

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Dissertação

**Estrutura Genética do Germoplasma de *Prunus*
persica (L.) Batsch no Brasil**

Liane Bahr Thurow

Pelotas, 2013

LIANE BAHR THUROW

Estrutura Genética do Germoplasma de *Prunus persica* (L.)
Batsch no Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Fitomelhoramento).

Orientadora: Caroline Marques Castro – Embrapa Clima Temperado

Co-Orientadores:

Sandro Bonow – Embrapa Clima Temperado

Maria do Carmo Bassols Raseira – Embrapa Clima Temperado

Pelotas, 2013

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

T542e Thurow, Liane Bahr

Estrutura genética do germoplasma de prunus persica (l.) batsch no brasil / Liane Bahr Thurow ; Caroline Marques Castro, orientador ; Sandro Bonow, Maria do Carmo Bassols Raseira, coorientadores. — Pelotas, 2013.

65 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2013.

1. Pessegueiro. 2. Genômica. 3. Recursos genéticos. 4. Marcadores ssr. 5. Variabilidade genética. I. Castro, Caroline Marques, orient. II. Bonow, Sandro, coorient. III. Título.

CDD : 634.25

Banca Examinadora:

Dr^a. Caroline Marques Castro – Embrapa Clima Temperado (Presidente)

Dr. Antonio Costa de Oliveira – Departamento de Fitotecnia – FAEM/UFPEl

Dr. Valmor João Bianchi – Departamento de Botânica - IB/UFPEl

Dr^a. Doralice Lobato de Oliveira Fischer – IFSul-rio-grandense

Aos meus pais Neldo Buss Thurow e Ilma Bahr Thurow,
dedico esta conquista,
meu carinho e toda minha vida,
pela vida toda.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meu caminho.

Aos meus pais, por entenderem as minhas escolhas e minha ausência, pelo amor e apoio ao longo destes anos. A Liamara e ao Márcio, meus irmãos queridos, pela cumplicidade e por estarem sempre comigo.

A minha orientadora Dr^a. Caroline Marques Castro, “quando eu crescer quero ser que nem você!” Obrigada pela excelente orientação, por todo o aprendizado, pela disponibilidade em todos os momentos, incentivo e amizade. Incluo de forma especial meus co-orientadores Dr. Sandro Bonow e Dr^a. Maria do Carmo Bassols Raseira, sem o apoio de vocês e a confiança talvez eu não conseguisse.

A Embrapa e ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto de melhoramento de pessegueiro e a Capes pela bolsa de estudos neste período de curso.

A todos do laboratório de Biologia Molecular, pela agradável convivência, pelas experiências compartilhadas, amizade e por tornarem ainda melhores os meus dias, que cada um de nós alcance com alegria o destino projetado. Em especial Angela, Sílvia, Miriam, Natércia, Raquel, Roberta, Joyce, Daisy e Carol.

Ao Luis Willian, obrigada pela ajuda nas análises estatísticas.

A todos os professores que tive em minha vida, especialmente aqueles que amam o que fazem, sejam doutores ou de ensino fundamental incompleto, vocês me ensinaram valores que levarei por toda vida, cada um de vocês desfruta parcela de contribuição na conclusão desta etapa.

Agradeço a todos que de alguma forma ajudaram a construir esta dissertação. Mas nesta lista seletiva não poderia faltar alguém de uma paciência infinita, que me entende e apoia, Daniel Hornke, saber que posso sempre contar contigo me faz sentir forte.

A todas aquelas pessoas que sempre acreditaram em mim e me incentivaram, aos familiares e aos amigos não nominalmente citados, mas nunca esquecidos, pelo significado de suas presenças em minha vida.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

THUROW, Liane Bahr. **Estrutura Genética do Germoplasma de *Prunus persica* (L.) Batsch no Brasil**. 2013. 65f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Resumo: Com base no avanço do conhecimento de genômica a seleção assistida por marcadores mostra-se como uma estratégia bastante promissora especialmente para acelerar o desenvolvimento de novas cultivares em espécies perenes, como o pessegueiro. Nesse contexto, esta dissertação aborda a situação atual e as perspectivas do uso de seleção assistida por marcadores moleculares no melhoramento genético de pessegueiro, assim como caracteriza a variabilidade genética e a estrutura de população do painel associativo de pessegueiro representativo do germoplasma disponível no Brasil por meio da análise de 10 *loci* SSR (*Simple Sequence Repeats*). Com base na literatura, um elevado número de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) está identificado em mapas genéticos de pessegueiro, mas, apesar da importância dos caracteres envolvidos, até o momento o uso de seleção assistida por marcadores tem sido incipiente pelos programas de melhoramento. Por outro lado, com a conclusão recente do sequenciamento do genoma do pessegueiro, a perspectiva é de que essa realidade mude nos próximos anos. Corroborando com essa tendência, o primeiro passo para a seleção assistida por marcadores moleculares é conhecer a variabilidade genética presente no germoplasma de pessegueiro disponível no Brasil. Nesse sentido, os resultados desse trabalho mostram grande variabilidade genética no germoplasma avaliado. Porém, esse germoplasma está estruturado em duas subpopulações bem definidas e agrupadas de acordo com o tipo de polpa, fundente e não-fundente, com alguns acessos apresentando mistura de ambos, entre os quais a maior variabilidade está disponível dentro do subgrupo fundente. Com base nos resultados infere-se que o germoplasma avaliado é adequado para estudos de mapeamento associativo, dada a sua expressiva variabilidade genética, mas deve ser levada em consideração a estrutura genética desse germoplasma a fim de evitar a identificação de associações falso-positivas entre marcadores e fenótipos de interesse.

Palavras-chave: pessegueiro, genômica, recursos genéticos, marcadores SSR, variabilidade genética, estrutura populacional.

ABSTRACT

THUROW, Liane Bahr. **Genetic Structure of the Germplasm of *Prunus persica* (L.) Batsch in Brazil**. 2013. 65f. Master's thesis –Graduate Program of Agronomy. Federal University of Pelotas, Pelotas – Brazil.

Abstract: Based on the advanced knowledge in genomic, marker-assisted selection shows up as a promising strategy especially to accelerate the development of new cultivars in perennial species, such as peach. In this context, this dissertation addressed the current situation and the prospects of using marker-assisted selection in peach breeding programs as well as to characterize the genetic variability and population structure of an association panel representative of peach germplasm available in Brazil through SSR analysis. Based on a literature review, it was seen that a high number of QTL (Quantitative Trait Loci) is identified in genetic maps of peach, but, despite the importance of the characters studied, the use of marker-assisted selection has been incipient by breeding programs. By the other side, with the recent completion of the sequencing of the peach genome, the perspective is that the low use of molecular tools by peach breeding program will change in the coming years. In this trend, the genetic variability present in the association panel representative of peach germplasm in Brazil is quite relevant. On the other hand, this germplasm is structured into two subpopulations according to the fruit flesh type, melting or non-melting, with some genotypes being a mixture of both types of fruit flesh. Greater variability is available in the melting flesh group. These results show that the association panel is suitable for association studies given its relevant genetic variability. However, it should be taken into account in the association studies the genetic structure intrinsic to this germplasm to avoid the identification of false marker-trait associations.

Keywords: peach, genomics, genetic resources, SSR markers, genetic variability, population structure.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
CAPÍTULO 1	13
GENÔMICA APLICADA NO MELHORAMENTO DE PESSEGUIRO: PRINCIPAIS AVANÇOS E PERSPECTIVAS	13
1. Introdução	13
2. Seleção assistida por marcadores moleculares em pessegueiro	14
2.1 Desenvolvimento e qualidade de fruto	16
2.2 Caracteres fenológicos e adaptação	18
2.3 Resistência a fatores bióticos	19
2.4 Tolerância a fatores abióticos	20
3. Perspectivas futuras	20
4. Referências	22
CAPÍTULO 2	27
ESTIMATIVA DA VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL NO GERMOPLASMA DE <i>PRUNUS PERSICA</i> (L.) BATSCH DO BRASIL COM MARCADORES SSR	27
1. Introdução	27
2. Material e Métodos	30
2.1 Germoplasma	30
2.2 Extração de DNA e Genotipagem com Marcadores Microsatélites.....	30
2.3 Análise de Dados.....	37
3. Resultados e Discussão	39
3.1 Variabilidade Genética em pessegueiro	39

3.2	Variabilidade genética dentro de subgrupos definidos com base nos caracteres morfológicos de fruto.....	46
3.3	Comparação genética entre clones de fundação e novas cultivares	48
3.4	Estrutura de População	51
3.5	Distribuição da variabilidade genética.....	56
4.	Considerações Finais	58
5.	Referências	58
CONCLUSÕES		63
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....		64

INTRODUÇÃO GERAL

O pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch] é a terceira espécie frutífera de clima temperado com maior importância em todo o mundo, depois de macieira e pereira (BYRNE et al., 2012; FORCADA et al., 2013). É cultivado tanto em regiões de clima temperado quanto de clima subtropical, devido principalmente à intensa atividade de melhoramento, com progressos notáveis na melhoria de caracteres agrônômicos. De acordo com Byrne et al. (2012), entre as conquistas mais importantes no melhoramento tradicional do pessegueiro citam-se a expansão da sua adaptação, a extensão do período de colheita, bem como a diversificação de mercado.

O melhoramento do pessegueiro tem sido muito ativo nas últimas décadas, com centenas de novas cultivares lançadas (SANSVINI et al., 2006; BOUHADIDA et al., 2011). A capacidade dos melhoristas de gerar grandes populações é quase ilimitada, porém a fenotipagem e seleção destas novas plantas são os principais fatores limitantes para o desenvolvimento de novas cultivares, aliado ao baixo nível de variabilidade encontrado nesta espécie (BYRNE, 1990) e a estreita base genética das cultivares modernas (SCORZA et al., 1985), fatores ainda considerados como obstáculo para a implementação de seleção assistida com marcadores moleculares em programas de melhoramento (BYRNE et al., 2012).

Variabilidade genética é essencial para qualquer programa de melhoramento, seja para o aumento de produção, qualidade de frutos, adaptação, ou incorporação de caracteres de resistência e, ou, tolerância a estresses bióticos e abióticos. Desta forma, ampla gama de trabalhos sobre variabilidade genética nesta espécie encontra-se disponível (ARANZANA et al., 2002; DIRLEWANGER et al., 2002; WUNSCH et al., 2006; YOON et al., 2006; XIE et al., 2010; ARANZANA et al., 2010; BOUHADIDA et al., 2011). No entanto, a maioria com enfoque na variabilidade do germoplasma europeu, norte americano ou asiático.

O germoplasma de pessegueiro disponível no Brasil está conservado no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Prunóideas e é mantido pela Embrapa Clima Temperado. Por meio de trabalhos anteriores de caracterização, principalmente morfológica e fenológica, evidencia-se uma grande variabilidade entre os acessos disponíveis. Esses acessos são oriundos principalmente de

populações naturalizadas e adaptadas às condições de clima subtropical, de baixa exigência em frio, assim como genótipos utilizados como fonte de resistência à ferrugem da folha, à podridão parda e à bacteriose das folhas. A origem deste germoplasma é variada, incluindo desde programas de melhoramento da Embrapa e do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), genótipos oriundos de outros estados brasileiros, antigas cultivares, até introduções de países como Bolívia, Espanha, Estados Unidos, Itália, Ilhas Canárias, México e Japão (RASEIRA et al., 2008).

Considerando a importância da obtenção de frutas de alta qualidade, as dificuldades intrínsecas para o melhoramento genético de espécies perenes, assim como o avanço na área de genômica, torna-se indispensável o desenvolvimento e aplicação de ferramentas moleculares para identificação e caracterização de genes que controlam características de interesse. Conhecer a variabilidade genética e a estrutura populacional do germoplasma disponível é o primeiro passo para a identificação de regiões no genoma associadas a caracteres de interesse. Análises de estrutura populacional e a contabilização da mistura de grupos ou subgrupos formados dentro do germoplasma (GANOPOULOS et al., 2011; MARIETTE et al., 2010), aumentam a confiança em estudos de mapeamento associativo (FORCADA et al., 2013). Assim, a relação entre o fenótipo e um marcador pode ser testada dentro dos diferentes subgrupos, além disso, o grau de parentesco entre os genótipos também é considerado diminuindo a possibilidade de falsas associações de marcadores genéticos com fenótipo (ODONG et al., 2011; CAO et al., 2012; FORCADA et al., 2013).

Frente ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo estimar a variabilidade genética e a estrutura de população do painel associativo de pessegueiro representativo do germoplasma disponível no Brasil por meio da análise de *loci* SSR (*Simple Sequence Repeats*), uma primeira etapa para desenvolver estudos de mapeamento associativo visando implementar a seleção assistida por marcadores moleculares no melhoramento genético e desenvolvimento de novas cultivares de *P. persica*.

Esta dissertação está apresentada em dois capítulos, o primeiro uma revisão sobre o estado da arte da seleção assistida por marcadores em pessegueiro e o segundo sobre a variabilidade genética e estrutura populacional de parte do germoplasma de pessegueiro disponível no Brasil.

CAPÍTULO 1

GENÔMICA APLICADA NO MELHORAMENTO DE PESSEGUEIRO: PRINCIPAIS AVANÇOS E PERSPECTIVAS

1. Introdução

O pessegueiro tem sido utilizado como espécie modelo para estudos genômicos em *Rosaceae* devido principalmente à simplicidade do genoma, com cerca de 230 Mbp, aproximadamente o dobro do tamanho do genoma de *Arabidopsis thaliana*, distribuído em oito pares de cromossomos (ARUMUGANATHAN; EARLE, 1991). Além disso, enquanto algumas espécies rosáceas como ameixeira européia, cerejeira ácida, macieira e pereira são poliplóides, o pessegueiro é uma espécie diplóide, não apresenta autoincompatibilidade e possui um período de juvenilidade relativamente curto de 2 a 3 anos, em comparação a maioria das outras espécies de árvores frutíferas que necessitam de 5 a 10 anos (ARÚS et al., 2012).

Um dos principais objetivos da aplicação genômica no melhoramento de plantas é a associação do fenótipo de interesse ao genótipo para selecionar com maior precisão plantas com caracteres superiores (POLAND; RIFE, 2012). Ao longo das duas últimas décadas, com o desenvolvimento de marcadores moleculares para genotipagem e análise da variabilidade genética (DIRLEWANGER et al., 2002; ARANZANA et al., 2003; YOON et al., 2006; XIE et al., 2010; BOUHADIDA et al., 2011), a disponibilidade do mapa de referência de *Prunus* (DIRLEWANGER et al., 2004), juntamente com a avaliação do mapa físico (ZHEBENTYAYEVA et al., 2008), estudos de genômica comparativa, bancos de dados (<http://www.rosaceae.org>), liberação da sequência do genoma completo do pessegueiro (ARÚS et al., 2012; The International Peach Genome Initiative, 2013) e o recente desenvolvimento de genotipagem de recursos genéticos através de polimorfismo de um único

nucleotídeo (SNP) (AHMAD et al., 2011; ARANZANA et al., 2012; EDUARDO et al., 2012; VERDE et al., 2012; MARTÍNEZ-GARCÍA et al., 2013a), é possível a saturação de regiões específicas com marcadores de interesse associados com importantes características agronômicas, possibilitando a aplicação de seleção assistida nos programas de melhoramento genético de pessegueiro.

Neste documento estão resumidos os principais avanços, os recursos disponíveis, e as perspectivas futuras do uso de seleção assistida por marcadores no melhoramento genético de pessegueiro.

2. Seleção assistida por marcadores moleculares em pessegueiro

A seleção assistida por marcadores moleculares pode ser utilizada para rastrear regiões do genoma que codificam ou estão próximas a regiões que codificam características específicas de uma planta. Características relativas à qualidade do fruto, por exemplo, por meio de métodos tradicionais, não são possíveis de serem selecionadas pelo melhorista antes do período de frutificação. Uma vez que sejam identificados marcadores moleculares associados a estas características, é possível a pré-seleção de plantas utilizando esses marcadores, não necessitando esperar até o período em que as plantas frutifiquem para realizar a seleção (FORCADA et al., 2013).

A relação entre fenótipo e genótipo tem sido de grande interesse, desde os postulados de Mendel sobre a existência de caracteres passados para a próxima geração (KORTE; FARLOW, 2013). A habilidade de prever caracteres agronomicamente importantes, tais como qualidade de fruto, adaptação e resistência e/ou tolerância a fatores bióticos e abióticos requerem a compreensão de *loci* específicos que constituem a base genética de um caractere fenotípico. Estas diferenças fenotípicas podem ser identificadas através de várias abordagens de mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) dentre elas, mapeamento clássico e mapeamento associativo.

Na metodologia clássica de mapeamento genético é utilizada uma população segregante, obtida a partir de parentais contrastantes para a característica em estudo. Por outro lado, o mapeamento associativo tem como grande vantagem o uso direto de coleções de germoplasma, populações naturais e, ou, materiais-elite, para

mapear caracteres de interesse, considerando todas as gerações de recombinação anteriores à origem da mutação (OLIVEIRA et al., 2013). Além disso, um grande número de avaliações fenotípicas anteriores de acessos conservados nos bancos de germoplasma e, ou, de genótipos do programa de melhoramento podem ser usadas na busca por identificar genes ou marcadores associados aos fenótipos de interesse (MALOSETTI et al., 2007).

Entretanto, é importante enfatizar que ambos os métodos de mapeamento são importantes e apresentam suas vantagens e limitações. O uso do mapeamento de populações segregantes para características de interesse tem sido o principal meio para análise de associação marcador-característica em pessegueiro até o momento. Dentre os mapas publicados ressalta-se o mapa de ligação interespecífico entre a amendoeira 'Texas' com o pessegueiro 'Earlygold' (T x E), estabelecido como mapa de referência de todas as espécies de *Prunus* (OGUNDIWIN et al., 2009). Resultados encontrados por Aranzana et al. (2010) dão um indicativo de que, em pessegueiro, o mapeamento associativo usando a abordagem *genome-wide* é bastante promissor para estudos genéticos de características agrônomicas importantes.

Nos últimos anos, um número considerável de genes relacionados a importantes características de interesse foram geneticamente descritos. Existem 43 caracteres morfológicos com herança mendeliana simples, descritos em pessegueiro (DIRLEWANGER et al., 2004). Para 23 destes foram determinadas relações de ligação com marcadores moleculares. Atualmente, há marcadores moleculares propostos para 20 caracteres monogênicos relativos ao pessegueiro, mas apenas para 12 destes as ligações são suficientemente próximas (menos de 5 cM) para confiabilidade do uso de seleção assistida (BYRNE et al., 2012).

O alto nível de sintonia e colinearidade entre diferentes mapas de *Prunus* e a existência do mapa de referência T x E permitiu a identificação de 28 genes responsáveis pela expressão de importantes características agrônomicas (resistência a fatores bióticos e abióticos, qualidade de fruto, autoincompatibilidade, entre outros) encontrados em diferentes espécies do gênero *Prunus* (DIRLEWANGER et al., 2004). A posição aproximada destes genes no mapa de referência (T x E) e informações disponíveis a partir da interconexão dos mapas de ligação tem permitido a descoberta de marcadores adicionais em regiões de

interesse e sua utilização na seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento.

A aplicação de seleção assistida por marcadores durante a fase juvenil em pessegueiro tem sido proposta para acelerar a seleção ou reduzir os tamanhos da progênie descendente e os custos com a condução de plantas que não apresentam o caractere a ser selecionado. O marcador endoPG desempenha um papel importante na textura dos frutos e degradação da parede celular em pêssego. Tem sido usado em programas de melhoramento de pessegueiro para distinguir entre caroço solto e aderido à polpa e quanto ao tipo de polpa (fundente e não fundente) em progênies no estágio de plântula (PEACE et al., 2005).

Porém, a utilização de seleção assistida por marcadores moleculares nos programas de melhoramento de pessegueiro ainda é incipiente. Com essa visão, em 2009, nos Estados Unidos, foi implementado um projeto de pesquisa, envolvendo Instituições americanas e outras parceiras, visando aperfeiçoar a integração das modernas ferramentas genômicas com as estratégias, já consolidadas, do melhoramento tradicional de espécies da família *Rosaceae*, denominado “RosBreed”. Na Europa uma iniciativa similar foi tomada e o projeto conduzido por um consórcio de instituições europeias foi denominado “FruitBreedomics”.

A maioria das características de interesse agrônômico nos programas de melhoramento de pessegueiro apresenta variação fenotípica contínua de herança complexa, governada por vários genes. A seguir, estão descritos os principais QTLs associados aos caracteres de maior interesse nos programas de melhoramento genético de pessegueiro, um primeiro passo para a efetiva aplicação de seleção assistida por marcadores.

2.1 Desenvolvimento e qualidade de fruto

A qualidade dos frutos depende da expressão coordenada de genes durante o ciclo de desenvolvimento, bem como do período de pós-colheita. Podendo ser também afetada por fatores ambientais que causam estresses bióticos e / ou abióticos, como a infecção de patógenos, estresse por frio ou estresse hídrico em pré e pós-colheita (VERDE et al., 2012).

A quantidade de ácidos e açúcares no fruto, por exemplo, tem controle genético complexo, embora o caractere baixa acidez do suco de fruta seja

controlado por um único gene dominante *D* (DIRLEWANGER et al., 1998). Uma população derivada do cruzamento de *Prunus persica* x *Prunus ferganensis* permitiu o mapeamento de um QTL para pH no grupo de ligação (GL) 2 e QTLs para outros componentes de equilíbrio açúcar / acidez e concentração de sólidos solúveis (CSS) foram posicionados no GL 1 e 2 (QUARTA et al., 2000). Além disso, também foram detectados outros QTLs relacionados a qualidade de fruto relacionados a época de floração (mapeados no GL 4); tempo de maturação (GL 2 e 6) e cor da película do fruto (GL 2 e 6). Resultados obtidos por Verde et al. (2002) também confirmam o mapeamento para cor da película nos grupos de ligação 2 e 6.

Em uma população BC1, originada a partir de um cruzamento entre uma seleção de *Prunus persica* (IF7310828), utilizado como parental recorrente feminino, e um acesso de *P. ferganensis*, Verde et al. (2002) identificaram QTLs relacionados com o tempo de maturação nos grupos de ligação 2, 4 e 6 e período de desenvolvimento de frutos no GL 4. Vários estudos sobre herdabilidade para tempo de maturação e período de desenvolvimento dos frutos têm mostrado que esses caracteres apresentam alta herdabilidade e com efeito principalmente aditivo, embora limitados por uma correlação negativa com tamanho e qualidade dos frutos, os quais caracteres poligênicos de herdabilidade baixa a moderada (SOUZA et al., 1998; BYRNE et al., 2012).

Cantín et al. (2010) construíram um mapa genético do grupo de ligação 4, a partir da população F2 segregante do cruzamento entre as nectarineiras 'Venus' e 'BigTop', e identificaram QTLs para várias características agrônômicas, de qualidade dos frutos e para sintomas de injúria por frio devido ao armazenamento prolongado, explicando estes QTLs, entre 26% e 92% da variação observada. Para diversos caracteres foram mapeados QTLs na mesma região, o que pode corresponder a QTLs ligados ou um QTL com efeito pleiotrópico. Um QTL com elevada contribuição (87,2%) para data de colheita foi detectado próximo ao marcador SSR UDP96-003, identificado anteriormente por Dirlewanger et al. (1999) e Etienne et al. (2002). Além disso, foi possível validar os resultados de mapeamento molecular e posições de QTLs, relacionados à suscetibilidade a injúria por frio encontrados em outras populações (PEACE et al., 2006; OGUNDIWIN et al., 2007; OGUNDIWIN et al., 2009), contribuindo para uma melhor compreensão do controle genético desta injúria que afeta os frutos de pessegueiro e nectarineiras e que, com aplicação de seleção

assistida por marcadores, permitirá a seleção de cultivares com maior tolerância para esta característica.

Mais recentemente a análise de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) está sendo utilizada para associação de caracteres de qualidade de fruto e sintomas de injúria por frio com a variação fenotípica observada e anotação de genes e proteínas que podem estar relacionados com essas características. A interação e expressão de proteínas afetadas podem explicar a variação observada em cada indivíduo e facilitar a compreensão das redes de regulação de genes para características de qualidade dos frutos de pêssego (MARTÍNEZ-GARCÍA et al., 2013a).

2.2 Caracteres fenológicos e adaptação

Necessidade de frio é o principal fator que determina a data de floração e tem impacto sobre a distribuição climática de espécies frutíferas de clima temperado (FAN et al., 2010). Genótipos com alta exigência em frio para superação da dormência das gemas em regiões quentes podem resultar em florescimento e brotação irregular e, portanto, afetam a frutificação (TOPP et al., 2008).

Fan et al. (2010) desenvolveram um mapa genético a partir de uma população F2 de *Prunus persica* obtida pelo cruzamento de dois genótipos contrastantes para necessidade de frio e mapearam 20 QTLs com efeitos aditivos para características de necessidade de frio, necessidade de calor e data de floração, incluindo um QTL de maior efeito para necessidade de frio e dois QTLs de maior efeito para data de floração. A maioria dos QTLs foi localizada na mesma região de outros caracteres sugerindo que pode haver um sistema unificado de ação e regulação para necessidade de frio, necessidade de calor e data de floração.

Em pessegueiro foi recentemente utilizado uma abordagem de genotipagem via sequenciamento (ELSHIRE et al., 2011) para mapeamento de QTLs para necessidade de frio e data de floração a partir de uma população de mapeamento F2. SNPs em comum com dados anteriormente publicados para estes caracteres foram encontrados, detectando 20 QTLs para necessidade de frio e data de floração, distribuídos nos Grupos de Ligação 1, 4 e 7 do pessegueiro (RAUH et al., 2013), sugerindo ser uma técnica promissora para mapeamento associativo e potencial

aplicação de seleção assistida por marcadores para desenvolvimento de cultivares de baixa necessidade de frio e obtenção de frutas de maturação precoce.

2.3 Resistência a fatores bióticos

Numerosas moléstias e pragas atacam o pessegueiro e as nectarineiras, uma das mais sérias moléstias com distribuição mundial é a podridão parda causada por *Monilinia fructicola* (G. Wint.) Honey. Diversos marcadores têm sido associados à QTLs para podridão parda. Os resultados revelam um QTL associado a esta moléstia no GL 1 e, provavelmente um QTL adicional localizado no GL 5. Recentemente, foi realizada análise de sequenciamento de três cultivares 'Dr. Davis', 'F8 1-42', e 'Georgia Belle' para identificar SNPs a fim de genotipar duas populações de melhoramento e mapear QTLs associados à podridão parda, oferecendo ferramentas adicionais para o desenvolvimento de cultivares resistentes (MARTÍNEZ-GARCÍA et al., 2013b).

A bacteriose (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) é uma moléstia particularmente importante em áreas de alta umidade com vento e solos arenosos, sendo o controle químico, muitas vezes, ineficaz (BYRNE et al., 2012).

Em estudos para compreensão da base molecular para resistência a bacteriose em *Prunus*, Yang et al (2010) sugeriram uma natureza poligênica para resistência a *Xanthomonas* em pêssigo. Yang et al (2013) utilizaram uma população F2 com 63 genótipos derivada do cruzamento entre os pessegueiros 'O'Henry' (suscetível) e 'Clayton' (resistente) para construção do mapa de ligação e mapeamento de QTLs e identificaram 14 possíveis QTLs com efeito aditivo para resistência a bacteriose, incluindo cinco QTLs de maior efeito nos grupos de ligação 1, 4, 5 e 6.

Os principais QTLs, *Xap.Pp.OC-4.1* e *Xap.Pp.OC-4.2*, no GL 4 estão associados com resistência a *Xanthomonas* somente na folha, *Xap.Pp.OC-5.1* no GL 5 está associado a resistência na folha e no fruto, enquanto *Xap.Pp.OC-1.2* e *Xap.Pp.OC-6.1* no GL 1 e GL 6 respectivamente, estão associados com resistência no fruto. A variação fenotípica explicada pelos QTLs identificados variou de 15,4 a 56,4% em dados obtidos de folhas e de 33 a 60,7% em dados obtidos a partir de frutos.

A resistência à oídio foi extensivamente estudada e 13 QTLs explicando 65% da variação fenotípica relacionada a essa enfermidade foram identificados

(FOULONGNE et al., 2003), marcadores moleculares estão disponíveis para uso em seleção assistida e são capazes de discriminar entre os alelos favoráveis para os QTLs no GL 6 e 8 (POZZI; VECCHIETTI, 2009).

Recentemente, QTLs associados à resistência a PPV (*Plum Pox Virus*) (transmitido por enxertia e várias espécies de pulgões) foram mapeados, o que deve facilitar o desenvolvimento de seleção assistida por marcadores, embora nem todos os QTLs sejam considerados estáveis em todas as origens genéticas testadas (RUBIO et al., 2010).

2.4 Tolerância a fatores abióticos

Mudas de porta-enxertos de pessegueiro não são tolerantes ao encharcamento e não se desenvolvem e/ou morrem quando plantados em solos com alagamentos sazonais. A diferença de tolerância ao alagamento encontrado entre outras espécies do gênero *Prunus* é baseada em processos anatômicos e adaptação bioquímica envolvendo os caminhos fermentativos para obtenção de energia (BYRNE et al., 2012). Vários genes candidatos foram identificados envolvidos na tolerância de dois genótipos de *Prunus* (AMADOR et al., 2009).

Em uma primeira abordagem para localizar genes candidatos envolvidos na tolerância a clorose férrica, problema que afeta uma ampla gama de culturas em solos calcários, Gonzalo et al. (2012) estudaram uma população F1, derivada de um cruzamento interespecífico de três vias entre uma ameixeira mirabolano (P 2175) e uma amendoeira × pessegueiro híbrido (Felinem) e identificaram um gene candidato relacionado com o metabolismo do ferro dentro do intervalo de confiança do QTL no grupo de ligação 4, sugerindo uma associação desta região cromossômica com a tolerância de ferro em *Prunus*.

3. Perspectivas futuras

Apesar do elevado número de QTLs identificados e a importância dos caracteres envolvidos, até o momento o uso de seleção assistida por marcadores tem sido incipiente. É provável que informações mais detalhadas sobre os efeitos e localização dos QTLs e sua validação em diferentes *backgrounds* genéticos seja necessária, antes de marcadores serem rotineiramente integrados em programas de

melhoramento para seleção de caracteres quantitativos. Além disso, outros entraves contribuem para este descompasso como exemplo, a falta de conhecimento do modo de ação dos QTLs (aditividade, epistasia).

Paralelo ao avanço das metodologias científicas, os métodos de genotipagem evoluíram muito nos últimos anos. Métodos de redução da complexidade do genoma, aliados a plataformas de sequenciamento de última geração estão sendo usados para a descoberta de SNPs, desta forma, o principal gargalo para muitos estudos de mapeamento associativo tem sido uma fenotipagem eficiente. Preocupação ainda maior surgiu com a determinação do delineamento experimental apropriado e seleção de germoplasma para gerar dados fenotípicos de alta qualidade, os quais serão os principais determinantes na identificação de QTLs a um baixo custo e em larga escala.

A sequência do genoma do pessegueiro proporcionará um recurso robusto para pesquisas relacionadas ao pessegueiro e outras espécies de *Prunus*, aumentando o entendimento sobre os aspectos genético-estruturais e funcionais, facilitando a conexão entre o genótipo e o fenótipo. Além disso, os genes de interesse podem ser integrados em cultivares elite para melhorar a resistência a moléstias, adaptação e qualidade de fruto.

A conclusão recente do sequenciamento do genoma do pessegueiro fornece uma base fundamental para a compreensão da evolução dos genomas em estudos de genômica comparativa, enquanto explora o conhecimento de sistemas de genes em espécies modelo, como *Arabidopsis*, para acelerar significativamente a compreensão dos genes associados a importantes caracteres agrônômicos. Além disso, com o sequenciamento do genoma, a oferta de genes candidatos para estudos associativos em pessegueiro também mostra grande potencial de aplicação.

Indiscutivelmente, o pessegueiro é a espécie arbórea frutífera atualmente melhor caracterizada geneticamente, sendo utilizada como genoma de referência. Assim, com o desenvolvimento de recursos genômicos em larga escala, incluindo transcrição e dados de sequenciamento, mapas genéticos e físicos e maior número de marcadores utilizados, a tendência é de cada vez mais obter marcadores mais próximos do polimorfismo causador. Desta forma, é previsível nos próximos anos um grande número de publicações para validação destes QTLs mapeados em

populações com *background* genético relevante aos melhoristas e ancorados no mapa de referência de *Prunus*.

Por fim, com a fenotipagem em larga escala associada aos dados genômicos, será possível o uso eficaz dos recursos genéticos disponíveis, visando superar problemas enfrentados por estresses bióticos e abióticos através do uso integrado de marcadores e aplicação de seleção assistida nos programas de melhoramento de *Prunus persica*.

4. Referências

AHMAD, R.; PARFITT, D. E.; FASS, J.; OGUNDIWIN, E.; DHINGRA, A.; GRADZIEL, T. M.; LIN, D. W.; JOSHI, N. A.; MARTINEZ-GARCIA, P. J.; CRISOSTO, C. H. Whole genome sequencing of peach (*Prunus persica* L.) for SNP identification and selection. **BMC Genomics**, v. 12, p. 569, 2011.

AMADOR, M. L.; SANCHO, S.; RUBIO-CABETAS, M. J. Biochemical and molecular aspects involved in waterlogging tolerance in *Prunus* rootstocks. **Acta Horticulturae**, v. 814, p. 715-720, 2009.

ARANZANA, M. J.; CARBÓ, J.; ARÚS, P. Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 1341-1352, 2003.

ARANZANA, M. J.; ABBASSI, E.; HOWAD, W.; ARÚS, P. Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. **BMC Genetics**, v. 11, p. 69, 2010.

ARANZANA, M. J.; ILLA, E.; HOWAD, W.; ARÚS, P. A first insight into peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SNP variability. **Tree Genetics and Genomes**, v. 8, p. 1359-1369, 2012.

ARÚS, P.; VERDE, I.; SOSINSKI, B.; ZHEBENTYAYEVA, T.; ABBOTT, A. G. The peach genome. **Tree Genetics and Genomes**, v. 8, p. 531-547, 2012.

ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 9, p. 208-218, 1991.

BOUHADIDA, M.; MORENO, M. A.; GONZALO, M. J.; ALONSO, J. M.; GOGORCENA, Y. Genetic variability of introduced and local Spanish peach cultivars determined by SSR markers. **Tree Genetics e Genomes**, v. 7, p. 257-270, 2011.

BYRNE, D. H.; RASEIRA, M. B.; BASSI, D.; PIAGNANI, M. C.; GASIC, K.; REIGHARD, G. L.; MORENO, M. A.; PÉREZ, S. Peach. In: BADENES, M. L.; BYRNE, D. H. (Eds.). **Fruit Breeding: Handbook of Plant Breeding**. New York: Springer Science+Business Media, 2012. p. 505-569.

CANTÍN, C. M.; GOGORCENA, Y.; MORENO, M. A. Phenotypic diversity and relationships of fruit quality traits in peach and nectarine [*Prunus persica* (L.) Batsch] breeding progenies. **Euphytica**, v. 171, p. 211–226, 2010.

DIRLEWANGER, E.; PRONIER, V.; PARVERY, C.; ROTHAN, C.; GUY, A.; MONET, R.; Genetic linkage map of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] using morphological and molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 888-895, 1998.

DIRLEWANGER, E.; MOING, A.; ROTHAN, C.; SVANELLA, L.; PRONIER, V.; GUYE, A.; PLOMION, C.; MONET, R. Mapping QTLs controlling fruit quality in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p. 18-31, 1999.

DIRLEWANGER, E.; COSSON, P.; TAVAUD, M.; ARANZANA, M. J.; POIZAT, C.; ZANETTO, A.; ARÚS, P.; LAIGRET, F. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, p. 127-138, 2002.

DIRLEWANGER, E.; GRAZIANO, E.; JOOBEUR, T.; GARRIGA-CALDERE, F.; COSSON, P.; HOWAD, W.; ARUS, P. Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 9891-9896, 2004.

EDUARDO, I.; CHIETERA, G.; PIRONA, R.; PACHECO, I.; TROGGIO, M.; BASSI, D.; ROSSINI, L.; VECCHIETTI, A.; POZZI, C. Genetic dissection of aroma volatile compounds from the essential oil of peach fruit: QTL analysis and identification of candidate genes using dense SNP maps. **Tree Genetics and Genomes**, v. 9, p. 189-204, 2012.

ELSHIRE, R. J.; GLAUBITZ, J. C.; SUN, Q.; POLAND, J. A.; KAWAMOTO, K.; BUCKLER, E. S.; MITCHELL, S. E. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. **PLoS ONE**, v. 6, p. e19379, 2011.

ETIENNE, C.; ROTHAN, C.; MOING, A.; PLOMION, C.; BODÉNÈS, C.; SVANELLA-DUMAS, L.; COSSON, P.; PRONIER, V.; MONET, R.; DIRLEWANGER, E. Candidate genes and QTLs for sugar and organic acid contents in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, p. 145-159, 2002.

FAN, S.; BIELENBERG, D. G.; ZHEBENTYAYEVA, T. N.; REIGHARD, G. L.; OKIE, W. R.; HOLLAND, D.; ABBOTT, A. G. Mapping quantitative trait loci associated with

chilling requirement, heat requirement and bloom date in peach (*Prunus persica*). **New Phytologist**, v. 185, p. 917-930, 2010.

FORCADA, C. F.; ORAGUZIE, N.; IGARTUA, E.; MORENO, M. A.; GOGORCENA, Y. Population structure and marker-trait associations for pomological traits in peach and nectarine cultivars. **Tree Genetics and Genomes**, v. 9, p. 331-349, 2013.

FOULONGNE, M.; PASCAL, T.; PFEIFFER, F.; KERVELLA, J. QTLs for powdery mildew resistance in peach x *Prunus davidiana* crosses: consistency across generations and environments. **Molecular Breeding**, v. 12, p. 33-50, 2003.

GONZALO, M. J.; DIRLEWANGER, E.; MORENO, M. A.; GOGORCENA, Y. Genetic analysis of iron chlorosis tolerance in *Prunus* rootstocks. **Tree Genetics and Genomes**, v. 8, p. 943-955, 2012.

KORTE, A.; FARLOW, A. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. **Plant Methods**, v. 9, p. 29, 2013.

MALOSETTI, M.; van der LINDEN, C. G.; VOSMAN, B.; van EEUWIJK, F. A. A mixed-model approach to association mapping using pedigree information with an illustration of resistance to *Phytophthora infestans* in potato. **Genetics**, v. 175, p. 879-889, 2007.

MARTÍNEZ-GARCÍA, P.; PARFITT, D.; CRISOSTO, C.; FRESNEDO-RAMÍREZ, J.; GRADZIEL, T. Effect prediction of identified SNPs linked to fruit quality and chilling injury in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. **Plant Molecular Biology**, v. 81, p. 161–174, 2013a.

MARTÍNEZ-GARCÍA, P. J.; PARFITT, D. E.; BOSTOCK, R. M.; RAMIREZ, J. F.; GRADZIEL, T.; CRISOSTO, C. H.; Identification and Selection of Brown Rot Resistance Genes in Peach. In: **Plant and Animal Genome**, XXI, 2013. San Diego, CA. Poster presented at: Plant and Animal Genome Conference. Poster W310, San Diego, CA. 12-16 jan. 2013b.

OLIVEIRA, A. C. de; MAIA, L. C. da; FARIAS, D. da R.; MARINI, N. Genômica. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Eds). **Ômicas 360°: Aplicações e Estratégias para o Melhoramento de Plantas**, 2013. p. 23-46.

OGUNDIWIN, E. A.; PEACE, C. P.; GRADZIEL, T. M.; DANDEKAR, A. M.; BLISS, F. A.; CRISOSTO, C. H. Molecular genetic dissection of chilling injury in peach fruit. **Acta Horticulturae**, v. 738, p. 633-638, 2007.

OGUNDIWIN, E. A.; PEACE, C. P.; GRADZIEL, T. M.; PARFITT, D. E.; BLISS, F. A.; CRISOSTO, C. H. A fruit quality gene map of *Prunus*. **BMC Genomics**, v. 10, p. 587, 2009.

PEACE, C. P.; CRISOSTO, C. H.; GRADZIEL, T. M. Endopolygalacturonase: a candidate gene for Freestone and Melting flesh in peach. **Molecular Breeding**, v. 16, p. 21-31, 2005.

PEACE, C. P.; CRISOSTO, C. H.; GARNER, D. T.; DANDEKAR, A. M.; GRADZIEL, T.; BLISS, F. A. Genetic control of internal breakdown in peach. **Acta Horticulturae**, v. 713, p. 489-496, 2006.

POLAND, J. A.; RIFE, T. W. Genotyping-by-Sequencing for Plant Breeding and Genetics. **The Plant Genome**, v. 5, p. 92-102, 2012.

POZZI, C.; VECCHIETTI, A. Peach Structural Genomics. In: FOLTA, K. M.; GARDINER, S. E. (Eds). **Genetics and Genomics of Rosaceae**, Springer Science+Business Media, 2009, p. 235-257.

QUARTA, R.; DETTORI, M. T.; SARTORI, A.; VERDE, I. Genetic linkage map and QTL analysis in peach. **Acta Horticulturae**, v. 521, p. 233–241, 2000.

RAUH, B.; GASIC, K.; FAN, S.; ABBOTT, A. G.; BIELENBERG, D. G. Use Of Genotyping-By-Sequencing For QTL Mapping Of Chilling Requirement and Bloom Date In Peach. In: **Plant and Animal Genome**, XXI, 2013. San Diego, CA. Poster presented at: Plant and Animal Genome Conference. Poster W310, San Diego, CA. 12-16 jan. 2013.

RUBIO, M.; PASCAL, T.; BACHELLEZ, A.; LAMBERT, P. Quantitative trait loci analysis of Plum pox virus resistance in *Prunus davidiana* P1908: new insights on the organization of genomic resistance regions. **Tree Genetics and Genomes**, v. 6, p. 291-304, 2010.

SOUZA, V. A.; BYRNE, D. H.; TAYLOR, J. F. Heritability, genetic and phenotypic correlations, and predicted selection response quantitative traits in peach. II. An analysis of several fruit traits. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 123, p. 604-611, 1998.

The International Peach Genome Initiative. The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. **Nature Genetics**, 2013.

TOPP, B. L.; SHERMAN, W. B.; RASEIRA, M. C. B. Low-chill cultivar development. In: LAYNE, D. R.; BASSI, D. (Eds). **The peach botany, production and uses**. Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI, p. 106–138, 2008.

VERDE, I.; QUARTA, R.; CEDROLA, C.; DETTORI, M. T. QTL analysis of agronomic traits in a BC1 peach population. **Acta Horticulturae**, v. 592, p. 291-297, 2002.

VERDE, I.; BASSIL, N.; SCALABRIN, S.; GILMORE, B.; LAWLEY, C. T.; GASIC, K.; MICHELETTI, D.; ROSYARA, U. R.; CATTONARO, F.; VENDRAMIN, E.; MAIN, D.; ARAMINI, V.; BLAS, A. L.; MOCKLER, T. C.; BRYANT, D. W.; WILHELM, L.; TROGGIO, M.; SOSINSKI, B.; ARANZANA, M. J.; ARÚS, P.; LEZZONI, A.; MORGANTE, M.; PEACE, C. Development and Evaluation of a 9K SNP Array for Peach by Internationally Coordinated SNP Detection and Validation in Breeding Germplasm. **PLoS ONE**, v. 7, p. e35668, 2012.

XIE, R. J.; LI, X. W.; CHAI, M. L.; SONG, L. J.; JIA, H. J.; WU, D. J.; CHEN, M. K.; CHEN, K. M.; ARANZANA, M. J.; GAO, Z. S. Evaluation of the genetic diversity of Asian peach accessions using a selected set of SSR markers. **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 622-629, 2010.

YANG, N.; REIGHARD, G.; RITCHIE, D.; OKIE, W. R.; GASIC, K. Construction of a genetic linkage map for identification of molecular markers associated with resistance to *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. **HortScience**, v. 45, 2010.

YANG, N.; REIGHARD, G.; RITCHIE, D.; OKIE, W.; GASIC, K. Mapping quantitative trait loci associated with resistance to bacterial spot (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) in peach. **Tree Genetics and Genomes**, v. 9, p. 573-586, 2013.

YOON, J. H.; LIU, D. C.; SONG, W. S.; ZHANG, A. M.; LI, S. H. Genetic diversity and ecogeographical phylogenetic relationships among peach and nectarine cultivars based on simple sequence repeat (SSR) markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 131, p. 513-521, 2006.

ZHEBENTYAYEVA, T. N.; SWIRE-CLARK, G.; GEORGI, L. L.; GARAY, L.; JUNG, S.; FORREST, S.; BLENDIA, A. V.; BLACKMON, B.; MOOK, J.; HORN, R.; HOWARD, W.; ARÚS, P.; MAIN, D.; TOMKINS, J. P.; SOSINSKI, B.; BAIRD, W. V.; REIGHARD, G. L.; ABBOTT, A. G. A framework physical map for peach, a model Rosaceae species. **Tree Genetics and Genomes**, v. 4, p. 745–756, 2008.

CAPÍTULO 2

ESTIMATIVA DA VARIABILIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL NO GERMOPLASMA DE *PRUNUS PERSICA* (L.) BATSCH DO BRASIL COM MARCADORES SSR

1. Introdução

O pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch] é a terceira espécie frutífera de clima temperado com maior importância no mundo, depois da macieira e pereira (BYRNE et al., 2012; FORCADA et al., 2013). É nativo da China, de onde se dispersou para todo o mundo. Inicialmente a propagação era realizada por sementes e durante muito tempo, o pessegueiro foi cultivado e selecionado para diferentes caracteres agrônômicos, levando a populações localmente adaptadas a uma ampla variedade de climas que vão desde os trópicos até as latitudes mais altas e frias em todo o mundo (BYRNE, 2005).

No Brasil, segundo relatos históricos, o pessegueiro foi introduzido em 1532 por Martim Afonso de Souza, por meio de mudas trazidas da Ilha da Madeira e plantadas na capitania de São Vicente, atual estado de São Paulo, segundo maior produtor do Brasil, precedido apenas pelo Rio Grande do Sul, estado onde o plantio de pessegueiros para fins industriais mais se desenvolveu no País (RASEIRA; NAKASU, 2002).

Embora o melhoramento genético do pessegueiro fosse destinado, em grande parte, para zonas de alta exigência em horas de frio, o Brasil (Pelotas e São Paulo) e os Estados Unidos (Flórida) concentraram-se no desenvolvimento de variedades adaptadas para regiões de inverno ameno. Os primeiros programas de melhoramento de pessegueiro tiveram início na região Sul do Brasil na década de 1950 em Pelotas e em São Paulo com a finalidade de desenvolver cultivares para consumo *in natura* e para indústria, adaptadas a estas regiões (MEDEIROS;

RASEIRA,1998). Uma ampla gama de cultivares adaptadas às zonas de baixo e médio frio foram lançadas e, segundo Byrne e Raseira (2006) e pelos resultados obtidos é possível afirmar que estas cultivares comercialmente cultivadas no Brasil apresentam maior variabilidade do que as cultivadas nos EUA. Estes programas de melhoramento trabalharam de forma independente, com introgressão ocasional de germoplasma dos EUA e o material genético básico para o programa de melhoramento iniciado em Pelotas constituiu-se também de uma ampla gama de seleções locais.

O germoplasma de pessegueiro disponível no Brasil está conservado no BAG (Banco Ativo de Germoplasma) de Prunóideas, mantido pela Embrapa Clima Temperado. Por meio de trabalhos anteriores de caracterização principalmente morfológica e fenológica, evidencia-se uma grande variabilidade entre os acessos disponíveis, oriundos principalmente de acessos originados de populações naturalizadas e adaptadas às condições de clima subtropical, de baixa exigência em frio, além de acessos atualmente utilizados como fonte de resistência à podridão parda e à ferrugem e bacteriose das folhas. A origem deste germoplasma é variada, incluindo genótipos oriundos do programa de melhoramento da Embrapa, do Instituto Agrônomo de Campinas, de outros estados brasileiros, antigas cultivares e introduções de países como Bolívia, Espanha, Estados Unidos, Itália, Ilhas Canárias, México e Japão (RASEIRA et al., 2008).

Considerando a importância da obtenção de frutas de alta qualidade e as dificuldades intrínsecas no melhoramento genético de espécies perenes assim como o avanço na área de genômica, a exemplo, da recente liberação da sequência do genoma completo do pessegueiro (ARÚS et al., 2012; The International Peach Genome Initiative, 2013), torna-se indispensável o desenvolvimento e a aplicação de ferramentas moleculares para identificação e caracterização de genes que controlam características de interesse. Conhecer a variabilidade genética e a estrutura populacional do germoplasma disponível é o primeiro passo para o mapeamento de QTLs (*Quantitative trait loci*) ligados a importantes características agrônomicas mediante a associação de marcadores genéticos com o fenótipo (CAO et al., 2012; FORCADA et al., 2013), visando a determinação de estratégias que possibilitem a seleção assistida por marcadores moleculares.

A domesticação do pessegueiro indica um processo complexo com várias origens, resultantes da propagação clonal de genótipos desejáveis e cruzamento com variedades locais. Em estudos de mapeamento associativo, padrões complexos de estrutura populacional e relações genéticas entre os acessos podem afetar negativamente os resultados, causando falsos positivos. Ao associar um fenótipo cuja variação é correlacionada com parentesco genético, muitos marcadores distribuídos pelo genoma indicam estarem associados à característica de interesse, quando de fato, estão simplesmente capturando a relação genética entre os indivíduos, problema particularmente evidente no mapeamento de características que tenham sofrido adaptação local (MYLES et al., 2009).

Definir adequadamente as populações que serão usadas em estudos de associação é, portanto, fundamental. Além disso, análises de estrutura populacional e a contabilização da mistura de grupos ou subgrupos formados dentro do germoplasma, aumentam a confiança em estudos de mapeamento associativo (GANOPOULOS et al., 2011; MARIETTE et al., 2010; FORCADA et al., 2013).

Os métodos utilizados para corrigir a relação genética envolvem marcadores aleatórios distribuídos pelo genoma para estimar o parentesco entre os indivíduos dentro de uma população de mapeamento. Assim, marcadores microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeats*), em função de serem codominantes, altamente polimórficos e distribuídos ao acaso ao longo do genoma, estão entre os mais adequados para estudos de genotipagem e análise de variabilidade genética (DIRLEWANGER et al., 2002; ARANZANA et al., 2003; XIE et al., 2010; BOUHADIDA et al., 2011). Mais recentemente estudos analisando a estrutura genética populacional e a determinação da extensão do desequilíbrio de ligação entre pares de marcadores SSR vem sendo realizados em pessegueiro (ARANZANA et al., 2010; LI et al., 2013).

Diante do exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de estimar a variabilidade genética e a estrutura de população do painel associativo de pessegueiro, representativo do germoplasma disponível no Brasil por meio da análise de *loci* SSR, visando à aplicação de seleção assistida por marcadores moleculares através da estratégia de mapeamento associativo.

2. Material e Métodos

2.1 Germoplasma

Um conjunto de 204 genótipos de pessegueiro, pertencentes à espécie *P. persica*, conservados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Prunóideas da Embrapa Clima Temperado, foi alvo deste estudo (Tabela 1). Este painel associativo foi selecionado com base em caracteres contrastantes para bacteriose, podridão parda, tolerância ao calor na floração e baixa necessidade de frio hibernal e inclui também vários clones de fundação do Programa de Melhoramento Genético de pessegueiro da Embrapa iniciado na década de 50.

O painel associativo foi dividido de acordo com o tipo de fruto em 163 genótipos pertencentes à variedade botânica *vulgaris* (compreendendo os pêssegos comumente conhecidos), 33 pertencentes à *nucipersica* (nectarinas) e oito genótipos da variedade botânica *platicarpa* (pêssegos chatos).

2.2 Extração de DNA e Genotipagem com Marcadores Microssatélites

Para a extração de DNA foram coletadas folhas jovens de plantas do BAG, identificadas e armazenadas a -80 °C. O DNA genômico foi isolado de acordo com protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998), sendo utilizadas entre 0,15 e 0,20g de tecido vegetal, quantificado com Fluorômetro (Qubit™, Invitrogen) e as concentrações ajustadas para 10 ng/μl para as reações de amplificação via PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Tabela 1. Cultivares e seleções que compõem o painel associativo de *P. persica* da Embrapa, genealogia, origem, década de melhoramento das cultivares lançadas pelo Programa de Melhoramento e características dos genótipos relativas ao fruto. Embrapa Clima Temperado, Pelotas RS, 2013.

N°	Genótipo	Genealogia	Origem ^a	Década de lançamento ^b	Características Fruto			
					TF ^c	CP ^d	TP ^e	TC ^f
1	Abóbora	desconhecida	Embrapa	Pré-1960	Pi	A	Nf	Ad
2	Ágata	(68201041 x C2R19T182) PL	Embrapa	1970	Pi	A	Nf	Ad
3	Aldrighi	PL Arthur Kaster / Santa Eulalia - resultado de variedades trazidas da Argentina	Embrapa	Pré-1960	Pi	A	Nf	Ad
4	Alpes	Aldrighi - seleção 439 x Tapes	Embrapa	1980	Pi	A	Nf	Ad
5	Amarillo	desconhecida	Bolívia		N			SI
6	Anita	Seedling (Introdução de New Jersey)	Embrapa	1990	N	B	F	Ad
7	Apote	desconhecida	Bolívia		Pi		Nf	
8	Arlequim	Lake City x Toschina	IAC		Pn	B	F	L
9	Atenas	Jade x desconhecido	Embrapa	2000	Pi	A	Nf	Ad
10	Aurora 1	Ouromel-3 PL	IAC		Pn	A	Nf	Ad
11	Aurora 2	desconhecida	IAC		Pn	A	F	Ad
12	Babcock	(Strawberry x Peento) F2	Flórida	Pré-1960	Pn	A	Nf	Ad
13	Barbosa	desconhecida	Embrapa	1990	Pn	B	F	L
14	Bolinha	desconhecida	Embrapa	1980	Pi	A	Nf	Ad
15	BR1	Delicioso x Panamint	Embrapa	1970	Pn	B	F	Ad
16	BR3	Pala PL = (Coral x Panamint) PL	Embrapa	1970	Pn	B	F	SI
17	Cai	Delicioso x Lake city	Embrapa	1960	Pn	B	F	Ad
18	Capdeboscq	(Lake city x Intermediário) PL	Embrapa	1960	Pi	A	Nf	Ad
19	Cardeal	(338-90 FV) PL = (24401 x 17825) PL	Embrapa	1960	Pn	A	F	SI
20	Regalo (Cascata 730)	Chula x Chimarrita	Embrapa	2000	Pn	B	F	Ad
21	Cascata 805	Chimarrita x Della Nona	Embrapa		Pn	B	F	SI
22	Cascata 828	Taquari 19 x FLA 6-12	Embrapa		C	B	F	
23	Cascata 838	Taquari 19 x FLA 6-12	Embrapa		C	A	F	SI
24	Fascínio (Cascata 1032)	(Chimarrita x Linda) PL	Embrapa	2000	Pn	B	Nf	Ad
25	Cascata 1303	Cascata 951 x Maciel	Embrapa		Pn	A	Nf	Ad
26	Cascata 1373	Cascata 828 PL	Embrapa		C	A	Nf	Ad
27	Cerrito	(Lake city x Intermediário) PL	Embrapa	1960	Pi	A	Nf	Ad
28	Chimarrita	Babcock x Flordabella	Embrapa	1980	Pn	B	F	SI
29	Chiripá	Delicioso x Nectared 5	Embrapa	1970	Pn	B	F	L
30	Conserva 334	seleção de sementes dos EUA	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
31	Conserva 594	(Capdeboscq x Madrugador) PL	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
32	Conserva 672	Topázio x Conserva 334	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
33	Conserva 930	Conserva 531 (Convênio x RR 53272) x Eldorado	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
34	Conserva 947	Bolinha x P60 -22	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
35	Conserva 1566	Esmeralda x Conserva 594	Embrapa		Pi	A	Nf	
36	Conserva 1578	Ametista x Conserva 594	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
37	Conserva 1596	Conserva 672 x Leonense	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
38	Conserva 1600	Conserva 672 x A334	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
39	Conserva 1612	Atenas x Riograndense	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
40	Conserva 1666	Conserva 1182 x Precocinho	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad

Tabela 1 (continuação)

N°	Genótipo	Genealogia	Origem ^a	Década de lançamento ^b	Características Fruto			
					TF ^c	CP ^d	TP ^e	TC ^f
41	Conserva 1798	Jubileu x Conserva 1248	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
42	Convênio	(Amsden x Abóbora) PL	Embrapa	1960	Pi	A	F	Ad
43	Coral	(Delicioso x Interlúdio) PL	Embrapa	1960	Pn	B	F	SI
44	Coral 2	mutação selecionada na cv. Coral	Embrapa	1980	Pn	B	F	SI
45	Cristal-taquari	desconhecida	Embrapa	Pré-1960	Pn	B	Nf	Ad
46	Delicioso	desconhecida	Embrapa	Pré-1960	Pn	B	F	L
47	Della Nona	(Delicioso x Nectared 5) PL	Embrapa	1990	Pn	B	F	L
48	Diamante	Convênio x seleção Pelotas 77 (Cardeal x Aldrighi/ PL)	Embrapa	1970	Pi	A	Nf	Ad
49	Dulce	NJN67 x Pala (Coral x Panamint)	Embrapa	1990	N	B	F	SI
50	Edmundo Perret	desconhecida	Embrapa	Pré-1960	Pn	B	F	Ad
51	Eldorado	Gaudério x Serrano	Embrapa	1980	Pi	A	Nf	Ad
52	Eragil	desconhecida	SC		Pn	A	F	L
53	Esmeralda	Alpes x RR 37-201	Embrapa	1980	Pi	A	Nf	Ad
54	Ewtrin	desconhecida			N	B	F	Ad
55	Farrapos	(Edmundo Perret x Aldrighi) PL	Embrapa	1960	Pi	A	Nf	
56	Flordabella	Fla 16-6 (Southland x Hawaiian, F2) x Flordawon	Flórida		Pn	A	F	L
57	Flordaglo	Sundowner x Maravilha	Flórida		Pn	B	F	Ad
58	FlordaGrande	FLA5-58 x (Flordasun x Springtime)	Texas		Pn	A	F	L
59	Flordaking	FLA9-67 x Early Amber	Flórida		Pn	A	F	Ad
60	Flordaprince	FLA2-7 x Maravilha	Flórida		Pn	A	F	Ad
61	Galaxy	P34-106 x D33-1	Califórnia		Pn	B	F	Ad
62	Gaúcho	desconhecida	Embrapa	1980	Pn	B	F	SI
63	Gaúcho de Porto Alegre	Delicioso x desconhecido	Embrapa	1980	Pn	B	F	SI
64	Gaudério	(Delicioso x Interlúdio) PL	Embrapa	1960	Pn	A	F	Ad
65	Granada	Granito PL = (Alpes x Conserva 102)PL	Embrapa	1990	Pi	A	Nf	Ad
66	Interlúdio	(Southland x Jewel) PL	Embrapa	Pré-1960	Pn	A	F	SI
67	Jade	(Alpes x RR.53.272 (EUA)) PL	Embrapa	1980	Pi	A	Nf	Ad
68	Josefina	PL (Ouromel x Rubrosol) F2	IAC		N	B	F	L
69	Jubileu	Bolinha x Conserva 662	Embrapa	1990	Pi	A	Nf	Ad
70	Kampai	Chimarrita x Flordaprince	Embrapa	2000	Pn	B	F	SI
71	Leonense	seleção de <i>seedling</i> F2 (Brilhante x NJC 97)	Embrapa	1990	Pi	A	Nf	Ad
72	Libra	Conserva 594 (Capdeboscq x Madrugador) x Pepita	Embrapa	2000	Pi	A	Nf	Ad
73	Linda	(NJ 238 x Sunred) PL	Embrapa	1980	N	A	F	Ad
74	Lord	(Taquari 96) PL = (Abóbora x Taquari precoce) PL	Embrapa	1970	Pi	A	Nf	Ad
75	Maciel	Conserva 171 x Conserva 334	Embrapa	1990	Pi	A	Nf	Ad
76	Madrugador	(Aldrighi x Taquari precoce) PL	Embrapa	1960	Pi	A	Nf	Ad
77	Magno	Ambrósio Perret x Tapes	Embrapa	1970	Pi	A	Nf	Ad
78	Mara	Nectared 9 x Sunred (Rubrosol)	Embrapa	1990	N	A	F	SI
79	Marli	Delicioso x Prelúdio	Embrapa	1980	Pn	B	F	SI
80	Minuano	Carapuça PL			Pn	A	F	SI
81	Mollares Hierro	desconhecida	Ilhas Canárias		Pn	B	F	L
82	Morro Redondo	(Lake city x Intermediário) PL	Embrapa	1960	Pi	A	Nf	Ad
83	Natal	Suber x Toschina	IAC		Pn	B	F	Ad

Tabela 1 (continuação)

Nº	Genótipo	Genealogia	Origem ^a	Década de lançamento ^b	Características Fruto			
					TF ^c	CP ^d	TP ^e	TC ^f
84	Necta 468	BR3 x Necta IAPAR	Embrapa		N	B	F	Ad
85	Necta 480	Conserva 1134 x Sungen	Embrapa		N	A	Nf	Ad
86	Necta 496	Necta 343 (Caí x N. Remanso) x Sabrina	Embrapa		N	B	F	Ad
87	Necta 511	Conserva 1166 PL = (Cerrito x A 334 CN) PL	Embrapa		N	A	Nf	Ad
88	Necta 512	Conserva 1166 PL = (Cerrito x A 334 CN) PL	Embrapa		N	A	Nf	Ad
89	Necta 528	Dulce x Sunsnow	Embrapa		N	B	Nf	SI
90	Necta 532	Necta 432 x Sunblaze	Embrapa		N	A		L
91	Okinawa	desconhecida	Japão		Pn	B	F	L
92	Olímpia	Bolinha x 7-28	Embrapa	2000	Pi	A	Nf	Ad
93	Ônix	Farrapos PL x desconhecido	Embrapa	1980	Pi	A	Nf	Ad
94	Pampeano	desconhecida	Embrapa	1990	Pn	B	F	SI
95	Panamint	(Babcock x Boston) x (Goldmine x Rio Oso Gem)	Califórnia	Pré-1960	N	A	F	L
96	Pepita	Precocinho PL	Embrapa	2000	Pi	A	Nf	Ad
97	Pérola de Itaquera	desconhecida	IAC		Pn	B	Nf	Ad
98	Pilcha	Precoce Rosado PL	Embrapa	1980	Pn	A	F	Ad
99	Piratini	Ambrósio Perret x Tapes	Embrapa	1960	Pi	A	Nf	Ad
100	Planalto	Coral x Babcock	Embrapa	1990	Pn	B	Nf	Ad
101	Precocinho	Diamante PL	Embrapa	1980	Pi	A	Nf	Ad
102	Premier	(Cardeal x 15 de novembro) PL	Embrapa	1960	Pn	B	F	Ad
103	Princesa	Hawai x Southland	Embrapa	1960	Pn	A	F	SI
104	Real	desconhecida	IAC		Pi	A	Nf	Ad
105	Riograndense	PL (Brilhante x seleção NJC 97)	Embrapa	1990	Pi	A	Nf	Ad
106	Rubimel	Chimarrita x Flordaprince	Embrapa	2000	Pn	A	F	SI
107	Safira	Ambrósio Perret x Cerrito	Embrapa	1980	Pn	A	Nf	SI
108	São Pedro	Introdução da Argentina			Pn	A	F	SI
109	Santa Áurea	Cerrito x NJC 88	Embrapa	2000	Pi	A	Nf	Ad
110	Sentinela	PL Premier	Embrapa	1980	Pn	B	F	Ad
111	Sinuelo	Prelúdio x Amarelinho	Embrapa	1970	Pn	A	F	SI
112	Sulina	Princesa x Premier	Embrapa	1980	Pn	B	F	Ad
113	Sunblaze	FLA3-4N x FLA5-9	Flórida		N	A	F	SI
114	Sunhigh	J. H. Hale x (Carman x Slappey)	EUA	Pré-1960	Pn	A	F	SI
115	Sunmist	Flordaglo x Mayfire	Flórida		N	B	F	Ad
116	Taquari 80	Delicioso x Interlúdio			Pn	B	F	SI
117	Tarumã	(Aldrighi x (Amsdem x Abóbora))PL	Embrapa	1960	Pi	A	Nf	Ad
118	Topázio	PL Convênio x Pelotas 76 (Aldrighi x Taquari precoce)	Embrapa	1970	Pi	A	Nf	Ad
119	Tropic Beauty	FLA3-2 x Flordaprince	Flórida		Pn	A	F	Ad
120	Tropic Blush	{[(Southland x Jewel) PL] x Kaygold} PL	Flórida/Texas		Pn	A	Nf	Ad
121	Tropic Snow	FLA7-11 x Maravilha	Texas		Pn	B	F	SI
122	Turquesa	PL Convênio x Cerrito	Embrapa	1970	Pi	A	Nf	Ad
123	Vanguarda	(Alpes x RR 55-272) x desconhecido	Embrapa	1980	Pi	A	Nf	Ad
124	Alvorada	Cardeal PL	Embrapa	1960	Pn	A	F	Ad
125	Âmbar	Esmeralda x Conserva 555	Embrapa	2000	Pi	A	Nf	Ad
126	Ametista	(Alpes x RR-37-201) PL	Embrapa	1990	Pi	A	Nf	
127	AztecGold	[(Mexican Cling x Sunred) F2] PL	México		Pn	A	Nf	Ad

Tabela 1 (continuação)

Nº	Genótipo	Genealogia	Origem ^a	Década de lançamento ^b	Características Fruto			
					TF ^c	CP ^d	TP ^e	TC ^f
128	Babygold 7	(Lemon Free x PI35201) x [(J. H. Hale x Goldfinch) PL]	EUA		Pi	A	Nf	Ad
129	Babygold 9	desconhecida	EUA		Pi		Nf	
130	Baronesa	(Hawai x Southland) PL		1960	Pn	A	F	SI
131	Blancona	desconhecida	Bolívia		Pn	B	F	L
132	Bonão	Conserva 594 (Capdeboscq x Madrugador) x Pepita	Embrapa	2000	Pi	A	Nf	Ad
133	c-2006-198-48	Jubileu x Fu. so. Tao	Embrapa					
134	c-2006-201-2	Jade x Fu. so. Tao	Embrapa					
135	c-2006-201-9	Jade x Fu. so. Tao	Embrapa					
136	Carapuça	(Southland x Jewel) PL	Embrapa	1960	Pn	A	F	SI
137	Cascata 349	(NJ 230 x FLA2631) PL	Embrapa		Pn	A	F	SI
138	Cascata 700	Cascata 564 x Escarlata	Embrapa		Pn	A	F	Ad
139	Cascata 727	Conserva 327 x Taquari 19	Embrapa		Pn	B	Nf	Ad
140	Cascata 1005	C92-16 (Chimarrita x Cristal Taq.) PL	Embrapa		Pn	A	Nf	
141	Cascata 1015	Ametista x A170	Embrapa		Pn	A	Nf	
142	Cascata 1055	Chinoca x Granada	Embrapa		Pn	B	Nf	
143	Cascata 1067	BR3 x A333	Embrapa		Pn	B	Nf	
144	Cascata 1423	Fascínio (Cascata 1032) PL	Embrapa		Pn	B	F	SI
145	Cascata 1429	Fascínio (Cascata 1032) PL	Embrapa		Pn	B	F	SI
146	Cascata 1493	(Cascata 253 x A425) PL	Embrapa		Pn	B	Nf	Ad
147	Cascata 1511	Cascata 972 x Runipan 2	Embrapa		C	B	F	Ad
148	Cascata 1513	Cascata 845 x Chimarrita	Embrapa		Pn	B	F	SI
149	Cascata 1577	Tropic Snow x Marfim	Embrapa		Pn	B	F	SI
150	Cascata 1669	Cascata 805 x Aurora 1	Embrapa		Pn	B	F	SI
151	Chato 10	(Peento MF) PL	Embrapa		C	B	F	L
152	Chato 11	Capdeboscq x Cascata 69	Embrapa		C	A	F	Ad
153	Chato 13	(Aldrighi x Cascata 69) PL	Embrapa		C	B	F	L
154	Chula	Delicioso x Panamint	Embrapa	1990	Pn	B	F	L
155	Conserva 657	(Brilhante x NJC 97) PL	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
156	Conserva 1127	Maciel x A320	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
157	Conserva 1218	Conserva 672 x Maciel	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
158	Conserva 1278	Conserva 1125 x desconhecido	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
159	Conserva 1526	Conserva 672 x A334	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
160	Conserva 1556	Conserva 672 x A334	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
161	Conserva 1806	Conserva 1062 x Maciel	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
162	Conserva 1812	Ametista x Conserva 1125	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
163	Douradão	Dourado-1 PL	IAC		Pn	A	F	L
164	Dourado 2	Tutu (IAC 1353-1) x Maravilha (FLA 13-72)	IAC		Pn	A	F	L
165	Early Diamond	desconhecida			N	A	F	Ad
166	Flor da star	desconhecida	Flórida		Pn	A	F	Ad
167	Granito	Alpes x Conserva 102	Embrapa	1990	Pi	A	Nf	Ad
168	Ingo	desconhecida			Pn	B	F	L
169	July Elberta	desconhecida			Pi	A	F	
170	La Feliciania	Dixigem PL	Louisiana		Pn	A	F	L
171	Lotus	desconhecida	EUA		N	A	F	L
172	Maravilha	Sunred x 28-48 (Okinawa x Highland)PL	Flórida		Pn	B	F	Ad

Tabela 1 (continuação)

N°	Genótipo	Genealogia	Origem ^a	Década de lançamento ^b	Características Fruto			
					TF ^c	CP ^d	TP ^e	TC ^f
173	Marfim	Coral x pólen da China (Gang Shan Suo Shang)	Embrapa	1990	Pn	B	Nf	Ad
174	Necta 422	IACN30-74-49 x A334CN	Embrapa		N	A	Nf	Ad
175	Necta 466	(Eldorado x A403CN) PL	Embrapa		N	A	Nf	Ad
176	Necta 508	(Sunred x Rayon) PL	Embrapa		N	A	F	SI
177	Necta 529	Tropic Snow x Marfim	Embrapa		N	A	F	SI
178	Necta 531	Tropic Snow x Marfim	Embrapa		N	B	F	SI
179	Necta 543	Sun Snow x Necta 420 (Branca NE x Linda NE)	Embrapa		N	B	F	L
180	Necta 3973	desconhecida	Embrapa		N	B	F	Ad
181	Morena	desconhecida	Espanha		N	A	F	
182	Nectared 5	desconhecida	New Jersey		N	A	F	Ad
183	Norman	desconhecida	Carolina do Norte		Pn	A	F	L
184	Piazito	(C 79.53.22) PL			Pn	B	F	SI
185	Rayon	desconhecida	EUA		Pn	A	F	Ad
186	Rei Del Monte	desconhecida	Uruguai		Pn	A	F	
187	Sel. Bolinha 9	Bolinha PL	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
188	Sel. Bolinha 17	Bolinha PL	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
189	Sel. Bolinha 25	Bolinha PL	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
190	Sel. Bolinha 26	Bolinha PL	Embrapa		Pi	A	Nf	Ad
191	Springcrest	[(Firglowx Hiley)x Fireglow] x Springtime	Geórgia		Pn	A	F	
192	Suncoast	FLA9-12N x FLA7-3N	Flórida		N	A	F	L
193	Sunlite	Fla 8B-27 (Okinawa x Panamint) x NJN21	IAC		N	A	F	SI
194	Sunred	Fla R9T10 x Panamint			N	A	F	Ad
195	Super morena	desconhecida	Espanha		N	A	F	SI
196	Talismã	Rei da Conserva x Jewel	IAC		Pn	B	F	Ad
197	Taq 98	(B. XVI-16 x Delicioso) PL			Pn	B	F	Ad
198	Tsukuba	desconhecida	Japão					
199	Tx 1A 95	TX1193-1 x desconhecido	Texas		Pn	A	F	Ad
200	Tx 1A 100	TXW1192-2 x Earligrande	Texas		Pn	A	F	
201	Tx 1A 125	Tropic Beauty x FLA 84-4	Texas		Pn	A	F	Ad
202	Tx 1A 150	desconhecida	Texas		Pn	A	F	Ad
203	Tx 2A 232 LWN	Sunmist x Arctic Star	Texas		N	B	F	Ad
204	Vila Nova	Cristal x Princesa	Embrapa	1960	Pn	A	F	L

PL = Polinização livre.

IAC = Instituto Agrônomo de Campinas

^a Programa de Melhoramento ou país de origem do genótipo.

^b Década de lançamento da cultivar (somente para cultivares de origem do Programa de Melhoramento da Embrapa).

^c TF (tipo de fruto), sendo Pi = pêssego tipo conserva; Pn = pêssego para consumo *in natura*; N = nectarina e C = pêssego chato.

^d CP (cor de polpa), sendo A = polpa amarela e B = polpa branca.

^e TP (tipo de polpa), sendo F = polpa fundente e Nf = polpa não-fudente.

^f TC (relação caroço e polpa), sendo Ad = caroço aderido; SI = caroço semi-livre e L = caroço livre.

Os 204 genótipos de pessegueiro foram analisados com 10 *loci* SSR, previamente desenvolvidos para *P. persica* por diferentes grupos de pesquisa e distribuídos nos oito grupos de ligação do mapa de referência de *Prunus* cv. Texas x cv. Earlygold (TxE) (Tabela 2). Para a escolha destes 10 *loci* SSR foram considerados a informação de polimorfismo e os padrões de amplificação claros e repetitivos.

Um iniciador CACGACGTTGTAAAACGAC M-13 foi adaptado na sequência *Forward* do *primer*. As reações primárias de PCR foram realizadas em um volume final de 10 µL, contendo cada amostra 2,0 µL de DNA genômico (10ng/µL); 2,0 µL do *primer* (*forward* com iniciador M-13 e *reverse*) (Invitrogen) na concentração de 1,0 µM; 5,0 µL do mix Go Taq Green Master (Promega) e 1,0 µL do iniciador marcado M-13 com corante de fluorescência (M-13.FWD(-29)/IRDye 800 *Primer*) (LI-COR) na concentração de 1,0 µM. O programa de amplificação foi executado em termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystems*) conforme segue: ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, anelamento de 50°C a 58°C por 45 segundos, de acordo com a temperatura ideal de cada *primer* (Tabela 2) e extensão a 72°C por 2 minutos, finalizando com um ciclo de extensão a 72°C por 4 minutos.

Tabela 2. Características dos 10 *loci* SSR utilizados na genotipagem dos 204 genótipos de *P. persica*. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2013.

Locus	Ta (°C)	GL	Referência
pchgms3	58	G 1	SOSINSKI et al., 2000
BPPCT020	58	G 1	DIRLEWANGER et al., 2002
BPPCT002	58	G 2	DIRLEWANGER et al., 2002
BPPCT007	57	G 3	DIRLEWANGER et al., 2002
BPPCT015	56	G 4	DIRLEWANGER et al., 2002
BPPCT014	57	G 5	DIRLEWANGER et al., 2002
BPPCT017	56	G 5	DIRLEWANGER et al., 2002
UDP98-407	58	G 6	CIPRIANI et al., 1999
CPPCT022	50	G 7	ARANZANA et al., 2002
CPPCT006	55	G 8	ARANZANA et al., 2002

Ta: temperatura de anelamento utilizada.

GL: grupo de ligação onde está localizado o marcador SSR.

As reações primárias de amplificação via PCR foram diluídas com água milli-q estéril para uma concentração desejável que permitisse uma clara visualização dos

fragmentos amplificados, geralmente numa proporção de 1:20 a 1:50 (1 µL da reação primária para 20 a 50 µL de água milli-q esterilizada) sendo necessário ajuste para cada *primer*. Após ajustada a concentração ideal, 2 µL da diluição da reação de PCR e solução *Blue Stop* (LI-COR) numa proporção de 1:1 foram desnaturadas a 94 °C por 3 minutos em termociclador anteriormente descrito.

Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 6,5% (LI-COR), utilizando 4300 DNA Analyzer LI-COR, sendo carregados no gel 0,8 µL das reações de amplificação desnaturadas e a corrida programada para um período de 1 hora e 30 minutos a 1500 V e 40 mA. O tamanho dos alelos foi dimensionado com o marcador de DNA de peso molecular de 50-350 pb IRDye 800 (LI-COR). O software Saga Generation 2 (LI-COR) foi utilizado para visualização, registro e análise dos fragmentos amplificados.

2.3 Análise de Dados

Análise da Variabilidade Genética

Para avaliar as informações obtidas com os 10 *loci* SSR estudados, os seguintes parâmetros foram calculados: número de alelos observados por *locus* (N_a), número efetivo de alelos por *locus* (N_e) ($N_e = 1 / \sum p_i^2$, onde p_i é a frequência alélica na população *ith* para cada *locus*), heterozigosidade observada (H_o) ($H_o =$ número de acessos heterozigotos / número total de acessos), heterozigosidade esperada (H_e) ($H_e = 1 - \sum p_i^2$) e índice de fixação de Wright ou coeficiente de endogamia ($F = 1 - H_o/H_e$) (WRIGHT, 1978). Estes parâmetros foram calculados utilizando o software POPGENE versão 1.32 (YEH et al., 1997). O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) (BOTSTEIN et al., 1980), indicativo da habilidade de um marcador discriminar dois acessos aleatoriamente, foi estimado para cada *locus*, assim como a frequência alélica e o número de genótipos que o marcador conseguiu diferenciar, utilizando o software Powermarker 3.25 (LIU; MUSE, 2005).

Os 204 genótipos que compõem o painel associativo também foram divididos em quatro subgrupos de acordo com caracteres morfológicos relativos ao fruto: pêssego fundente, pêssego não-fundente, nectarina e pêssego chato e para cada subgrupo foram calculados os parâmetros de variabilidade genética acima descritos.

Para comparação genética entre clones de fundação e décadas de melhoramento, foram agrupados os clones de fundação do programa e as cultivares lançadas pelo Programa de Melhoramento Genético da Embrapa de acordo com a década de lançamento, com o objetivo de avaliar alterações nas contagens alélicas de cada *locus* SSR analisado. O número total de alelos de uma determinada década de melhoramento foi calculado pela soma do número de alelos presentes nas cultivares nesse período.

Para cada *locus* microssatélite os amplicons foram pontuados como um (1) para alelo homocigoto, 0.5 para cada fragmento quando alelo heterocigoto e zero (0) para alelo ausente, sendo posteriormente convertidos em uma matriz de dados a partir da qual foi estimada a distância genética entre os genótipos por meio da distância de Rogers modificado (GOODMAN; STUBER, 1983). Com base na matriz de distância genética foi construído um dendrograma pelo método de agrupamento da distância média UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). O ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (r), conforme Sokal e Rohlf (1962), utilizando o programa NTSYS-pc (ROHLF, 2005). Com o auxílio do programa NTSYSpc foi também realizada a análise fatorial de coordenadas principais, com base na mesma matriz de distância genética utilizada na construção do dendrograma, visando identificar a formação de subgrupos através de gráficos em 3 dimensões.

Análise de Estrutura de População

A estrutura genética foi determinada por meio de análise Bayesiana utilizando o software STRUCTURE versão 2.3.1 (PRITCHARD et al., 2000). Esta análise utiliza um método de agrupamento que identifica K grupos de genótipos com frequências alélicas distintas, assumindo que há equilíbrio de Hardy - Weinberg e ausência de desequilíbrio de ligação entre os *loci* analisados dentro de cada população. Os acessos podem ser membros de múltiplas subpopulações com um coeficiente diferente, sendo a soma destes igual a 1.

O programa foi executado com uma predefinição de número de grupos (K) variando de 1 a 10 e vinte simulações independentes para cada K, usando o modelo de combinação que utiliza a correlação das frequências alélicas entre os

agrupamentos (K) e ancestralidade comum (*Admixture Model*) entre os acessos. Cada simulação teve um período de *burn-in* de 10.000 e posteriormente 100.000 interações. Utilizou-se a estatística ΔK (em que K especifica o número mais provável de subgrupos), com base na taxa de variação da probabilidade log dos dados (EVANNO et al., 2005) para selecionar o número correto de agrupamentos (K). As réplicas computadas de cada valor de K selecionado foram submetidas à análise de sumarização dos resultados por meio do software CLUMPP versão 1.1.2 (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007) e os resultados das sumarizações representados de forma gráfica por meio do software DISTRUCT versão 1.1 (ROSENBERG, 2004).

Distribuição da variabilidade genética

A análise de variância molecular (AMOVA) foi calculada com auxílio do programa GENES (CRUZ, 2006) tendo como base o modelo de estrutura genética identificado pelo software STRUCTURE. Pela AMOVA, com base na matriz de distância Euclidiana entre os pares de genótipos, foi estimada a proporção da variação total encontrada entre e dentro dos subgrupos (EXCOFFIER et al., 1992). Também foram obtidas análises de comparação 2x2 entre os subgrupos. Para testar a significância dos resultados da AMOVA, foi utilizado o método não paramétrico de permutações, sendo adotadas 1000 permutações ao acaso.

3. Resultados e Discussão

3.1 Variabilidade Genética em pessegueiro

Todos os 10 *loci* SSR utilizados neste estudo foram polimórficos e amplificaram no máximo dois alelos por genótipo de acordo com o nível diploide desta espécie. Um total de 80 alelos foram identificados nos 204 genótipos analisados, com média de oito alelos identificados por *locus*. Este valor foi superior às médias observadas por diversos autores ao analisarem acessos de *P. persica* [4,2 alelos por *locus* (DIRLEWANGER et al., 2002); 7,3 (ARANZANA et al., 2003); 6,36 (ARANZANA et al., 2010); 6,5 (ANDERSON, 2010); 6,73 (BOUHADIDA et al., 2011); 6,4 (CAO et al.,

2012); 5,1 (FORCADA et al., 2013)], provavelmente pelo uso de um painel de genótipos de pessegueiro mais diverso e um conjunto de microssatélites com maior nível de polimorfismo.

Os alelos obtidos nos diferentes *loci* e as suas respectivas frequências podem ser visualizados na tabela 3. O *locus* BPPCT015 detectou o maior número de alelos (14) no conjunto de genótipos em estudo, seguido por CPPCT022 (11), enquanto o menor número foi detectado em CPPCT006, com apenas quatro alelos diferentes identificados.

A região de amplificação ocorreu em torno de 20 pb após a especificação do *primer*, devido ao uso do iniciador M-13 adaptado na sequência *Forward* do *primer*. Os alelos mais frequentes neste estudo foram detectados nos *loci* BPPCT002 (248 pb), BPPCT007 (161 pb) e Pchgms3 (199 pb) com frequência superior a 65%. Já 42 alelos (52,5%) apresentaram baixa frequência (inferior a 5%), dos quais nove foram restritos a um único genótipo com frequência de 0,25% (Tabela 3). Todos os 10 *loci* analisados apresentaram pelo menos um alelo raro (frequência inferior a 5%).

Os nove alelos exclusivos foram detectados em sete genótipos sendo que Amarillo e Arlequim apresentaram dois alelos exclusivos cada, os demais foram detectados em Tarumã, Springcrest, Natal e Vila Nova, introduções ou cultivares mais antigas provavelmente não utilizadas em cruzamentos nos programas de melhoramento por alguma característica desfavorável, e um alelo exclusivo encontrado em uma seleção recente de pêssigo chato, Cascata 1511, originária de cruzamento com pólen vindo da China.

O número efetivo de alelos (N_e), que representa o número de alelos observados com maior frequência (superior a 5%) na população apresentou média de 3,05 representando 38,13% do total de alelos identificados. Os valores da heterozigosidade observada (H_o) para todos os *loci* foram menores que a correspondente heterozigosidade esperada (H_e) (Tabela 4). A heterozigosidade observada variou de 28% em CPPCT006 a 62% em BPPCT015, com um valor médio de 46%. A heterozigosidade esperada variou entre 50% (BPPCT002 e BPPCT007) e 80% (BPPCT017), com um valor médio de 63%. Conseqüentemente, o índice de fixação de Wright (F) que compara H_e com H_o estimando o grau de fixação de alelos por *locus*, apresentou valores positivos com média de 0,28.

Tabela 4. Parâmetros de variabilidade genética calculados para 10 *loci* SSR em 204 acessos de pessegueiro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2013.

<i>Locus</i>	Na	Ne	Ho	He	F	PIC	Nº # genótipos
pchgms3	7	2,10	0,34	0,52	0,35	0,50	19
BPPCT020	7	2,75	0,45	0,64	0,29	0,58	13
BPPCT002	7	1,98	0,35	0,50	0,30	0,45	14
BPPCT007	7	2,01	0,38	0,50	0,24	0,46	12
BPPCT015	14	3,58	0,62	0,72	0,14	0,70	36
BPPCT014	5	2,39	0,44	0,58	0,25	0,54	11
BPPCT017	9	4,95	0,59	0,80	0,27	0,77	27
UDP98-407	9	4,58	0,57	0,78	0,27	0,75	25
CPPCT022	11	3,91	0,59	0,74	0,21	0,72	34
CPPCT006	4	2,25	0,28	0,56	0,50	0,46	7
Média	8	3,05	0,46	0,63	0,28	0,59	19,8
Total	80	30,50					198

Na= número de alelos observados; Ne= número efetivo de alelos; Ho= heterozigosidade observada; He= heterozigosidade esperada; F= índice de fixação de Wright; PIC= conteúdo de informação polimórfica; Nº # genótipos= diferentes genótipos discriminados por *locus* individual.

O número de alelos identificado por *locus* e a região de amplificação foram similares aos encontrados por Bouhadida et al. (2011) ao analisar 94 cultivares incluindo *landraces* de pessegueiro espanhol e cultivares comerciais estrangeiras, quando comparados os 4 *loci* em comum com este estudo, porém com parâmetros de variabilidade genética inferiores aos encontrados neste estudo.

Anderson (2010) analisando 155 cultivares de pessegueiro com origem em programas de melhoramento da Ásia, Brasil, Europa e Estados Unidos com 11 *loci* SSR com a finalidade de estudar as relações genéticas entre cultivares de pessegueiro de baixa necessidade de frio hibernal comparado com germoplasma de alta necessidade de frio, encontrou 6,5 alelos por *locus*. Cao et al. (2012) genotiparam 104 *landraces* de pessegueiro provenientes de 6 regiões geográficas da China (centro de origem do pessegueiro) com 53 *loci* SSR e encontraram uma média de 6,4 alelos por *locus* com diversidade genética média de 0,567.

Forcada et al. (2013) em 94 cultivares de pessegueiro representando o germoplasma com *landraces* da Espanha e cultivares modernas de programas de melhoramento internacionais com 40 *loci* SSR (sete *loci* em comum com este estudo) encontraram uma média de 5,1 alelos por *locus*. Já a heterozigosidade observada (*Ho*) pelos mesmos autores foi similar ao presente estudo com valores de 0,48 e 0,46 respectivamente. Por outro lado, Bouhadida et al. (2011) encontraram valores de 0,23, a presença de alelos nulos neste último podem ter sido a causa das diferenças de *Ho*. Baixos valores de heterozigosidade geralmente indicam uma redução do nível de variação genética, devido à endogamia e mais provavelmente devido à natureza autofértil do pessegueiro (ANDERSON, 2010).

É possível afirmar que o germoplasma brasileiro conserva grande variabilidade genética sendo mais diverso que cultivares comerciais de pessegueiro e nectarineiras oriundas de programas de melhoramento da Espanha, Estados Unidos, França, Itália, Canadá e China analisadas por Aranzana et al. (2010) com 50 *loci* SSR, quando comparado apenas os parâmetros de variabilidade genética calculados para os oito *loci* SSR em comum com este estudo. O número de alelos por *locus* encontrados nas variedades comerciais analisadas foi de 7,6, enquanto neste estudo com os mesmos *loci* foram identificados 8,0 alelos por *locus*. A proporção de indivíduos heterozigotos (*Ho*) para cada *locus* também foi inferior, com média de 0,42 enquanto que no painel associativo da Embrapa a média foi de 0,46.

Com os oito *loci* SSR, no presente estudo foi possível distinguir uma média de 19,88 genótipos por *locus* individual enquanto que Aranzana et al. (2010) conseguiram diferenciar apenas 14,25 genótipos, comprovando que grande variabilidade genética encontra-se disponível neste painel associativo para uso no

programa de melhoramento genético. Além disso, indica que este conjunto de 10 *loci* SSR utilizados na genotipagem é suficiente para análise de variabilidade genética e estudos de *fingerprinting* de cultivares, pois na maioria dos casos, o uso de marcadores adicionais não produz um aumento relevante de informação.

No entanto, Yoon et al. (2006) encontraram valores superiores, com 8,6 alelos por *locus*, em 96 cultivares de pessegueiro chinesas analisadas com 33 *loci* SSR. Mesmo com um número menor de cultivares analisadas por estes autores em comparação com o presente estudo, estes analisaram uma coleção mais diversificada de cultivares incluindo pessegueiros ornamentais que são distintos dos pessegueiros utilizados para frutificação.

Valores superiores também foram encontrados por Li et al. (2013) em um amplo estudo sobre variabilidade de recursos genéticos de pessegueiro, utilizando dados obtidos por ARANZANA et al. (2010) estes autores analisaram uma coleção com 658 acessos de pessegueiro genotipados com 48 *loci* SSR, com aproximadamente dois terços destes acessos de origem oriental (China, Japão e Coréia) e o restante a partir de regiões ocidentais (Europa e EUA). A coleção incluiu cultivares tanto de programas de melhoramento orientais e ocidentais, bem como *landraces*, pessegueiros selvagens e outras espécies de *Prunus* estreitamente relacionadas com pessegueiro. Comparando os mesmos 8 *loci* SSR em comum com este estudo, uma média de 14,5 alelos foi obtida por estes autores enquanto em nosso painel associativo foram identificados 8,0 alelos por *locus*. Já para o número efetivo de alelos (N_e) valores de 3,02 e 2,99 foram obtidos respectivamente, provavelmente pelo grande número de alelos raros encontrados.

Ainda de acordo com estes autores, com a análise separada dos grupos de acessos de acordo com a origem, cultivares orientais apresentaram maior variabilidade, principalmente devido ao alto nível de heterozigosidade em variedades locais chinesas, algumas das variedades locais estudadas vieram do norte da China, especialmente do noroeste, centro de origem do pessegueiro e uma média de 10 alelos por *locus* foi amplificado a partir de 146 variedades locais chinesas, valores superiores aos relatados anteriormente por Cao et al. (2012). Desta forma, a inclusão de *landraces* chinesas em programas de melhoramento ocidentais teria um maior efeito sobre o aumento da diversidade genética (LI et al., 2013).

No presente estudo, o máximo valor de conteúdo de informação polimórfica (*PIC*) detectado foi de 0,77 no *locus* BPPCT017 enquanto o menos informativo foi BPPCT002 com valor de 0,45. O número de diferentes genótipos discriminado por cada *locus* individual variou entre 7 (BPPCT006) e 36 (BPPCT015) com uma média de 19,8. Os 10 *loci* SSR foram capazes de discriminar 198 genótipos de *P.persica* do total de 204 alvo deste estudo.

Não foi possível diferenciar Seleção Bolinha 9 de Seleção Bolinha 17, ambos os acessos apresentaram o mesmo perfil molecular para o conjunto de *loci* SSR analisados e são de polinização livre da cultivar Bolinha, provavelmente autofecundação desta. Da mesma forma Cascata 1423 não se diferenciou de 'Fascínio' provavelmente devido a primeira ser originária de polinização livre da segunda, assim como 'Ametista' e 'Esmeralda' que também apresentaram o mesmo perfil molecular, devido 'Ametista' ser originária de polinização livre de 'Esmeralda', portanto genótipos com estreito grau de parentesco.

A distância genética média geral entre os genótipos analisados foi de 0,62. A menor distância genética (0,16) foi detectada entre Cascata 1429 x 'Fascínio' e Cascata 1429 x Cascata 1423 ambas as seleções oriundas de polinização aberta da cultivar Fascínio. A mesma distância também foi encontrada entre Sel. Bolinha 9 x 'Bolinha' e Sel. Bolinha 17 x 'Bolinha', entre Conserva 1556 x Conserva 1596 que apresentam em comum como parental Conserva 672, 'Coral' x 'Coral 2', onde a segunda é originária de uma mutação da primeira e ainda 'Delicioso' x 'Gaúcho', ambas as cultivares tem genealogia desconhecida, suspeita-se que 'Gaúcho' apresenta 'Delicioso' na genealogia, confirmando ainda mais esta hipótese neste estudo pela estreita base genética encontrada.

A maior distância genética (0,97) foi detectada entre as cultivares Pampeano e Okinawa, sendo a primeira lançada pela Embrapa e acredita-se que tenha como progenitores 'Maravilha' ou 'Sentinela' enquanto 'Okinawa' é originária do Japão, atualmente muito utilizada como porta-enxerto e em trabalhos anteriormente realizados, também apresentou a maior distância genética em relação aos outros genótipos.

A análise de correlação cofenética entre o dendrograma e a matriz de dissimilaridade foi de 61,42%. O dendrograma resultante da análise dos 10 *loci* SSR possibilitou identificar subgrupos principais, relacionados principalmente com

características referentes ao fruto (Figura 2), separados em genótipos de polpa fundente e polpa não-fundente.

3.2 Variabilidade genética dentro de subgrupos definidos com base nos caracteres morfológicos de fruto

Os 204 genótipos alvo do estudo foram divididos em quatro subgrupos de acordo com caracteres morfológicos relativos ao fruto: pêsego fundente, pêsego não-fundente, nectarina e pêsego chato. Para a análise da variabilidade genética, como os subgrupos apresentavam diferentes números de genótipos, foi comparado o número de alelos por genótipo, conforme apresentado na tabela 5. Os acessos de pêsegos chatos ou platicarpa, amplificaram um número elevado de alelos por genótipo ($N_{a_i} = 5,37$) quando comparados aos pêsegos fundentes e não-fundentes.

Observou-se que o pêsego fundente e o não-fundente apresentaram número médio similar de alelos por subgrupo, inferiores aos encontrados no pêsego chato e nas nectarinas, provavelmente devido aos cruzamentos entre os primeiros serem mais direcionados dentro do subgrupo, pois, pelo maior período de melhoramento destas, as características agronômicas e de qualidade economicamente importantes já estão fixadas. Além disso, o melhoramento genético de pêsego chato é recente e no Brasil ainda não foi lançada nenhuma cultivar com esta característica de fruto, desta forma, diferentemente do pêsego fundente e não fundente, os cruzamentos de pêsego chato envolvem todos os subgrupos para a seleção de um genótipo com caracteres agronômicos e de qualidade adequados e com forma do fruto chato. Do mesmo modo para seleção de nectarinas, também muito se utilizou cruzamentos com os subgrupos de pessegueiro pela dificuldade de selecionar frutos com tamanho adequado.

Do mesmo modo, a heterozigosidade observada também foi superior no subgrupo de pêsego chato (0,53), seguido do pêsego fundente (0,48), sendo que este subgrupo apresentou 72 alelos do total de 80 alelos encontrados nos 204 genótipos alvo do estudo. Já o subgrupo não-fundente apresentou os maiores

níveis de homozigose ($H_o = 0,43$) seguido do subgrupo de nectarinas ($H_o = 0,44$) quando comparado com os subgrupos de pêsego fundente e chato (Tabela 5).

Tabela 5. Variabilidade genética de 10 *loci* SSR em diferentes subgrupos de *P. persica*. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2013.

	N°	Na	Na _i	Ne	Ne _i	Ho	He	F
Todos os genótipos	204	80	0,39	30,50	0,15	0,46	0,63	0,28
Pêssego Fundente	93	72	0,77	30,07	0,32	0,48	0,64	0,25
Pêssego Não-fundente	70	55	0,79	24,61	0,35	0,43	0,54	0,20
Nectarinas	33	53	1,61	24,02	0,75	0,44	0,50	0,13
Pêssego Chato	8	43	5,37	28,32	3,54	0,53	0,62	0,22

Na = número de alelos observados; Na_i = número de alelos observados / número de acessos do subgrupo; Ne = número efetivo de alelos; Ne_i = número efetivo de alelos / número de acessos do subgrupo; Ho = heterozigosidade observada; He = heterozigosidade esperada; F = índice de fixação de Wright.

A sequência de incremento de homozigose dos subgrupos corroboram com os resultados encontrados por Aranzana et al. (2010), excluindo o pêsego chato que não foi analisado por estes autores, o pêsego fundente apresentou os maiores valores seguido de nectarinas e inferior em pêsego não-fundente, com valores de H_o inferiores em todos os subgrupos comparados neste estudo. Esta diferença de H_o entre pêsego fundente e não fundente é provavelmente devido os cruzamentos no subgrupo fundente ocorrerem geralmente de forma controlada entre dois indivíduos, ser realizada seleção na progênie e a propagação deste genótipo ser feita vegetativamente por enxertia, fixando as características selecionadas. Por outro lado nos genótipos não-fundentes para destinação industrial, antes do surgimento do programa de melhoramento genético, frequentemente a propagação ocorreu por sementes e provavelmente este genótipo selecionado muitas vezes foi autopolinizado por algumas gerações. Assim, o *pool* gênico para seleção de genótipos para processamento provavelmente tenha sido menor que o *pool* gênico disponível para seleção de pêsegos para consumo *in natura*.

Do total de alelos encontrados em cada subgrupo, 24 alelos estão presentes nos quatro subgrupos, sendo que no subgrupo fundente foram encontrados oito alelos específicos, nas nectarinas três alelos específicos e pessegueiro não-fundente um alelo específico. Bouhadida et al. (2011) identificaram 92 alelos dos quais 41 alelos foram específicos para pessegueiros não-fundentes enquanto que

em relação a nectarineira e pessegueiros fundentes detectaram apenas um alelo específico em ambos os subgrupos diferindo da relação obtida no presente trabalho. O elevado número de alelos específicos em cultivares não fundentes encontrados por aqueles autores pode ser advinda do alta proporção de cultivares não-fundentes analisadas.

Aranzana et al. (2003) também observaram que o subgrupo de pessegueiro não-fundente é mais diverso, em relação aos subgrupos nectarineira e pessegueiro fundente. Os autores de ambos os trabalhos utilizaram germoplasma espanhol e observaram uma estreita base genética entre acessos de pessegueiro e nectarineiras de polpa fundente, grande parte cultivares introduzidas para substituição de variedades tradicionais, em comparação a acessos de pessegueiro com polpa não-fundente com destinação para indústria derivadas principalmente de *landraces* adaptadas às condições edafoclimáticas. Já no presente trabalho, é possível observar que a base genética de genótipos fundentes, em grande parte de origem de clones de fundação introduzidos, conserva ampla variabilidade, além das seleções locais especialmente originárias de genótipos de polpa não-fundente.

3.3 Comparação genética entre clones de fundação e novas cultivares

Nove dos clones de fundação do Programa de Melhoramento Genético da Embrapa, iniciado na década de 50, foram analisados neste estudo: 'Aldrighi', 'Abóbora', 'Edmundo Perret', 'Delicioso', 'Cristal-Taquari', 'Babcock', 'Interlúdio', 'Panamint' e 'Sunhigh' com a finalidade de explorar quanto do genoma destes está representado no germoplasma atual. Observou-se que 56,25% (45 alelos do total de 80 encontrados na população) do total de alelos presentes nas variedades atuais são encontrados nos clones de fundação. Destes alelos compartilhados entre os clones de fundação e o restante da população, apenas 20% (9 alelos dos 45 compartilhados) são considerados raros.

Em estudo sobre clones de fundação dos programas de melhoramento para baixa e média exigência em frio, Byrne et al. (2000) concluíram que para o desenvolvimento de cultivares de polpa fundente para consumo *in natura* do programa de melhoramento do Sul do Brasil, havia a participação ou a contribuição, em grande parte, de 'Delicioso', e para o desenvolvimento de

cultivares de polpa não-fundente, tipo conserva, contribuição da cultivar Aldrighi e 'Abóbora', considerando apenas os clones de fundação que foram analisados neste estudo, isto pode ser observado analisando a genealogia dos genótipos na tabela 1.

Uma análise de endogamia de 11 importantes cultivares comerciais de pessegueiro cultivadas no Sul do Brasil indicaram um nível muito baixo de co-ancestralidade entre essas cultivares em relação a diferentes grupos de cultivares de pessegueiro, como as do Leste dos Estados Unidos, Flórida e China. Entre o parentesco visto neste conjunto estão as variedades locais 'Delicioso', 'Aldrighi', '15 de Novembro', 'Prelúdio' e 'Gaudério', variedades norte-americanas, como 'Babcock', 'Panamint', e 'Nectared 5', e de germoplasma dos programas de melhoramento da Flórida e Nova Jersey (BYRNE; RASEIRA, 2006).

Diferentemente dos resultados encontrados por Aranzana et al. (2010) onde nenhum dos fundadores ficou agrupado com variedades de nectarineiras, apoiando a hipótese de que foram utilizados desde cedo diferentes recursos genéticos nos programas de melhoramento para obter pêssegos e nectarinas. No presente estudo clones de fundação (quando consideradas três subpopulações) além da nectarineira 'Panamint' (clone de fundação para esta variedade botânica) e outros clones de fundação como 'Interlúdio' e 'Sunhigh' ficaram agrupados neste subgrupo, confirmando a hipótese de que o mesmo *pool* gênico foi inicialmente utilizado para desenvolver novas cultivares de pessegueiro e também selecionar nectarineiras. No entanto, se analisarmos o subgrupo fundente apenas o clone de fundação 'Delicioso' principal cultivar utilizada para desenvolver pêssego de polpa fundente para consumo *in natura*, ficou agrupado neste subgrupo, O mesmo foi observado para o subgrupo não-fundente tipo conserva, onde agruparam apenas clones de fundação para esta finalidade ('Abóbora', 'Aldrighi' e 'Babycock'), demonstrando que *pools* genéticos diferentes foram utilizados desde o início do programa de melhoramento para seleção de cultivares para consumo *in natura* e tipo conserva.

Neste trabalho, foram utilizadas diferentes abordagens para a análise de dados SSR a fim de determinar se os níveis de variabilidade genética em cultivares de pessegueiro reduziram em consequência das atividades de melhoramento. Observou-se que o número total de alelos presente nas cultivares

separadas por década de melhoramento, variou numa amplitude de 40 a 53. As décadas de 1970 e 2000 foram ligeiramente inferiores quando comparado ao período anterior a 1960 composto pelos clones de fundação do programa de melhoramento, assim como a perda de alelos em relação aos clones de Fundação também foi superior ao ganho de alelos observado, enquanto a década de 1980 apresentou os maiores ganhos alélicos (Tabela 6).

Tabela 6. Alterações no número de alelos por década de melhoramento das cultivares de *P. persica* lançadas pelo Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Clima Temperado com base em 10 *loci* SSR. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2013.

<i>Loci</i>	Nº total de alelos ^a	Nº de alelos raros ^b	Contagem de alelos por década de Melhoramento					
			Pré-1960s (9) ^c	1960s (18)	1970s (10)	1980s (18)	1990s (16)	2000s (11)
pchgms3	6	2	3	4	4	6	5	4
BPPCT020	6	2	4	6	3	4	5	4
BPPCT002	6	3	3	6	3	5	4	3
BPPCT007	4	1	3	3	2	4	4	3
BPPCT015	9	4	7	7	6	7	8	5
BPPCT014	4	0	4	4	4	4	3	4
BPPCT017	8	3	6	6	6	7	6	7
UDP98-407	8	3	6	7	5	6	6	5
CPPCT022	9	5	6	6	5	6	6	6
CPPCT006	4	2	3	2	2	4	3	2
Total observado	64	25	45	51	40	53	50	43
Perda observada ^d				5	8	4	6	9
Ganho observado ^e				11	3	12	11	7

^a Número total de alelos de 82 cultivares lançadas pelo Programa de Melhoramento da Embrapa, incluindo nove clones de Fundação.

^b Referente a presença de alelos com frequência inferior a 5%.

^c Números entre parênteses indicam o número de cultivares de pessegueiro analisadas em determinada década.

^d Número de alelos perdidos nas cultivares lançadas em determinada década e presentes nos clones de fundação (Pré-1960s).

^e Número de alelos presentes nas cultivares lançadas em determinada década e ausentes nos clones de fundação (Pré-1960s).

Foi possível inferir que não ocorreu redução da variabilidade genética ao longo das décadas de melhoramento e as alterações nas frequências alélicas podem ser explicadas pelo contínuo enriquecimento do germoplasma através de intercâmbio e incorporação deste no programa de melhoramento, com

cruzamentos entre pessegueiros nacionais e introduzidos. Nenhuma destas diferenças entre esses períodos mais recentes pode ser considerada significativa. Portanto, contínua atenção deve ser dada à incorporação de novos alelos no *pool* genético para continuar ampliando a base genética desta espécie.

De acordo com o dendrograma (Figura 2) e também visualizado nos gráficos em 3 dimensões (Figura 1a e 1b), a distribuição dos clones de fundação, sugere que estes constituem uma importante e direta fonte de variabilidade para uso no programa de melhoramento para o desenvolvimento de novas cultivares. Além disso é possível visualizar que nectarineiras e pêssigo chato encontram-se dispersos entre os grupos estruturados fundente e não-fundente, e muitos genótipos compartilham alelos de ambos os grupos, conseqüentemente não estão estruturados (Figura 1b).

3.4 Estrutura de População

Todos os 204 genótipos de *P. persica* foram avaliados quanto à estratificação da população. Os dados foram analisados sucessivamente aumentando o número de subpopulações (K) de 1 a 10. Neste estudo, o valor de K que melhor representou o conjunto de genótipos analisados, baseado na estatística do ΔK descrita por Evanno et al. (2005) foi quando K=2. Estes resultados sugerem que a população pode ser estratificada em dois subgrupos de acordo com características relacionadas ao fruto, relativas principalmente ao tipo de polpa apresentado, separando em genótipos de polpa fundente e não-fundente, respectivamente nas cores amarela e vermelha na figura 2c. A sumarização das 20 réplicas para K=2 apresentou uma similaridade de 99%, indicando que a atribuição de acessos para cada subpopulação foi bem correlacionada entre as corridas.

Um acesso foi considerado como pertencente a uma determinada população quando seu coeficiente de adesão foi \geq a 80%. Assim, 96 genótipos ficaram agrupados no subgrupo fundente, incluindo pessegueiro com a finalidade de consumo *in natura*, nectarineiras de polpa fundente e pessegueiro com fruto chato. Três dos clones de fundação também ficaram agrupados neste subgrupo:

'Delicioso', 'Intermediário' e 'Sunhigh'. O subgrupo não-fundente é composto por 66 genótipos, agrupando pessegueiros com finalidade para conserva e nectarineiras de polpa não-fundente, também se incluem neste grupo quatro dos clones de fundação: 'Abóbora', 'Aldrighi', 'Babycock' e 'Cristal-Taquari'. A estratificação dos genótipos considerados estruturados dentro de cada subgrupo (fundente e não-fundente) podem ser visualizados na figura 2b, respectivamente nas cores laranja e amarelo.

Do total de genótipos analisados, 42 foram considerados não-estruturados, denominados 'mistos' pois compartilham alelos de ambos os grupos. As cultivares indicadas como dupla finalidade (consumo *in natura* e conserva), 'Eldorado', 'Leonense', 'Maciel' e 'Riograndense' estão incluídas nesta população, assim como genótipos que possuem alguma destas cultivares como progenitores, genótipos que apresentam na genealogia cruzamentos entre fundentes x não-fundentes e 10 das 33 nectarineiras analisadas neste estudo, também os clones de fundação 'Edmundo Perret' e 'Panamint', utilizado no desenvolvimento de cultivares para indústria e a nectarineira utilizada para seleção de genótipos com ausência de pilosidade na película da fruta, respectivamente. Os genótipos não estruturados podem ser visualizados na figura 1 (coloração rosa) e na figura 2b (coloração púrpura).

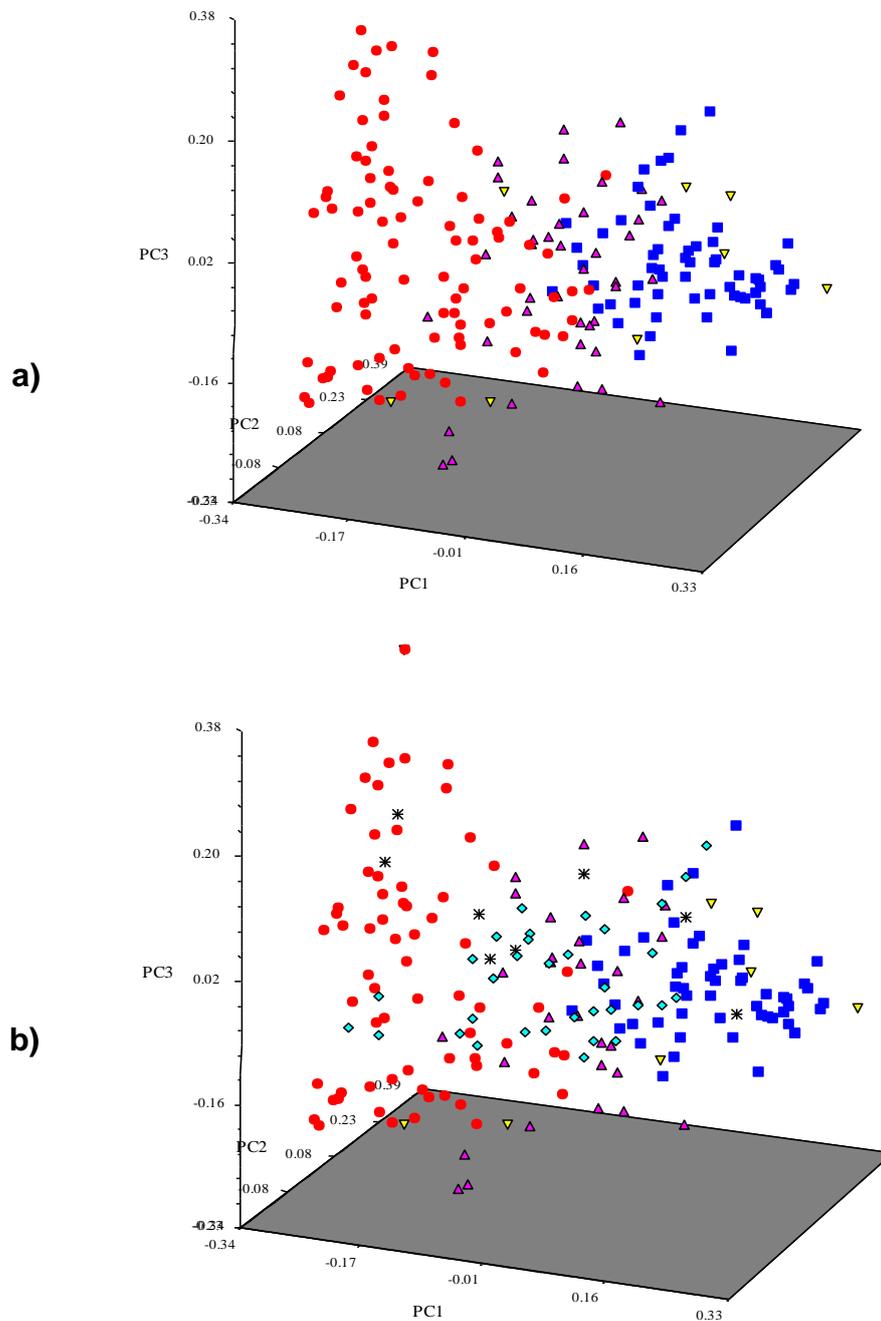


Figura 1. Dispersão tridimensional dos 204 genótipos que compõem o painel associativo de pessegueiro, baseada na análise de coordenadas principais (PCoA). A primeira coordenada principal explica 17,62% da variação total obtida enquanto a segunda 10,24% e a terceira 7,52%. Os grupos formados são representados por diferentes colorações: (●) pêssego fundente; (■) pêssego não-fundente; (▲) grupo não estruturado (mistura); (▼) clone de fundação; (◆) nectarinas; (*) pêssego chato.

a) Identificação dos subgrupos formados pelo STRUCTURE e dispersão dos clones de fundação.
 b) Análise anterior, com dispersão das nectarinas e pêssego chato baseado em dados morfológicos.

Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2013.

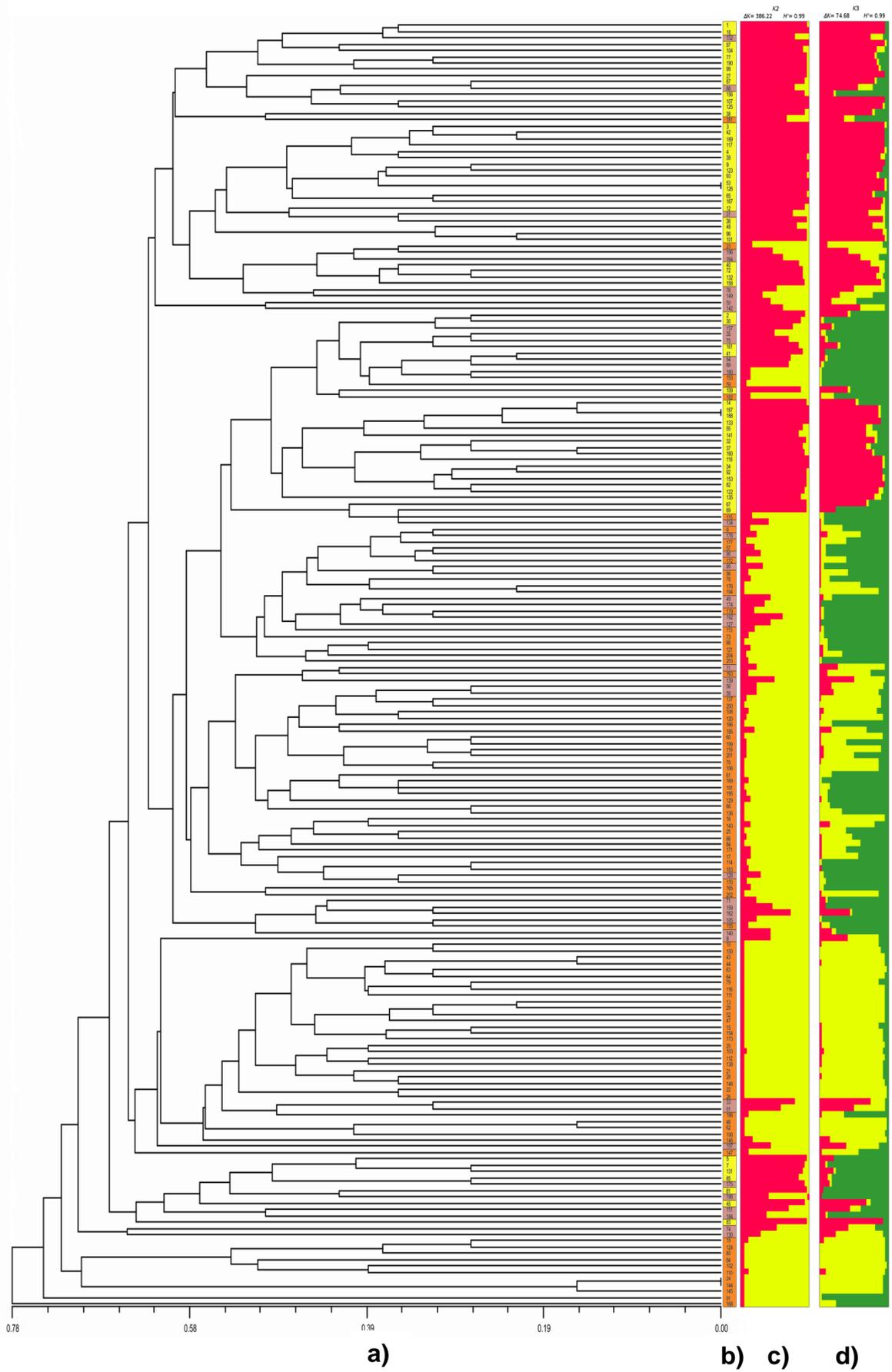


Figura 2. Variabilidade genética e estrutura populacional de 204 genótipos de *P. persica* com base em 10 *loci* SSR. a) Dendrograma obtido através da análise de agrupamento UPGMA com base na matriz de distância genética obtida pela Distância de Rogers modificada. A identificação dos genótipos ocorre conforme descrito na tabela 1. b) Estratificação da população: acessos identificados como amarelo= não- fundentes, em laranja= fundentes e púrpura= intermediários (não estruturados). c) Estratificação da população para valores de $k = 2$. d) $K = 3$. Cada cor representa uma diferente subpopulação, em vermelho (genótipos de polpa não-fundente), amarelo (genótipos de polpa fundente) e verde (subpopulação com introduções diversas e grande parte das nectarineiras).

Posteriormente, quando $K=3$ foi possível notar que o conjunto de genótipos de polpa fundente se dividiu em duas subpopulações agrupando principalmente pessegueiro de polpa fundente e outra agrupando nectarineiras que, mesmo com a diferenciação molecular entre as variedades baseada em uma única mutação genética, em grande parte podem ser distinguidas dos subgrupos de pessegueiro de polpa fundente e não-fundente, sendo que 20 das 33 nectarineiras analisadas estão agrupadas neste subgrupo bastante diverso, que engloba também introduções dos Estados Unidos, Japão, México e Bolívia enquanto que o grupo de genótipos de polpa não-fundente permaneceu praticamente invariável, excluindo deste apenas as nectarineiras de polpa não-fundente, porém, quando $K=3$, a proporção de mistura também foi maior.

Estudos similares em germoplasma de pessegueiro da Espanha relataram duas populações estruturadas, representando cultivares locais da Espanha e cultivares modernas de programas de melhoramento internacionais (FORCADA et al., 2013).

Do mesmo modo, Aranzana et al. (2010) relataram três subpopulações com forte estruturação, incluindo 94 genótipos de pessegueiro de polpa fundente, 39 de polpa não-fundente e 91 nectarineiras. Corroborando com os resultados encontrados no presente estudo, estes mesmos autores constataram que quando $K=2$ os genótipos foram divididos em polpa fundente e não-fundente e posteriormente quando $K=3$ o grupo fundente foi subdividido em pessegueiro de polpa fundente e nectarineiras. Porém para estes autores, o grupo mais diverso de acessos agrupados foi o não-fundente enquanto que na mesma situação, no painel associativo em estudo, o subgrupo onde agruparam a maior parte das nectarineiras foi o mais diverso com acessos de introduções de diferentes origens.

Analisando *landraces* de pessegueiro da China, proveniente de seis regiões geográficas, o maior valor de ΔK encontrado para os 104 acessos analisados foi observado quando $K=5$, estes resultados sugerem que estes acessos foram significativamente diferenciados em cinco subgrupos em função da região geográfica de origem, embora vários acessos apresentassem mistura, compartilhando alelos de mais de uma subpopulação (CAO et al., 2012).

Li et al. (2013) utilizando o software Structure em uma coleção com 658 acessos de pessegueiro, distinguiram três subpopulações de acordo com a localização geográfica e história de domesticação, separando em acessos de origem Oriental (234), Ocidental (174) e *landraces* chinesas e espanholas (61), enquanto 189 acessos foram considerados não estruturados de acordo com o coeficiente de adesão de 80%.

No presente estudo, grande parte dos genótipos oriundos de programas de melhoramento norte americanos ficaram estruturados no subgrupo de polpa fundente sugerindo um *pool* gênico comum. Estes resultados estão de acordo, considerando a troca ativa de germoplasma entre os programas de melhoramento destes dois países e o uso de cultivares americanas no programa de melhoramento de pessegueiro do sul do Brasil.

3.5 Distribuição da variabilidade genética

Pela análise da variância molecular (AMOVA) baseada no modelo de estrutura genética $K=2$, verificou-se que 85,02% da variabilidade genética está distribuída dentro das subpopulações, indicando que a grande maioria da variabilidade é devida a diferenças de indivíduos dentro de populações e apenas 14,98% decorrente da variação entre subpopulações (Tabela 7), confirmando a alta variabilidade encontrada no painel associativo em estudo. Estes resultados também são suportados pelas representações visuais da análise de coordenadas principais, onde é evidente que a variabilidade é maior dentro do subgrupo fundente.

Quando comparados 2x2, a maior variação foi encontrada entre os subgrupos fundente e não-fundente (Tabela 8). Já os subgrupos fundente e não-

fundente compartilham 45 alelos, sendo que o primeiro apresenta 33 alelos que não são encontrados no segundo subgrupo e não-fundente apresenta nove alelos ausentes no subgrupo fundente.

A menor distância observada entre o subgrupo misto quando comparado aos subgrupos fundente e não-fundente (Tabela 8) é justamente pelo primeiro subgrupo não estar estruturado e compartilhar alelos de ambos os subgrupos, podendo ser observado também esta menor distância genética ao analisar a genealogia destes subgrupos mencionados.

Tabela 7. Análise molecular da variância (AMOVA) baseada em 10 *loci* SSR para os 204 genótipos de *P. persica* avaliados quanto à estrutura genética em três subgrupos identificados pelo STRUCTURE sendo, Fundente, Não-fundente e Misto. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2013.

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes da variância	Porcentagem (%)
Entre grupos	2	173,89	1,24	14,98**
Entre acessos dentro de grupos	201	1.415,57	7,04	85,02**
Total	203	1.589,46	8,28	100,0

** Significante ao nível de probabilidade de 1%.

Tabela 8. Sumário da análise de comparação 2x2 entre os subgrupos identificados pelo STRUCTURE, obtida por AMOVA. A porcentagem da variação molecular total existente entre os subgrupos (f_{st}) é uma medida da distância genética entre os subgrupos (valores acima da diagonal). O teste de significância de cada valor de f_{st} foi calculado como a probabilidade de um valor f_{st} encontrado ser maior do que o valor observado (valores abaixo da diagonal). Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2013.

Subgrupo	Fundente	Não-fundente	Misto
Fundente	-	0.22	0.06
Não-fundente	**	-	0.07
Misto	*	**	-

** Significante ao nível de probabilidade de 1%.

4. Considerações Finais

Os resultados indicam que grande variabilidade genética encontra-se disponível para uso no melhoramento e desenvolvimento de cultivares de baixa e média necessidade de frio, adaptadas ao clima subtropical. O painel associativo representativo do germoplasma de pessegueiro disponível no Brasil está estruturado em duas subpopulações bem definidas agrupadas de acordo com o tipo de polpa, fundente e não-fundente com alguns acessos não estruturados apresentando mistura de ambos, sendo que maior variabilidade está disponível dentro do subgrupo fundente.

Este trabalho é um primeiro passo e uma referência para definir acessos para estudos de mapeamento associativo visando implementar a seleção assistida por marcadores no melhoramento genético e desenvolvimento de novas cultivares de *P. persica*.

Agradecimentos Este trabalho foi realizado com verbas provenientes do projeto “Melhoramento genético de pessegueiro, nectarineira e ameixeira para adaptação às condições brasileiras”, financiado pela Capes/ MTC/ CNPq – REPENSA.

5. Referências

ANDERSON, N. **Diversity of low chill peaches (*Prunus persica*) from Asia, Brazil, Europe, and the USA**. 2010. 82f. M.S. Thesis in Horticulture, Texas A&M University.

ARANZANA, M. J.; MAS, J. G.; ARÚS, P. Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. **Plant Breeding**, v. 121, p. 87-92, 2002.

ARANZANA, M. J.; CARBÓ, J.; ARÚS, P. Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 1341–1352, 2003.

ARANZANA, M. J.; ABBASSI, E.; HOWAD, W.; ARÚS, P. Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. **BMC Genetics**, v. 11, p. 69, 2010.

ARÚS, P.; VERDE, I.; SOSINSKI, B.; ZHEBENTYAYEVA, T.; ABBOTT, A. G. The peach genome. **Tree Genetics e Genomes**, v. 8, p. 531-547, 2012.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

BOUHADIDA, M.; MORENO, M. A.; GONZALO, M. J.; ALONSO, J. M.; GOGORCENA, Y. Genetic variability of introduced and local Spanish peach cultivars determined by SSR markers. **Tree Genetics e Genomes**, v. 7, p. 257-270, 2011.

BYRNE, D. H.; SHERMAN, W. B.; BACON, T. A. Stone fruit genetic pool and its exploitation for growing under warm winter conditions. In: EREZ, A. (Ed.). **Temperate Fruit Crops in Warm Climates**. Boston, Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 157-230.

BYRNE, David. Trends and progress of low-chill stone fruit breeding. In: GEORGE, A. P.; BOONPRABOB, U. (Eds.). **Production technologies for low-chill temperate fruits**. Canberra: ACIAR Technical Reports No. 61, 2005. p 5-12.

BYRNE, D. H.; RASEIRA, M. B. Inbreeding of the Major Commercial Fresh Market Peach Cultivars Grown in Southern Brazil. **Acta Horticulturae**, v. 713, p. 99-101, 2006.

BYRNE, D. H.; RASEIRA, M. B.; BASSI, D.; PIAGNANI, M. C.; GASIC, K.; REIGHARD, G. L.; MORENO, M. A.; PÉREZ, S. Peach. In: BADENES, M. L.; BYRNE, D. H. (Eds.). **Fruit Breeding: Handbook of Plant Breeding**. New York: Springer Science+Business Media, 2012. p. 505-569.

CAO, K.; WANG, L.; ZHU, G.; FANG, W.; CHEN, C.; LUO, J. Genetic diversity, linkage disequilibrium, and association mapping analyses of peach (*Prunus persica*) landraces in China. **Tree Genetics e Genomes**, v. 8, p. 975-990, 2012.

CIPRIANI, G.; LOT, G.; HUANG, W. G.; MATARAZZO, M. T.; PETERLUNGER, E. TESTOLIN, R. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p. 65-72, 1999.

CRUZ, C. D. **Programa GENES**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2006. 442p.

DIRLEWANGER, E.; COSSON, P.; TAVAUD, M.; ARANZANA, M. J.; POIZAT, C.; ZANETTO, A.; ARÚS, P.; LAIGRET, F. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, p. 127-138, 2002.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p.479-491, 1992.

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

FORCADA, C. F.; ORAGUZIE, N.; IGARTUA, E.; MORENO, M. A.; GOGORCENA, Y. Population structure and marker-trait associations for pomological traits in peach and nectarine cultivars. **Tree Genetics and Genomes**, v. 9, p. 331-349, 2013.

GANOPOULOS, I. V.; KAZANTZIS, K.; CHATZICHARISIS, I.; KARAYIANNIS, I.; TSAFTARIS, A. S. Genetic diversity, structure and fruit trait associations in Greek sweet cherry cultivars using microsatellite based (SSR/ISSR) and morpho-physiological markers. **Euphytica**, v. 181, p. 237–251, 2011.

GOODMAN, M. M.; STUBER, C. W. Races of maize: VI. Isozyme variation among races of maize in Bolívia. **Maydica**, Bergamo, v. 28 p. 169-187, 1983.

JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, v. 23, p. 1801-1806, 2007.

LI, X.; MENG, X.; JIA, H.; YU, M.; MA, R.; WANG, L.; CAO, K.; SHEN, Z.; NIU, L.; TIAN, J.; CHEN, M.; XIE, M.; ARÚS, P.; GAO, Z.; ARANZANA, M. J. Peach genetic resources: diversity, population structure and linkage disequilibrium. **BMC Genetics**, v. 14, p. 84, 2013.

LIU, K.; MUSE, S. V. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics**, v. 21, p. 2128-2129, 2005.

MARIETTE, S.; TAVAUND, M.; ARUNYAWAT, U.; CAPDEVILLE, G.; MILLAN, M. SALIN, F. Population structure and genetic bottleneck in sweet cherry estimated with SSRs and the gametophytic self-incompatibility locus. **BMC Genetics**, v. 11, p. 77, 2010.

MEDEIROS, C. A.; RASEIRA, M. do C. B. **A cultura do pessegueiro**. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1998. 352p.

MYLES, S.; PEIFFER, J.; BROWN, P. J.; ERSOZ, E. S.; ZHANG, Z. W.; COSTICH, D. E.; BUCKLER, E. S. Association mapping: critical considerations

shift from genotyping to experimental design. **Plant Cell**, v. 21, p. 2194–2202, 2009.

PRICHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

RASEIRA, M. do C. B.; CASTRO, C. M.; UENO, B. Intercâmbio e utilização de recursos genéticos de Prunóideas. In: MARIANTE, A.S; SAMPAIO, M.J.A.; INGLIS, M.C.V. (Org.). **Informe nacional sobre a situação dos recursos fitogenéticos para a alimentação e a agricultura do Brasil**. Brasília – DF, 2008. p. 54-56.

RASEIRA, M. do C. B.; NAKASU, B. H. Pessegueiro. In: BRUCKNER, C. H. (ed.) **Melhoramento de Fruteiras de Clima Temperado**. Viçosa: Editora UFV, 2002. p. 89-126.

ROHLF, F. J. **NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.2**. Setauket: Applied Biostatistics, 2005.

ROSENBERG, N. A. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 137-138, 2004.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v. 11, p. 33-40, 1962.

SOSINSKI, B.; GANNAVAPU, M.; HAGER, L. D.; BECK, L. E.; KING, G. J.; RYDER, C. D.; RAJAPAKSE, S.; BAIRD, W. V.; BALLARD, R. E.; ABBOUTT, A. G. Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, p. 421-428, 2000.

The International Peach Genome Initiative. The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. **Nature Genetics**, v. 45, p. 487-494, 2013.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**, vol. 4. Variability within and among natural populations. Chicago, University of Chicago, 1978.

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. B. J.; YE, Z. H.; MAO, J. X. **POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis**. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada Version 1.32, 1997.

YOON, J. H.; LIU, D. C.; SONG, W. S.; LIU, W. S.; ZHANG, A. M.; LI, S. H. Genetic diversity and ecogeographical phylogenetic relationships among peach and nectarine cultivars based on simple sequence repeat (SSR) markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 131, p. 513-521, 2006.

XIE, R. J.; LI, X. W.; CHAI, M. L.; SONG, L. J.; JIA, H. J.; WU, D. J.; CHEN, M. J.; CHEN, K. M.; ARANZANA, M. J.; GAO, Z. S. Evaluation of the genetic diversity of Asian peach accessions using a selected set of SSR markers. **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 622-629, 2010.

CONCLUSÕES

Grande variabilidade genética encontra-se disponível entre os acessos que compõem o painel associativo representativo do germoplasma de pessegueiro do Brasil.

O germoplasma avaliado é geneticamente estruturado em duas subpopulações de acordo com o tipo de polpa do fruto.

O germoplasma avaliado mostra-se adequado para estudos de mapeamento associativo desde que seja considerada a sua estrutura genética.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ARANZANA, M. J.; GARCIA-MAS, J.; CARBO, J.; ARÚS, P. Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. **Plant Breeding**, v. 121, n. 1, p. 87-92, 2002.
- ARANZANA, M. J.; ABBASSI, E.; HOWAD, W.; ARÚS, P. Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. **BMC Genetics**, v. 11, p. 69, 2010.
- BOUHADIDA, M.; MORENO, M. A.; GONZALO, M. J.; ALONSO, J. M.; GOGORCENA, Y. Genetic variability of introduced and local Spanish peach cultivars determined by SSR markers. **Tree Genetics e Genomes**, v. 7, p. 257-270, 2011.
- BYRNE, D. H. Isozyme variability in four diploid stone fruits compared with other Woody perennial plants. **Journal of Heredity**, v. 81, p. 68-71, 1990.
- BYRNE, D. H.; RASEIRA, M. B.; BASSI, D.; PIAGNANI, M. C.; GASIC, K.; REIGHARD, G. L.; MORENO, M. A.; PÉREZ, S. Peach. In: BADENES, M. L.; BYRNE, D. H. (Eds.). **Fruit Breeding: Handbook of Plant Breeding**. New York: Springer Science+Business Media, 2012. p. 505-569.
- CAO, K.; WANG, L.; ZHU, G.; FANG, W.; CHEN, C.; LUO, J. Genetic diversity, linkage disequilibrium, and association mapping analyses of peach (*Prunus persica*) landraces in China. **Tree Genetics e Genomes**, v. 8, p. 975-990, 2012.
- DIRLEWANGER, E.; COSSON, P.; TAVAUD, M.; ARANZANA, M. J.; POIZAT, C.; ZANETTO, A.; ARÚS, P.; LAIGRET, F. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, p. 127-138, 2002.
- FORCADA, C. F.; ORAGUZIE, N.; IGARTUA, E.; MORENO, M. A.; GOGORCENA, Y. Population structure and marker-trait associations for pomological traits in peach and nectarine cultivars. **Tree Genetics and Genomes**, v. 9, p. 331-349, 2013.
- GANOPOULOS, I. V.; KAZANTZIS, K.; CHATZICHARISIS, I.; KARAYIANNIS, I.; TSAFTARIS, A. S. Genetic diversity, structure and fruit trait associations in Greek sweet cherry cultivars using microsatellite based (SSR/ISSR) and morpho-physiological markers. **Euphytica**, v. 181, p. 237-251, 2011.

MARIETTE, S.; TAVAUND, M.; ARUNYAWAT, U.; CAPDEVILLE, G.; MILLAN, M. SALIN, F. Population structure and genetic bottleneck in sweet cherry estimated with SSRs and the gametophytic self-incompatibility locus. **BMC BMC Genetics**, v. 11, p. 77, 2010.

ODONG, T. L.; van HEERWAARDEN, J.; JANSEN, J.; van HINTUM, T. J. L.; van EEUWIJK, F. A. Determination of genetic structure of germplasm collections: are traditional hierarchical clustering methods appropriate for molecular marker data?. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 123, p. 195-205, 2011.

RASEIRA, M. do C. B.; CASTRO, C. M.; UENO, B. Intercâmbio e utilização de recursos genéticos de Prunóideas. In: MARIANTE, A. S; SAMPAIO, M. J. A.; INGLIS, M. C. V. (Org.). **Informe nacional sobre a situação dos recursos fitogenéticos para a alimentação e a agricultura do Brasil**. Brasília – DF, 2008. p. 54-56.

SANSAVINI, S.; GAMBERINI, A.; BASSI, D. Peach breeding, genetics and new cultivar trends. **Acta Horticulturae**, v. 713, p. 23-48, 2006.

SCORZA, R.; MEHLENBACHER, S. A.; LIGHTNER, G. W. Inbreeding and coancestry of freestone peach cultivars of the eastern United States and implications for peach germplasm improvement. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 110, p. 547-552, 1985.

WUNSCH, A.; CARRERA, M.; HORMAZA, J. I. Molecular characterization of local spanish peach *Prunus persica* (L.) batsch germplasm. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, p. 925-932, 2006.

YOON, J. H.; LIU, D. C.; SONG, W. S.; ZHANG, A. M.; LI, S. H. Genetic diversity and ecogeographical phylogenetic relationships among peach and nectarine cultivars based on simple sequence repeat (SSR) markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 131, p. 513-521, 2006.

XIE, R. J.; LI, X. W.; CHAI, M. L.; SONG, L. J.; JIA, H. J.; WU, D. J.; CHEN, M. K.; CHEN, K. M.; ARANZANA, M. J.; GAO, Z. S. Evaluation of the genetic diversity of Asian peach accessions using a selected set of SSR markers. **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 622-629, 2010.