condições de extração do DNA e do protocolo de amplificação, variando-se apenas a temperatura de anelamento. A ausência de produtos de amplificação para alguns marcadores significa que as condições padronizadas neste trabalho não são adequadas para sua amplificação. No processo de seleção de marcadores SSR para análise genética do BAG-Pera, além do nível de polimorfismo no loco testado, foram considerados outros critérios, como estabilidade e reprodutibilidade de cada marcador.

Foi observado um elevado nível de polimorfismo na amostra analisada, esperado em um gênero auto-incompatível, como *Pyrus* (YAMAMOTO et al., 2001, 2002a,b; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2006; BAO et al., 2007; WÜNSCH; HORMAZA, 2007). O número de alelos por loco variou de três (KA14) a 11 (NH027A, NH021, CH01H01 e NB11) (Figura 1). A heterozigosidade esperada variou de 0,57 (KA14) a 0,89 (CH01H01), enquanto que a média da heterozigosidade observada foi de 0,56 (Tabela 2).

Com o objetivo de identificar-se um subgrupo de marcadores capaz de distinguir acessos individuais e

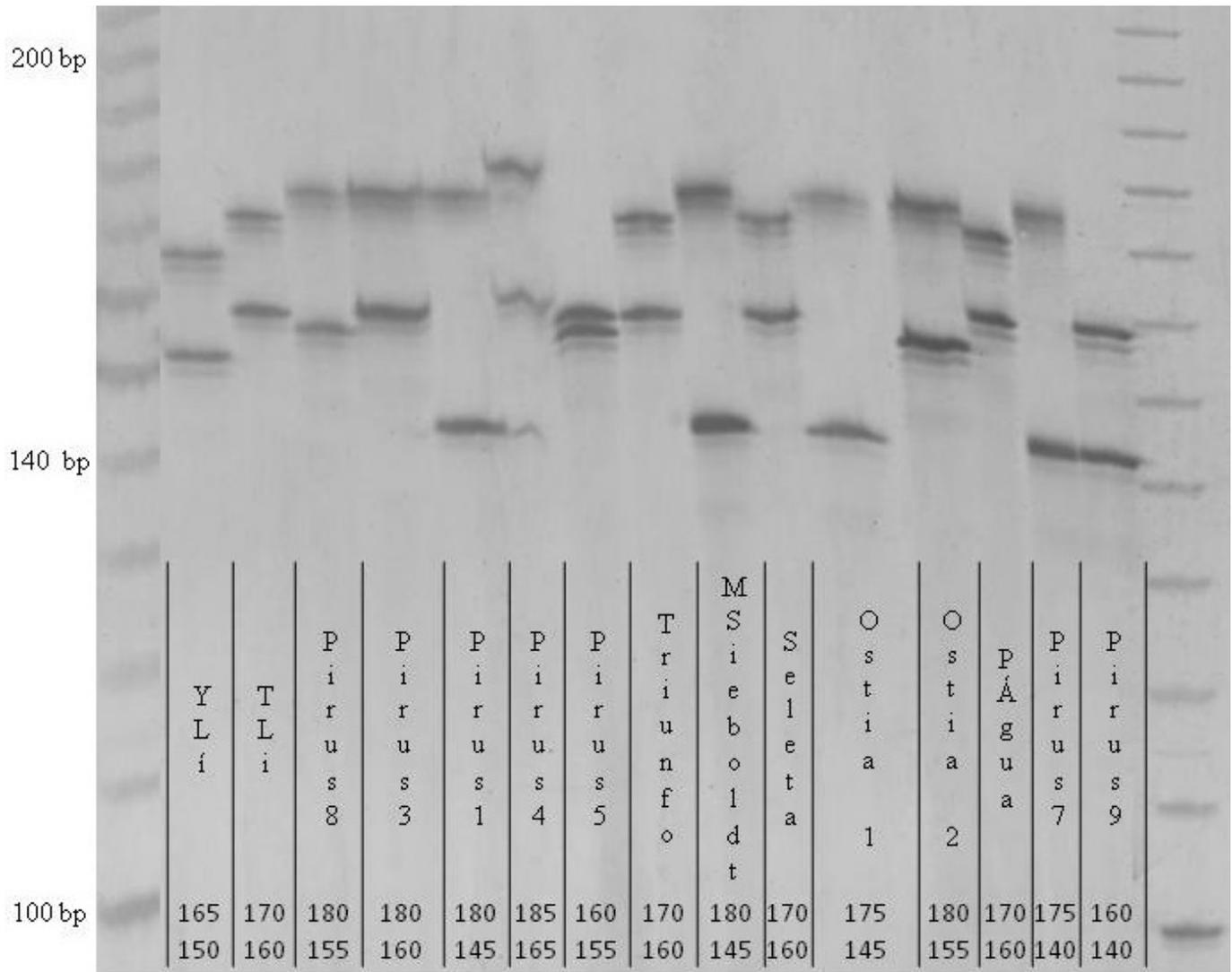


Fig. 1. Gel de poliacrilamida mostrando a variação no tamanho dos fragmentos amplificados com a utilização do marcador SSR NB105 em acessos do BAG-Pera. Cada pista é identificada com o nome do acesso e com os tamanhos dos fragmentos que os caracterizam com a utilização do marcador NB105. Os dez produtos de amplificação obtidos com este marcador na amostra analisada são mostrados na Figura. Observar a diferença clara entre os acessos Óstia1 e Óstia2.

permitir a realização da análise de agrupamento com eficácia similar ao grupo completo de marcadores, foram calculadas as estimativas de Probabilidades de Identidade (PI_i) individuais e combinadas. Os marcadores foram inicialmente classificados com base nos valores mais altos de PIC, H_e e PI_i individuais. A Probabilidade de Identidade (PI_i), expressa como a probabilidade de que, dado o genótipo de um indivíduo, um segundo indivíduo venha a ter o mesmo genótipo, foi calculada como $PI_i = \sum p_i^4 + \sum (2p_i p_j)^2$ (SEFC et al., 1999). Valores combinados de PI_i para marcadores selecionados ao acaso no grupo completo foram estimados usando-se o procedimento de reamostragem (*bootstrapping*)

do programa Excel add-in Resampling Stats v. 3,0. Um subgrupo de 11 locos SSR (CH01H01, CH02B03, NH021, NH023A, RGL1, KA4B, NB105, NH027A, NH029, NH030, NZ2814) foi selecionado para estimar o potencial dos marcadores escolhidos para distinção dos acessos de pera e para agrupá-los de acordo com sua origem europeia, japonesa ou chinesa (Figura 3A).

A estimativa de PI_i combinado para esse subgrupo foi de $2,46 \times 10^{-16}$, indicando que o subgrupo de 11 marcadores pode ser usado para diferenciar acessos de pera de maneira eficiente. O subgrupo foi usado para investigações posteriores da

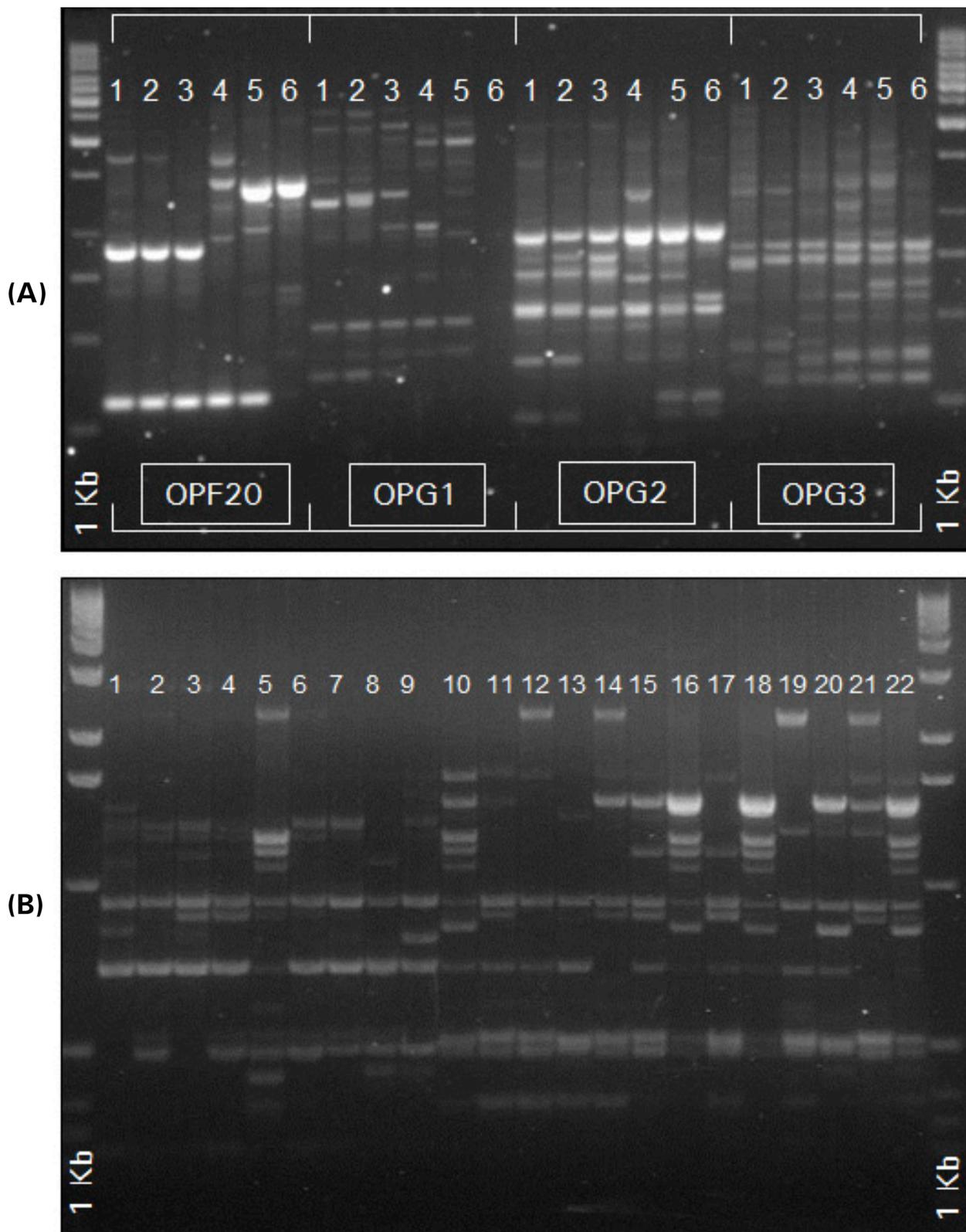


Fig. 2. (A) **Seleção de marcadores RAPD:** Foram avaliados 160 'primers' randômicos (Operon Technologies, USA) em uma subamostra de 6 acessos de pera (pistas: 1: Packham's; 2: Williams; 3: Kieffer; 4: Oku Sankishi; 5: Housui; 6: Tzu-Li). Aqueles que geraram marcas polimórficas e consistentes foram selecionados para a análise da amostra completa. As seqüências dos 'primers' estão disponíveis mediante solicitação. (B) **Produtos da amplificação do 'primer' RAPD OP-J13.** Foram selecionados 11 'primers' randômicos, com base na consistência das marcas polimórficas geradas, para a análise genética do BAG-Pera. Na Figura, são mostrados os perfis genéticos de 22 dos 42 acessos de pera estudados, obtidos com a aplicação do marcador OP-J13 (pistas 1: Gold Nijisseiki; 2: Machiro 3: Hachiko; 4: Housui; 5: Ya-Li; 6: Tzu-Li; 7: Carrick; 8: Le Conte; 9: Kieffer; 10: Pirus1; 11: Pirus3; 12: Pirus4; 13: Pirus5; 14: Pirus7; 15: Pirus8; 16: Pirus9; 17: Triunfo; 18: Madame Sieboldt; 19: Seleta; 20: Óstia1; 21: Óstia2; 22: Pera d'Água).

amostra de 42 acessos com base em sua origem, europeia, japonesa ou chinesa. O PId estimado para o subgrupo de marcadores considerando somente peras de origem europeia, foi de $1,95 \times 10^{-14}$, enquanto o PId para as peras de origem japonesa foi de $1,36 \times 10^{-9}$.

Marcadores RAPD

Amplificação, separação e visualização de fragmentos gerados por PCR

As amplificações do DNA para identificação de marcadores RAPD foram realizadas por PCR, em volume de 13 μ L, contendo 1,04 μ g/ μ L de BSA purificada, 0,25 mM de cada dNTP, 0,5 μ M de iniciador, 10 mM de Tris-HCl (pH 9,0), 1,5 mM de $MgCl_2$, 1U de Taq polimerase e 7,5 ng de DNA extraído de pera. As condições de amplificação foram 1' a 94°C, 1' a 35°C e 2' a 72°C por 40 ciclos e um passo final de extensão de 72°C por 5'. Os produtos de amplificação foram separados em gel horizontal de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio. A eletroforese foi realizada à voltagem constante (100 volts) durante 4-5 horas. Os géis foram visualizados em um fotodocumentador "Eagle Eye II".

Caracterização e seleção de marcadores

Cento e sessenta iniciadores randômicos (Operon Technologies, USA) foram utilizados para a seleção de polimorfismos em uma subamostra de seis acessos de pera, composta por dois acessos de origem europeia ('Packham's' e 'Williams'), um acesso híbrido ('Kieffer') e três acessos de origem asiática ('Oku Sankishi', 'Housui' e 'Tzu-Li') (Figura 2A). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores estão disponíveis mediante solicitação.

Dentre os iniciadores estudados, foram escolhidos 11 marcadores polimórficos, que foram usados nas reações de PCR para amplificação do DNA da amostra completa (Tabela 3; Figura 2B). O padrão polimórfico gerado nessa fase foi, então, comparado ao padrão gerado na fase de seleção de iniciadores, com o objetivo de monitorar-se a repetibilidade dos dados.

Quando o padrão era idêntico, o marcador era considerado para análise, o que resultou em 87 fragmentos RAPD polimórficos e consistentes, que foram analisados para presença/ausência, na construção de uma matriz binária.

Para estimar o nível de informação oferecido pelos marcadores RAPD usados na análise de agrupamento, foi calculado um índice de marcador, conforme descrito por Powell et al. (1996).

O número total de fragmentos polimórficos gerados pelos marcadores e usados na análise de agrupamento foi de 87, variando entre quatro e 10 marcas por iniciador, com média 7,7. O polimorfismo revelado por essas marcas foi estimado pela heterozigosidade esperada, que variou entre 0,48 e 0,87. O índice de marcador, que considera tanto o número de marcas polimórficas quanto a heterozigosidade esperada, foi calculado para estimar o nível de informação de cada marcador RAPD e variou entre 2,8 e 8,7 (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização dos marcadores RAPD usados na análise de diversidade de 46 acessos de germoplasma de pera.

Marcador RAPD	Hav ¹	E ²	IM ³
OP-G4	0,87	10	8,7
OP-J13	0,80	10	8,0
OP-I14	0,72	10	7,2
OP-K11	0,70	10	7,0
OP-J1	0,79	8	6,3
OP-I16	0,81	7	5,7
OP-L2	0,76	7	5,3
OP-I1	0,87	6	5,2
OP-H11	0,80	6	4,8
OP-F13	0,48	6	2,9
OP-L12	0,70	4	2,8

¹ Hav = Heterozigosidade esperada.

² E = Razão multiplex efetiva.

³ Índice de marcador (Powell et al., 1996).

Exemplos de aplicações dos marcadores moleculares estudados

Estimativas de distância genética entre acessos mantidos em coleções de germoplasma

Marcadores SSR

As similaridades genéticas entre acessos de pera, com base no polimorfismo de marcadores SSR, foram estimadas pelo coeficiente "band" (LYNCH, 1990). As estimativas foram baseadas na soma da proporção de alelos comuns entre dois acessos de pera, dividida pelo dobro do número de alelos testados (LYNCH,

1990; BOWCOCK et al. 1994; GOLDSTEIN et al 1995). As distâncias genéticas foram obtidas com o uso do programa NTSYS 2.02 (ROHLF, 1992). A matriz diagonal foi usada na análise de agrupamento por Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA), o que possibilitou a construção de um dendrograma (ROHLF, 1992). A análise de agrupamento foi realizada considerando o grupo de 23 e o subgrupo de 11 marcadores. A comparação entre os dendrogramas gerados com o grupo de 23 marcadores e o subgrupo de 11 marcadores foi realizada pela análise do coeficiente de correlação de Spearman, estimado para as matrizes genéticas de distância e pela estatística "K tree score", um método que mede as diferenças totais entre o comprimento relativos dos braços e a topologia de árvores filogenéticas (SORIA-CARRASCO et al., 2007).

Os dendrogramas resultantes foram similares, ambos apresentando agrupamentos distintos para os acessos de origem europeia, japonesa e chinesa (Figure 3A). Além disso, o coeficiente de correlação de Spearman entre as matrizes de diversidade genética construídas com 23 e 11 locos SSR foi de 0,9367 e o escore K entre os dendrogramas gerados foi de 0,557, indicando topologia e comprimentos de braços similares.

Os valores do coeficiente de similaridade "band" variaram entre 0,09 e 1,00. Valores próximos de 1,00 representam genótipos muito similares, considerando o grupo de marcadores empregado. Os resultados da análise SSR refletem a classificação botânica e o contexto genômico dos acessos investigados. Assim, três grupos principais foram formados, consistindo de "peras europeias", "peras japonesas" e "peras chinesas" (Figura 3A).

No grupo das peras europeias, foram incluídos os acessos classificados como *P. communis*. As informações sobre origem e genealogia apresentadas a seguir foram obtidas em Hendrick (1921), Delbard (1947), Campo-Dall'orto et al. (1996) e no banco de dados americano GRIN, o Germplasm Resources Information Network (UNITED..., 2011).

O primeiro subgrupo é formado por cinco acessos relacionados à tradicional cultivar de origem inglesa, 'Bon Chrétien Williams', originada em 1770 e propagada sob o nome curto de Williams. Esse

nome foi perdido durante a introdução nos EUA, por volta de 1799, onde ficou conhecida como 'Bartlett', nome do viveirista que a propagou naquele país. No dendrograma, destacam-se três materiais que apresentaram similaridade total. Os acessos 'Williams' e 'Bartlett' correspondem à variedade europeia de pera Bon Chrétien Williams e foram introduzidos no BAG-Pera em épocas distintas, sob os nomes europeu e americano, representando uma duplicação. O valor estimado de PId para o genótipo comum de 'Bartlett' e 'Williams' é $1,49 \times 10^{-12}$. A terceira cultivar, 'Max Red Bartlett', é descrita como uma mutação somática de 'Bon Chrétien Williams'.

Apesar do nome em comum sugerir que 'Winter Bartlett' também seja uma mutação, essa cultivar provavelmente originou-se a partir de uma planta oriunda de semente derivada de 'Bon Chrétien Williams', por volta de 1880. Sua semelhança com peras do grupo Bartlett e os resultados obtidos neste trabalho oferecem suporte a essa hipótese. O quinto acesso desse subgrupo, 'Packham's Triumph', foi selecionado por volta de 1886-7, a partir de um cruzamento realizado na Austrália entre 'Uvedale St. Germain' e 'Bon Chrétien Williams'.

Em seguida, ficaram agrupados oito acessos que estão relacionados a cultivares originadas no continente europeu. Sete acessos originaram-se na França, durante os séculos XVIII e XIX. A exceção é 'Clapp's Favorite', resultado de um cruzamento realizado nos EUA, entre 'Flemish Beauty', originária de uma planta oriunda de semente descoberta na Bélgica no começo do século XIX, e 'Bartlett'. 'Curé' foi descoberta por um pastor francês ("curator"), crescendo naturalmente na região de Villiers-en-Brenne. Em seguida, foi introduzida na Inglaterra pelo vigário de Winkfield, nome pelo qual é mais conhecida atualmente ('Vicar of Winkfield'). 'Beurre Rose' é descrita na literatura como uma cultivar francesa, mas sua genealogia não é mencionada. 'Passe Crassane' foi selecionada a partir de uma amostra de sementes em Rouen, por volta de 1845. Beurre d'Anjou é uma cultivar supostamente originária da região de Angers, tendo sido introduzida na Inglaterra e nos EUA ainda no século XIX. 'Abate Fetel' originou-se na França, em 1866; sua genealogia não é mencionada. 'Beurre Hardy' é uma pera francesa, selecionada por volta de 1820, na região de Boulogne-sur-Mer. A partir de 1840, foi propagada por um viveirista parisiense, que a

nomeou em homenagem a M. Hardy, diretor do Jardim Botânico de Luxemburgo. 'Doyenne du Comice', que foi selecionada em uma das primeiras sementeiras do "Comice Horticole", em Angers, em 1849, agrupou-se com híbridos e peras de origem desconhecida, sugerindo a presença de ancestrais não europeus.

Um subgrupo, dentro do grupo das peras de origem europeia, incluiu acessos de natureza sabidamente híbrida, como 'Le Conte', 'Kieffer' (*P. communis* x *P. pyrifolia*) (UNITED ..., 2011), 'Triunfo' e 'Seleta' [*P. communis* x (*P. communis* x *P. pyrifolia*)] (CAMPO-DALL'ORTO et al., 1996; SAWASAKI et al., 2001), e todos os materiais de origem e/ou genealogia desconhecidos. Esse grupo mostrou-se mais relacionado com o grupo de peras europeias do que com o grupo de peras orientais, provavelmente por influência de acessos que apresentam maior proporção de contexto genômico europeu, como as cultivares lançadas pelo Instituto Agrônomo de Campinas, 'Triunfo' e 'Seleta'. Não foram encontradas informações sobre a genealogia dos acessos 'Madame Sieboldt', 'Óstia1' e 'Óstia2' e da série 'Pirus'. Pelo posicionamento desse grupo no dendrograma, provavelmente apresentam proporções diferentes de germoplasma ocidental e oriental, com predominância de ocidental.

Os acessos denominados de 'Óstia1' e 'Óstia2', que possuem registros distintos no BAG-Pera com o mesmo nome (Óstia), e que se supunha serem duplicatas, ficaram posicionados no mesmo grupo, mas apresentaram algumas diferenças claramente identificadas, e, portanto, representam acessos distintos (Figuras 1 e 3A).

No grupo das peras japonesas, ficaram posicionados os acessos classificados como *P. pyrifolia* e dois acessos cuja classificação se desconhece. As informações sobre genealogia e origem foram recuperadas em Sawamura et al. (2004), Campo-dall'Orto et al. (1996) e no banco de dados americano GRIN (UNITED ..., 2011).

Os acessos desse grupo ficaram bastante próximos, o que é explicado pela forma de obtenção. Com exceção de 'Okusankishi', 'Nijisseiki' e 'Imamura Aki' que são cultivares antigas, quase todos os acessos de peras japonesas que compõem a amostra estão relacionados a cultivar 'Nijisseiki'.

'Okusankishi' é uma antiga cultivar japonesa, obtida a partir de uma planta originária de semente da cultivar 'Wasesankichi', descoberta na cidade de Niigata. 'Nijisseiki', ou 'Século XX', em português, e 'Imamura Aki' foram selecionadas a partir de amostras de sementes de origem desconhecida, no distrito de Matsudo, em 1888, e na região de Takoaka, distrito de Kochi, no Japão, respectivamente.

A maior parte dos acessos restantes foi obtida pelo programa de melhoramento genético japonês a partir de cruzamentos realizados por volta dos anos 1940-50, com exceção de 'Shiko', que se originou de uma planta oriunda da semente de 'Nijisseiki'. Cruzamentos envolvendo a cultivar de pera Kikusui ('Taihaku' x 'Nijisseiki') deram origem à cultivar 'Kousui' ('Kikusui' x 'Wasekoso'), em 1941; à cultivar 'Suisei' ('Kikusui' x 'Yakumo'), em 1955; à cultivar 'Shinsui' ('Kikusui' x 'Kimizukawase'), em 1947; e à cultivar Housui ['Kikusui' x ('Ishiiwasi' x 'Nijisseiki')], realizado em 1954. 'Shinseiki' ou 'Novo Século', em português, é resultado do cruzamento entre 'Nijisseiki' e 'Chojuro', realizado em 1945, na região de Okayama.

'Hachiko' e 'Machiro', dois acessos que produzem peras do tipo oriental e sobre as quais não foram encontradas informações sobre classificação, origem e genealogia, ficaram posicionados nesses grupo.

No último grupo, encontram-se as cultivares chinesas Ya-lí e Tsu-li, de genealogia incerta, pertencentes à espécie *P. ussuriensis*. Ya-lí é uma cultivar antiga, comum no nordeste da China, enquanto Tsu-li vem sendo cultivada no norte da China durante séculos (UNITED..., 2011).

Marcadores RAPD

O programa NTSYS foi usado para estimar a similaridade entre acessos, com base nos marcadores RAPD, e para classificá-los usando o algoritmo UPGMA (ROHLF, 1992). Para a estimativa das similaridades entre os acessos, foi usado o coeficiente DICE, recomendado para dados binários e adequado para uso em análises RAPD já que, no cálculo desse coeficiente, a ausência de uma marca RAPD específica não é interpretada como a presença de "alelo" nos

acessos analisados. Após a obtenção da matriz de similaridades, os dados foram agrupados pelo método UPGMA, sendo construído um dendrograma para visualização e interpretação dos resultados (Figura 3B).

A amplitude da diversidade estimada foi menor do que a observada com marcadores SSR, o que é esperado considerando-se as características de cada tipo de marcador. Os valores do coeficiente de similaridade DICE variaram de 0,40 a 1,00. Valores próximos a 1,00 indicam indivíduos similares, considerando-se o conjunto de marcadores analisados. A análise de agrupamento gerou um dendrograma em que as variedades europeias, híbridas e asiáticas também formaram grupos distintos, como o que se observou na análise com marcadores SSR (Figura 3B). Foram observadas discrepâncias dentro dos principais grupos com os dois tipos de marcadores, como o posicionamento de materiais identificados como do tipo ocidental, 'Doyenné du Comice' e 'Carrick', e oriental, Imamura Aki, no grupo das variedades híbridas.

No grupo das europeias, confirmou-se a identidade única de acessos registrados com nomes diferentes; 'William's' e 'Bartlett', que correspondem à variedade europeia Bon Chretien Williams (sinonímia: "Williams – Bartlett de Boston"). O acesso 'Max Red Bartlett', mutação somática de 'Bon Chrétien Williams' também apresentou similaridade total com esses acessos (Figura 3B).

Os materiais asiáticos formaram um grupo bem definido que incluiu todos os acessos, com exceção de 'Imamura Aki'. As variedades chinesas, que pertencem à espécie *P. ussuriensis*, puderam ser diferenciadas das japonesas (*P. pyrifolia*).

Juntamente com as variedades híbridas, resultado do cruzamento entre *P. communis* e *P. pyrifolia*, também foram agrupados acessos suspeitos de apresentarem também natureza híbrida, cuja genealogia não foi totalmente recuperada (Pirus1, Pirus3, Pirus4, Pirus5, Pirus7, Pirus8, Pirus9, Madame Sieboldt, Óstia1, Óstia2 e Pera D'água). A análise RAPD também confirmou que as entradas Óstia1 e Óstia2 são acessos diferentes (Figura 2B e Figura 3B).

Identificação de acessos de pereira por meio de marcadores moleculares SSR

A maneira como o BAG-Pera foi formado, por meio da reunião de antigas coleções e pela importação de genótipos de interesse, pode resultar na introdução de acessos com falsas identificações. É possível a ocorrência de introduções do mesmo genótipo com nomes distintos, ou de genótipos distintos com o mesmo nome. Os exemplos descritos acima dos acessos identificados como 'William's' e 'Bartlett' e também daqueles identificados como "Óstia" demonstraram o poder de resolução de marcadores SSR e RAPD na solução de questões de identidade genética. Procedimentos de multiplicação de materiais, especialmente de subcultivos de coleções in vitro realizados em rotina, podem resultar em suspeitas de troca de identificação. Assim, é importante dispor de ferramentas que, rapidamente, possam resolver essas questões.

Confirmação das identidades dos acessos 'William's' e 'Ya-lí'

Durante o processo de propagação das cv. William's e 'Ya-lí' na coleção in vitro conservada pela Embrapa Uva e Vinho, houve a suspeita de troca de identificação, já que, após a aclimatação, no início de desenvolvimento das plântulas de 'William's', foram observadas características morfológicas semelhantes às da cv. 'Ya-lí'.

Para solucionar tal dúvida, foram usados os marcadores SSR 'RGL-1' e 'NH0027a' conforme o protocolo ajustado e descrito neste documento.

O resultado dos produtos de amplificação de PCR com o marcador 'RGL-1' pode ser visualizado na Figura 4A. Os acessos sob suspeita são totalmente similares a cultivar William's, não se confirmando, portanto, a troca de etiquetas. Os resultados obtidos com o marcador NH0027a foram similares.

Assim, descartou-se a suspeita de troca de etiquetas durante os procedimentos de multiplicação.

Diferenciação genética de acessos denominados 'Japonesa' e 'Ya-lí'

Durante a caracterização de germoplasma, na coleção mantida a campo pela EPAGRI-Caçador, surgiram dúvidas sobre a identidade do acesso

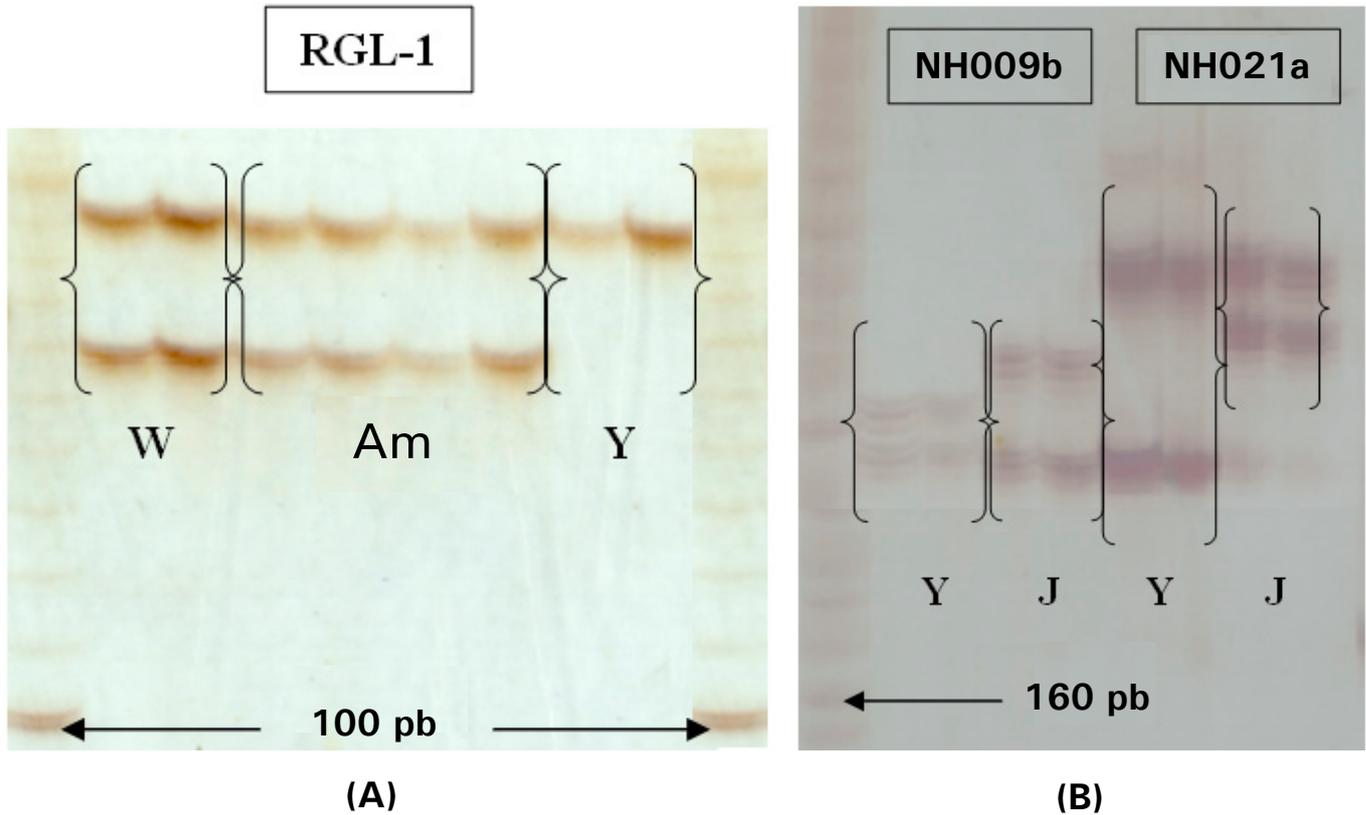


Fig. 4. Questões de identidade genética de acessos de pera, surgidas durante atividades de rotina de conservação e caracterização do BAG-Pera foram resolvidas com a aplicação dos marcadores selecionados neste trabalho. Para maiores detalhes, veja o texto. (A) Gel de poliacrilamida denaturante com marcador RGL-1. Da esquerda para direita: pistas 1 e 2: 'William's (W)'; pistas 3, 4, 5 e 6: Am: amostras suspeitas; e pistas 7 e 8: 'Ya-lí' (Y). (B) Gel de poliacrilamida denaturante com marcadores SSR NH021a e NH009b. Da esquerda para direita: Marcador SSR NH009b: pistas 2 e 3: 'Ya-lí' (Y)'; pistas 4, 5; 'Japonesa' (J); Marcador NH021a: pistas 6 e 7: 'Ya-lí' (Y); pistas 8 e 9: 'Japonesa' (J).

denominado 'Japonesa', já que os resultados das avaliações agromorfológicas desses acessos e da cultivar Ya-lí, de origem chinesa, eram bastante semelhantes.

Para solucionar essa dúvida, foram usados os marcadores SSR 'NH021a', 'NH009', 'NB105' e 'NB109', conforme o protocolo ajustado e descrito neste documento.

Na Figura 4B, são apresentados os genótipos obtidos com a amplificação dos DNAs de 'Japonesa' e cv. Ya-lí com os marcadores SSR NH021a e NH009. As amostras se apresentaram diferentes, confirmando que os dois acessos mantidos pelo Banco de Germoplasma de Pera, portanto, representam acessos geneticamente distintos. Esse resultado foi confirmado com a utilização dos marcadores NB105 e NB109.

Marcadores moleculares SSR na confirmação de híbridos resultantes do cruzamento de pereira 'Housui' x 'Abate Fetel'

No programa de melhoramento de pera são realizados cruzamentos entre plantas selecionadas, visando-se à obtenção de híbridos com características agrônomicas de interesse. Durante a realização desses cruzamentos, podem ocorrer escapes, resultantes de autofecundações. Além disso, já foi relatada a ocorrência de apomixia em frutíferas como pereiras e macieiras. Na rotina de hibridizações, a ocorrência de apomixia e escapes resultantes de autofecundações não são desejáveis, já que levam à obtenção de falsos híbridos. Com o objetivo de confirmar-se a natureza híbrida de indivíduos resultante do cruzamento 'Housui' x 'Abate Fetel' foram usados marcadores moleculares SSR.

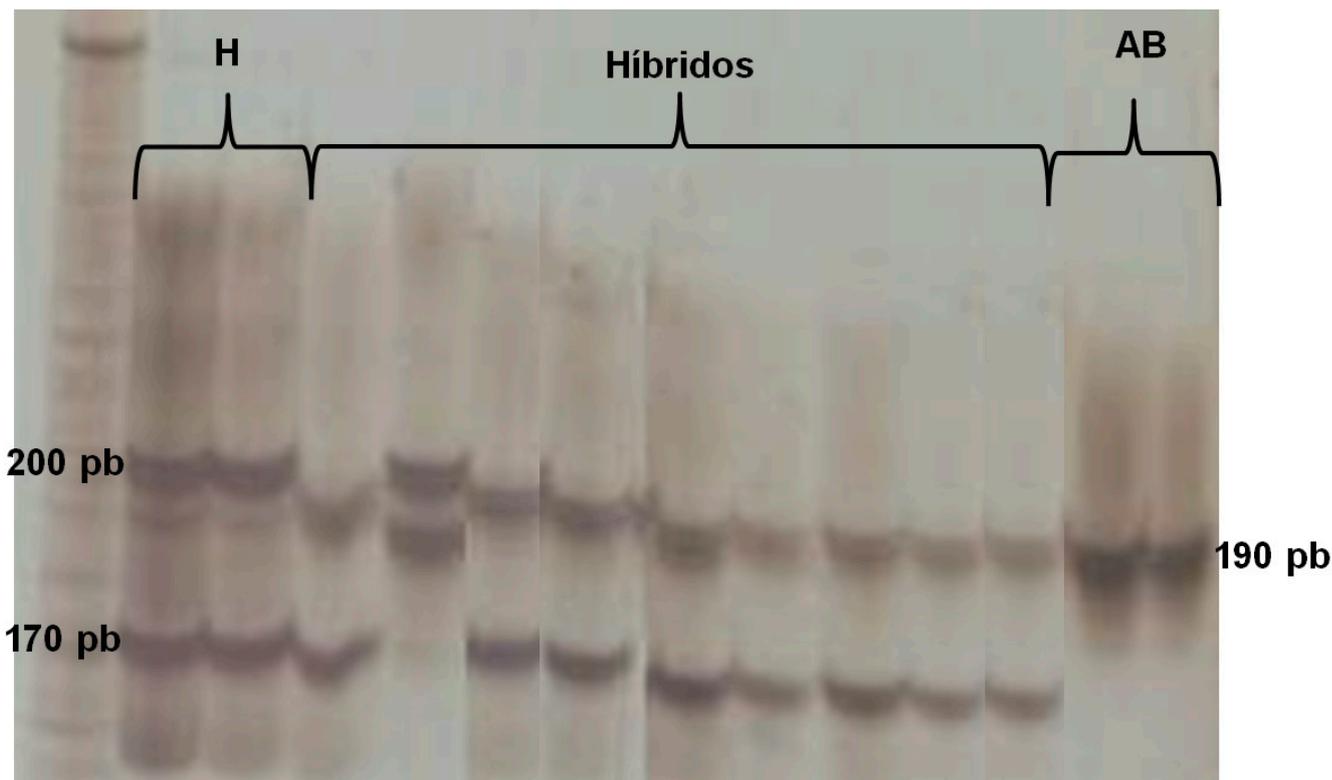


Fig. 5. Perfil genético obtido com aplicação do marcador SSR NH021 confirmando a natureza híbrida da progênie resultante do cruzamento 'Housui' x 'Abate Fetel'. Nas duas primeiras pistas são apresentados os fragmentos gerados pela amplificação do DNA de 'Housui' (H), em seguida híbridos do cruzamento 'Housui' x 'Abate Fetel' e nas últimas duas pistas são apresentados os fragmentos originados a partir do DNA de 'Abate Fetel' (AB).

Os marcadores microssatélites NH005b, NH026a, NH027a e NH021a, selecionados como resultado da caracterização de um conjunto de marcadores SSR para a pera, foram utilizados para confirmação do cruzamento controlado entre as cultivares de pera 'Housui' e 'Abate Fetel' (Figura 5). Onze plântulas resultantes do cruzamento 'Housui' x 'Abate Fetel' foram selecionadas aleatoriamente. O DNA foi extraído e as reações de PCR e visualização dos produtos de amplificação foram realizadas conforme descrito na etapa de ajuste do protocolo para análise com o uso de marcadores SSR.

A comparação entre os alelos dos pais com os presentes nos híbridos foi realizada visualmente em géis de poliacrilamida. Como esperado, os indivíduos estudados apresentaram um alelo do pai e outro alelo da mãe, confirmando a natureza híbrida da progênie (Figura 5). Esse exemplo confirmou a natureza híbrida das plântulas resultantes do cruzamento 'Housui' x 'Abate Fetel' e reforçou a importância do uso de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar para o trabalho dos melhoristas.

Conclusões e Recomendações

A escolha do marcador mais adequado para estimativa da diversidade genética de uma espécie depende de uma série de fatores, como o conteúdo informativo, a capacidade multiplex e também a disponibilidade do marcador para a espécie de interesse, que terá reflexos sobre os recursos humanos e financeiros dispendidos na execução dos experimentos (RAFALSKI et al., 1996).

Marcadores SSR desenvolvidos para pera, cujas sequências estão disponíveis na literatura, foram usados na estimativa da diversidade de coleções, assim como em outras aplicações, como na construção de mapas genéticos e identificação de marcadores ligados a características de interesse para o melhoramento (YAMAMOTO et al., 2002b; DONDINI et al., 2004; BAO et al., 2007; DEQUIGIOVANNI et al., 2012). Neste trabalho, a análise SSR refletiu as relações genéticas entre os acessos, descritas na literatura. As amostras suspeitas de falsa identificação durante

procedimentos de micropropagação confirmaram ser idênticas à cv. 'William's', a partir da qual foram propagadas. Não se confirmou, assim, a suspeita de corresponderem à cultivar Ya-lí. Por outro lado, o acesso identificado como 'Japonesa' não corresponde à cultivar Ya-lí, constituindo acesso geneticamente distinto.

Esses exemplos demonstram como os marcadores SSR constituem ferramentas úteis para a identificação genética de acessos e cultivares de pera em análise de rotina de recursos genéticos, e para a organização de coleções de germoplasma. A natureza híbrida das plântulas resultantes do cruzamento 'Housui' x 'Abate Fetel' foi confirmada com uso dos marcadores selecionados e do protocolo descrito neste trabalho, demonstrando a importância do uso de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar para o trabalho dos melhoristas. Os marcadores SSR selecionados e o protocolo ajustado neste trabalho podem ser utilizados em diversas aplicações de análise genética em escala de coleções de pera.

Marcadores RAPD vêm sendo utilizados em aplicações de análise genética, especialmente na abordagem inicial da diversidade genética de várias espécies vegetais (BELAJ et al., 2002; ROYO; ITOIZ, 2004; PILUZZA et al., 2005). Na cultura da pera, tais marcadores foram usados com sucesso para avaliar a diversidade e identificar espécies de *Pyrus* spp. (OLIVEIRA et al., 1999; MONTE-CORVO et al., 2000; SAWAZAKI et al., 2002; TENG et al., 2002; LEE et al., 2004). Neste estudo, o polimorfismo gerado pelos marcadores RAPD foi adequado para a estimativa inicial da diversidade genética da coleção de germoplasma de pera mantida pela EPAGRI-EE Caçador. A análise de agrupamento gerou um dendrograma em que as variedades europeias, híbridas e asiáticas formaram grupos distintos (Figura 3B). Embora tenha sido observado o posicionamento de acessos europeus e asiáticos no grupo de peras híbridas, o uso dessa técnica possibilitou a confirmação de duplicatas e mutações ('William's', 'Bartlett' e 'Max Red Bartlett') e de rejeição da hipótese de presença de duplicações ('Óstia1' e 'Óstia2'). Assim, esses marcadores podem ser usados na avaliação preliminar da diversidade de coleções de pera e na solução de algumas questões pontuais de identidade, principalmente considerando sua baixa relação custo/benefício.

Referências Bibliográficas

- BAO, L.; CHEN, K.; ZHANG, D.; CAO, Y.; YAMAMOTO, T.; TENG, Y. Genetic diversity and similarity of pear (*Pyrus* L.) cultivars native to East Asia revealed by SSR (simple sequence repeat) markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, p. 959–971, 2007.
- BELAJ, A.; SATOVIC, Z.; RALLO, L.; TRUJILLO, I. Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, p. 638–644, 2002.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314–331, 1980.
- BOWCOCK, A. M.; RUIZ-LINHARES, A.; TOMFOHRDE, J.; MINCH, E.; KIDD, J. R.; CAVALLI-SFORZA, L. L. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. **Nature**, v. 368, p. 455–457, 1994.
- BRZUSTOWSKI, J. **Individual to individual genetic distance calculator**. Disponível em: <<http://www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/sharedst.php>>. Acesso em: 7 jun. 2011.
- CAI, D.; ZHENG, X.; TENG, Y.; SPOONER, D. M. Genetic relationships among *Pyrus pyrifolia* cultivars from southeastern China and Japan. **Acta Horticulturae**, n. 859, p. 89–92, 2010.
- CAMPO-DALL'ORTO, F. A.; OJIMA, M.; BARBOSA, W.; RIGITANO, O.; MARTINS, F. P.; CASTRO, J. L. de; SANTOS, R. R. dos; SABINO, J. C. **Variedades de pera para o Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1996. 34 p.
- CHEVREAU, E.; BELL, R. *Pyrus* spp. pear and *Cydonia* spp. Quince. In: LITZ, R. E. (Ed.). **Biotechnology of fruit and nut crops**. Wallingford: CABI, 2005. p. 543–565.
- CHEVREAU, E.; LEULIETTE, S.; GALLET, M. Inheritance and linkage of isozyme loci in pear

(*Pyrus communis* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, p. 498-506, 1997.

COHEN, J.; WILLIAMS, J. T.; PLUCKNETT, D. L.; SHANDS, H. Ex situ conservation of plant genetic resources: global development environmental concerns. **Science**, v. 253, p. 866-872, 1991.

DELBARD, G. **Les beaux fruits de France**. Paris, 1947. 164 p.

DEQUIGIOVANNI, D.; RECH, F.; GATTI, F. G. G.; CERIOTTI, I. S.; FAORO, I.; OLIVEIRA, P. R. D. de; QUECINI, V.; RITSCHER, P. Simple Sequence Repeat molecular marker screening for large-scale analysis of pear germplasm banks. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. Submetido em outubro/2011. No prelo.

DONDINI L.; PIERANTONI, L.; GAIOTTI, F.; CHIODINI, R.; TARTARINI, S.; BAZZI, C.; SANSVINI, S. Identifying QTLs for fire-blight resistance via a European pear (*Pyrus communis* L.) genetic linkage map. **Molecular Breeding**, v. 14, p. 407-418, 2004.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

EVANS, K. M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F.; GOVAN, C. Harmonising fingerprinting protocols to allow comparisons between germplasm collections - *Pyrus*. **Acta Horticulturae**, n. 814, p. 103-106, 2009.

FAO. **Statistical Databases - FAOSTAT**. Disponível em: <<http://apps.fao.org/page/collections?subset=a-griculture>>. Acesso em: 27 abr. 2011.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F.; HARVEY, N. G.; JAMES, C. M. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from European pear (*Pyrus communis* L.). **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 1039-1041, 2006.

GEPTS, P. Plant genetic resources conservation and utilization: the accomplishments and future of a societal insurance policy. **Crop Science**, v. 46, p. 2278-2292, 2006.

GOLDSTEIN, D. B.; RUIZ LINARES, A.; CAVALLI-SFORZA, L. L.; FELDMAN, M. W. Genetic absolute dating based on microsatellite and the origin of modern humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 6723-6727, 1995.

HEDRICK, U. P. **The pears of New York**. Albany: J. B. Lyon, 1921. 828 p.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; REEVES, T.; RIBAUT, J.-M.; SKOVMAND, B.; TABA, S.; WARBURTON, M. Plant genetic resources: what can they contribute toward increased crop productivity? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 5937-5943, 1999.

IBRAF. Instituto brasileiro de frutas. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br>>. Acesso em: 27 abr. 2011.

KARP, A.; KRESOVICH, S.; BHAT, K. V.; AYAD, W. G.; HODGKIN, T. **Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies**. Rome: Bioversity International, 1997. 47 p.

LEE, G. P.; LEE, C. H.; KIM, C. S. Molecular markers derived from RAPD, SCAR, and the conserved 18S rDNA sequences for classification and identification in *Pyrus pyrifolia* and *P. communis*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 1487-1491, 2004.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data**. Version 1.0 (d16c). Disponível em: <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.htm>>. Acesso em: 7 jun. 2011.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **The American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 397-401, 1989.

MONTE-CORVO, L.; CABRITA, L.; OLIVEIRA, C.; LEITÃO, J. Assessment of genetic relationships among *Pyrus* species and cultivars using AFLP and RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 47, p. 257-265, 2000.

- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University, 1987. 284 p.
- OLIVEIRA, P. R. D. de; RITSCHER, P. S.; LEITE, G. B.; GOLDBACH, J. D.; RUFATO, A. de R. Projetos de pesquisa em melhoramento genético da pereira. In: REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DA PEREIRA, 3., 2010, Lages. **Anais e palestras...** Lages: UDESC, 2010. p. 64-55.
- OLIVEIRA, C. M.; MOTA, M.; MONTE-CORVO, L.; GOULÃO, L.; SILVA, D. M. Molecular typing of *Pyrus* based on RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, v. 79, p. 163-174, 1999.
- PILUZZA, G.; PECETTI, L.; BULLITTA, S.; PIANO, E. Discrimination among subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L. complex) genotypes using RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 52, p. 193-199, 2005.
- POWELL, W.; MORGANTE, G. B.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, v. 2, p. 225-238, 1996.
- RITSCHER, P.; REVERS, L. F.; OLIVEIRA, P. R. D. de; LEITE, G. B.; FERREIRA, M. E. Genetic analysis of accessions in a pear germplasm bank. **Acta Horticulturae**, n. 800, p. 409-416, 2008.
- ROHLF, F. J. **NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system – version 1.7**. New York: Exeter Software, 1992.
- ROYO, J. B.; ITOIZ, R. Evaluation of the discriminance capacity of RAPD, isoenzymes and morphologic markers in apple (*Malus domestica* Borkh.) and the congruence among classifications. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 51, p. 153-160, 2004.
- SAWAMURA, Y.; SAITO, T.; TAKADA, N.; YAMAMOTO, T.; KIMURA, T.; HAYASHI, T.; KOTOBUKI, K. Identification of parentage of Japanese pear 'Housui'. **Japanese Society of Horticultural Science**, v. 73, p. 511-518, 2004.
- SAWAZAKI, H. E.; BARBOSA, W.; COLOMBO, C. A. Caracterização e identificação de cultivares e seleções de pereiras através de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 447-452, 2001.
- SEFC, K. M.; REGNER, F.; TURETSCHER, E.; GLÖSSL, J.; STEINKELLNER, H. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. **Genome**, v. 42, p. 367-373, 1999.
- SILVA, P. I. T.; MARTINS, A. M.; PESSOA-FILHO, M. A.; GOUVEA, E. G.; FERREIRA, M. E. Development and validation of microsatellite markers for *Brachiaria ruziziensis* obtained by partial genome assembly of Illumina single-end reads. **BMC Genomics** (submitted). 2012
- TENG, Y.; TANABE, K.; TAMURA, F.; ITAI, A. Genetic relations of *Pyrus* species and cultivars to East Asia revealed by Random Amplified Polymorphic DNA markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 127, p. 262-270, 2002.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Agricultural Research Service. **National plant germplasm system: accession areas queries**. Disponível em: <http://www.ars-grin.gov/npgs/acc/acc_queries.html>. Acesso em: 29 jun. 2011.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WÜNSCH, A.; HORMAZA, J. I. Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. **Scientia Horticulturae**, v. 113, p. 37-43, 2007.
- YAMAMOTO, T.; KIMURA, T.; SAWAMURA, Y.; KOTOBUKI, K.; BAN, Y.; HAYASHI, T.; MATSUTA, N. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 865-870, 2001.
- YAMAMOTO, T.; KIMURA, T.; SAWAMURA, Y.; MANABE, T.; KOTOBUKI, K.; HAYASHI, T.; BAN, Y.; MATSUTA, N. Simple sequence repeats for

genetic analysis in pear. **Euphytica**, v. 124, p. 129–137, 2002a.

YAMAMOTO, T.; KIMURA, T.; SHODA, M.; IMAI, T.; SAITO, T.; SAWAMURA, Y.; KOTOBUKI, K.; HAYASHI, T.; MATSUTA, N. Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears. **Theoretical and**

**Circular
Técnica, 93**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Uva e Vinho

Rua Livramento, 515 - Caixa Postal 130
95700-000 Bento Gonçalves, RS

Fone: (0xx) 54 3455-8000

Fax: (0xx) 54 3451-2792

<http://www.cnpuv.embrapa.br>

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



1ª edição

1ª impressão (2012): 500 exemplares

**Comitê de
Publicações**

Presidente: Mauro Celso Zanus

Secretária-Executiva: Sandra de Souza Sebben

Membros: Alexandre Hoffmann, César Luís Girardi,
Flávio Bello Fialho, Henrique Pessoa dos Santos,
Kátia Midori Hiwatashi, Thor Vinícius Martins
Fajardo e Viviane Maria Zanella Bello Fialho

Expediente

Editoração gráfica: Alessandra Russi

Normalização bibliográfica: Kátia Midori Hiwatashi