

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Dissertação

**Diversidade, estrutura e relação genética de porta-enxertos de
Prunus avaliados pela análise de caracteres morfológicos e de *loci*
SSR**

Luis Willian Pacheco Arge

Pelotas, 2012

LUIS WILLIAN PACHECO ARGE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Valmor João Bianchi

Co-Orientadores:

Pesq. Dr. Newton Alex Mayer

Prof. Dr. José Antonio Peters

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz - CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

A686d

Arge, Luis Willian Pacheco

Diversidade, estrutura e relação genética de porta-enxertos de *Prunus* avaliados pela análise de caracteres morfológicos e de loci SSR / Luís Willian Pacheco Arge. – 107 f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2012. – Orientador Valmor João Bianchi ; co-orientador José Antonio Peters, Newton Alex Mayer.

1.*Prunus* spp. 2.Diversidade genética. 3.SSR.
4.Relção genética. 5.Estrutura genética.
6.Estrutura fenotípica. 7.Categorização de dados.
8. Abordagem hierárquica. I.Bianchi, Valmor João.
II.Peters, José Antônio. III.Mayer, Newton Alex.
IV.Título.

CDD: 634.25

Banca examinadora:

Prof. Dr. Valmor João Bianchi (Presidente)

Prof. Dr. Willian Silva Barros

Dr^a. Caroline Marques Castro

Dr. Sandro Bonow

Dedico

A minha amada mãe e
Aos familiares e amigos que acreditaram em mim

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, ao fato de dar-me força para alcançar meus objetivos nos momentos confortáveis e desconfortáveis de minha vida.

A minha amada mãe pela sua dedicação prestada a mim e a minhas irmãs.

A aqueles familiares que acreditaram em minha vitória, em especial ao meu pai e as minhas tias Cléia e Iracema, e ao meu tio Antônio.

Ao professor Dr. Valmor João Bianchi, pela orientação, ensinamentos, paciência, pela oportunidade de crescimento profissional, em uma área que considero incrível, que tem proporcionado grande amadurecimento pessoal ao longo destes dois anos.

Aos meus co-orientadores, prof. Dr. José Antonio Peters pela amizade e esclarecimentos de dúvidas, e o pesquisador Dr. Newton Alex Mayer pela paciência, esclarecimento de dúvidas e pela ajuda nas coletas de materiais vegetais sob as árduas tardes de sol no campo experimental.

Ao prof. Dr. Fabrizio Barbosa e a prof^a. Dr^a. Leticia Mascarenhas Barbosa pelos contatos realizados para o meu estágio curricular de graduação no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, onde despertou-me o interesse de ingressar e cursar uma pós-graduação, sendo este o laboratório onde realizei o curso de mestrado acadêmico.

A prof^a. Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga pela oportunidade do estágio curricular e extracurricular, sem a qual mais dificilmente seria a realização desta meta pessoal e profissional, sendo sempre acessível e estimuladora, e me ajudando na medida do seu possível.

As doutoras, Daiane Benemann e Leticia Carvalho Benitez, pela amizade, ajuda e apoio nos diferentes momentos desta minha trajetória, e por sempre acreditarem em minha vitória.

A Dr^a. Juliana Bandeira e a Dr^a. Marcia Ribeiro pela força motivacional.

Ao amigo Francisco Leidens pela sua amizade e ajuda.

Aos amigos Fernando Schwab e Gabriel Coimbra pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas e Caracterização molecular pelos vários momentos de risos.

Agradeço.

"Paciência e perseverança tem o efeito mágico
de fazer as dificuldades desaparecerem
e os obstáculos sumirem."

John Quincy Adams

RESUMO

ARGE, Luis Willian Pacheco. **Diversidade, estrutura e relação genética de porta-enxertos de *Prunus* avaliados pela análise de caracteres morfológicos e de *loci* SSR**. 2012. N° de pag. 107. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

Resumo: O presente trabalho objetivou avaliar a diversidade, estrutura e relação genética, por avaliação molecular, e fenotípica de uma coleção de 75 acessos de porta-enxertos de *Prunus* da EMBRAPA Clima Temperado. As análises fenotípicas foram conduzidas com a avaliação de 21 caracteres qualitativos e 26 quantitativos de diferentes órgãos das plantas, e as análises moleculares foram baseadas na avaliação de 17 *loci* SSR. Os dados dos caracteres quantitativos foram categorizados pelo método de agrupamento Scott & Knott e submetidos juntamente com os dados qualitativos às análises estatísticas de agrupamento (hierárquica pelo coeficiente de Jaccard) e de relação fenotípica. Os dados moleculares foram convertidos primeiramente para diferentes formatos e submetidos às diferentes análises estatísticas. O dendograma UPGMA obtido a partir da matriz de distância genética calculada pelo coeficiente Nei & Li, utilizando os dados dos *loci* SSR, não foi capaz de distinguir os acessos Tsukuba-1, Tsukuba-2 e Tsukuba-3, no entanto, os dados fenotípicos mostraram-se eficazes para distingui-los. Os dendograma de ambas as análises, juntamente com a abordagem Bayesiana, possibilitaram a identificação de três pools, com alta relação com os diferentes grupos que compõem a coleção. Verificou-se que análise de coordenadas principais, baseada em dados fenotípicos, mostrou-se mais eficaz para a detecção dos três pools detectados com as abordagens hierárquica e Bayesiana. Com os dados moleculares, a análise de coordenadas principais corroborou parcialmente com os resultados obtidos pelo dendograma e pela análise Bayesiana. Os acessos do grupo sul-brasileiro originários de coletas realizadas em pomares da região de Pelotas, os quais não possuem genealogia conhecida, apresentaram em grande parte baixa distância genética e fenotípica, abaixo de 0,49 por ambas as análises, em relação aos acessos Aldrighi e Capdeboscq. Estes acessos foram tradicionalmente usados no passado como porta-enxertos no estado do Rio Grande do Sul. Por ambas as análises, fenotípicas e moleculares, o grupo de acessos de outras espécies foi

proporcionalmente quem mais contribuiu para a diversidade genética e fenotípica, como já era esperado, pois são espécies distintas e com baixa similaridade de características. A caracterização genética por ambas as técnicas de análise mostrou-se efetiva para a elucidação da diversidade, estrutura e relação genética e fenotípica da coleção de porta-enxertos de *Prunus* avaliada.

Palavras-chave: *Prunus spp.*, SSR, diversidade, relação, estrutura fenotípica e genética, categorização de dados, abordagem hierárquica, abordagem Bayesiana.

ABSTRACT

ARGE, Luis Willian Pacheco. **Diversity, structure and genetic relationship of *Prunus* rootstocks evaluated by analysis of morphological characters and SSR *loci***. 2012. No pag. 107. Master's thesis – Graduate Program of Plant Physiology. Federal University of Pelotas, Pelotas- Brazil.

Abstract: This study aimed to assess the diversity, structure and the genetic relationship, evaluated by phenotypic and molecular of 75 *Prunus* rootstocks collection belonging to EMBRAPA Clima Temperado. The phenotypic analyzes were conducted by the evaluation of 21 qualitative and 26 quantitative traits of different plant organs and molecular analyzes were based on evaluation of 17 SSR *loci*. The data of quantitative traits were categorized by Scott & Knott method and submitted along with the qualitative data to statistical analysis (hierarchical by Jaccard coefficient) and clustering of phenotypic relationship. Molecular data were first converted to different formats and subjected to various statistical analyzes. The UPGMA dendrogram obtained by genetic distance matrix calculated by Li & Nei coefficient, using the data of SSR *loci* evaluated was not able to distinguish between Tsukuba-1, Tsukuba-2 and Tsukuba-3 accesses, however, showed phenotypic effective to distinguish them. The dendograms of both analyzes together with the results of Bayesian approaches allowed the identification of three pools with high relation with the different groups that make up the collection. It was found that principal coordinates analysis based on phenotypic data, proved most effective for the detection of three pools detected with the hierarchical and the Bayesian approach. With the molecular data, the principal coordinates analysis corroborated with results obtained by the dendrogram and the Bayesian approach. The access of group South Brazilian originating from samples collected in orchards in the region of Pelotas, which have no known pedigree, had largely down genetic and phenotypic distance, low 0.49 per both analyzes, with Aldrighi and Capdeboscq, and other known access. These accesses were traditionally used in the past as rootstocks in the state of Rio Grande do Sul. For both phenotypic and molecular analyzes, the group access of other species contributed more to genetic and phenotypic diversity, as expected, because are different species and with low similarity of features. Phenotypic and genetic characterization proved effective for elucidating the diversity,

structure and genetic, and phenotypic relationship of the rootstocks of *Prunus* collection.

Keywords: *Prunus* spp., SSR, diversity, relationship, genetic and phenotypic structure, data categorization, hierarchical approach, Bayesian approach.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	15
Referências bibliográficas.....	18
ARTIGO 1.....	20
Estimativa da diversidade fenotípica de uma coleção de porta-enxertos de <i>Prunus</i> pelo uso de dados categorizados.....	20
Introdução.....	24
Material e métodos.....	26
Material Vegetal.....	26
Descritores morfológicos.....	26
Análise de dados.....	26
Categorização de dados.....	26
Análise multivariada.....	27
Parâmetros de diversidade genética.....	27
Agrupamento dos acessos baseado em abordagem Bayesiana.....	27
Relação genética entre e dentro dos grupos de acessos.....	28
Resultados.....	28
Diversidade genética.....	28
Identificação dos acessos.....	29
Relação genética entre acessos e estrutura genética.....	29
Relação genética entre grupos.....	30
Discussão.....	31
Categorização de dados.....	31
Diversidade fenotípica.....	31
Relação entre acessos e estrutura fenotípica.....	31
Relação genética entre grupos.....	33
Conclusões.....	34
Agradecimentos.....	34
Referências bibliográficas.....	35

ARTIGO 2.....	54
Estimativa da diversidade, estrutura e relação genética de porta-enxertos de <i>Prunus</i> baseados na avaliação de <i>loci</i> SSR	54
Introdução.....	58
Material e métodos.....	60
Material vegetal.....	60
Extração de DNA	60
Amplificação de DNA	60
Análise dos dados	61
Análise de géis e conversão de dados.....	61
Parâmetros de diversidade genética	61
Agrupamento dos acessos.....	62
Agrupamento dos acessos baseado em abordagem Bayesiana	62
Relação genética dentro e entre os grupos.....	63
Resultados.....	63
Análise conjunta da diversidade genética	63
Variabilidade genética entre acessos coletados na região sul do Brasil	64
Variabilidade genética entre acessos introduzidos no Brasil	65
Diversidade genética entre acessos do grupo de outras espécies	66
Identificação de diferentes acessos.....	66
Relação genética entre acessos e estrutura genética.....	67
Relação genética entre grupos.....	68
Análise descritiva	68
Parâmetros de relação genética de Nei e análise de variância molecular	68
Discussão	69
Polimorfismo de <i>loci</i> SSR.....	69
Agrupamento e estrutura genética.....	71
Relação genética entre grupos de acessos	73
Análise descritiva	73
Parâmetros de relação genética de Nei e análise de variância molecular	74
Estratégias de conservação e diversidade genética da coleção de porta-enxertos de <i>Prunus</i>	75
Conclusões.....	75
Agradecimentos.....	76

Referências bibliográficas	77
CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
APÊNDICE	103

INTRODUÇÃO GERAL

A produção mundial de frutas no ano de 2010 foi de 609,36 milhões de mega-gramas (Mg). O Brasil foi o terceiro maior produtor, com produção estimada de 39,28 milhões de Mg, de acordo com dados da FAOSTAT [Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics (2012)].

O pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch] destaca-se como uma das frutíferas mais cultivadas no mundo, tanto em regiões de clima temperado, quanto em de clima subtropical. No ano de 2010 produziu-se mundialmente 20,27 milhões de Mg de pêssegos, sendo os principais produtores a China, Itália, Espanha e EUA, o Brasil ocupou a décima quarta posição no ranking (FAOSTAT, 2012).

De acordo com dados do IBGE [Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2012)] em 2010 a produção nacional de pêssegos foi de 220.739 Mg, colhidas em uma área de 20.194 hectares, com produtividade média de 13,036 Mg ha⁻¹. Neste contexto, o Rio Grande do Sul destaca-se como uma importante região produtora de pêssegos, pois em 2010 a área cultivada foi de 14.839 hectares com produção de 132.874 Mg, representando 60,19% da produção brasileira. Mesmo assim, a produção nacional de frutas de caroços, cujo principal representante é o pêssego, foi insuficiente para abastecer o mercado interno, havendo a necessidade de importação de frutos, o que acabou contribuindo negativamente para a balança comercial da cadeia produtiva de frutas de caroço no Brasil.

O Rio Grande do Sul, maior produtor nacional, apresentou produtividade média de apenas 8,9 Mg ha⁻¹ no ano de 2010. Essa produtividade quando comparada com a dos outros estados é considerada baixa, pois o estado de Minas Gerais em 2010 apresentou média de 22,118 Mg ha⁻¹ (IBGE, 2012), ou seja, 2,47 vezes maior que a produtividade média do RS.

A baixa produtividade dos pomares de prunáceas no estado do Rio Grande do Sul está relacionada ao predominante cultivo de frutas para a agroindústria, principalmente na metade sul do estado, a qual tem valor de mercado inferior às frutas de consumo *in natura*, que conseqüentemente afeta os investimentos em tecnologia de manejo e produção dos pomares. Além disso, há problemas de ordem climática e fitossanitária, que juntamente com o tipo de porta-enxerto utilizado nos pomares reduzem a produção dos pomares de frutas de caroços.

No Rio Grande do Sul, os porta-enxertos utilizados na produção de mudas são tradicionalmente obtidos a partir de caroços oriundos das agroindústrias, nos quais se enxertam borbulhas de cultivares copa (TOFANELLI et al., 2001). As mudas de pessegueiros obtidas por esse método não possuem garantia de qualidade genética e sanitária do porta-enxerto, o que influencia de forma negativa a produção de frutas de caroços (FACHINELLO, 2000; TOFANELLI et al., 2003). Assim, algumas características de interesse agrônomo podem ser perdidas devido à variabilidade genética existente nos porta-enxertos obtidos por sementes, como: a tolerância a estresses abióticos, resistência ao ataque de pragas e doenças, o que pode causar conseqüentemente na morte precoce das plantas no pomar (MAYER et al., 2009).

Neste contexto, o uso de porta-enxertos adaptados às condições ambientais do RS, resistentes ao ataque de pragas e doenças, e com controle de idoneidade genético-sanitária, se faz necessário para a superação destes problemas que afetam a baixa produtividade de frutas de caroço na região Sul do país. Porém, os programas nacionais de melhoramento genético de prunáceas estiveram voltados durante muitos anos para a obtenção de novas cultivares copa, deixando de lado os porta-enxertos (RASEIRA & NAKASU, 2002).

Nos últimos anos, esta perspectiva tem se modificado, pois órgãos como a UFPEL (Universidade Federal de Pelotas) e a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Clima Temperado tem dado maior importância às pesquisas voltadas para o melhoramento genético de porta-enxertos de *Prunus*, através de estudos intensificados sobre os principais fatores que afetam a baixa produtividade, buscando desta maneira gerar novas alternativas para a solução deste problema. Ambos os órgãos possuem uma coleção de germoplasma com diversos acessos introduzidos de outros países que possuem programas de melhoramento genético de porta-enxertos de *Prunus* avançados, com genótipos portadores de resistência a pragas e doenças, e tolerância a diferentes estresses abióticos, porém diversos desses genótipos foram selecionados para as condições climáticas daqueles países, justificando os estudos para identificação e seleção de genótipos adequados as condições brasileira.

A variabilidade genética inerente ao material proveniente da indústria, como relatada acima, não é considerada adequada para a produção de porta-enxertos, devido a desuniformidade nos pomares e a perda de características agrônomicas

das plantas. Essa variabilidade se deve a mistura varietal dos caroços, os quais são derivados de cultivares-copa de ciclo tardio, que apresentam grande heteroziguidade.

Muito embora a variabilidade não seja desejável sob o ponto de vista da propagação, quando se busca obter plantas homogêneas, por outro lado, a existência de variabilidade bem como da diversidade genética é de suma importância para programas de melhoramento genético vegetal, pois possibilita explorar o pool de genes para a obtenção de novas variedades com características agrônomicas desejáveis. Assim, de acordo com Neto (1995), a caracterização da variabilidade e da diversidade genética disponível ao melhorista faz-se necessária para a seleção de genitores com genes de interesse e, conseqüentemente, para incrementar a eficiência de programas de melhoramento genético.

Tradicionalmente a caracterização genética e a identificação de cultivares de *Prunus* têm sido baseada em caracteres morfológicos e fenológicos, pois este tipo de caracterização é indispensável nos programas de melhoramento, devido ser o primeiro e o principal aspecto a ser avaliado. Assim, esta caracterização não pode ser substituída por nenhum outro tipo de técnica, e os resultados das avaliações moleculares devem ser considerados como complementares (BARBIERI, 2003).

Frente ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a diversidade e a estrutura genética de uma coleção de porta-enxertos de *Prunus* pertencente a EMBRAPA Clima Temperado, bem como estimar a relação genética existente entre os acessos e os grupos de acessos que compõem a coleção, com o intuito de gerar resultados para uso em futuros trabalhos nas áreas de melhoramento genético e fisiologia vegetal.

Desta forma, o estudo conduzido está apresentado na forma de dois artigos científicos, sendo que o primeiro trata da análise de diversidade e estrutura fenotípica, e a elucidação da relação existente entre os acessos e entre os grupos que constituem a coleção; o segundo trata das mesmas análises, no entanto este é baseado na avaliação de *loci* SSR (Simple Sequence Repeat).

Referências bibliográficas

BARBIERI, R. L. Conservação e uso de recursos genéticos. Em Brandão de Freitas L (Ed.) **Genética e Evolução Vegetal**. 1ª ed. UFRGS. Porto Alegre, Brasil, p. 403-413, 2003.

FACHINELLO, J.C. **Problemáticas das mudas de plantas frutíferas de caroço**. In: **Simpósio internacional de frutas de caroço: pêssegos, nectarinas e ameixas**. Porto Alegre. Anais...,p. 25-40, 2000.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations Agricultural statistics. **Banco de dados**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 23 janeiro de 2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Banco de dados**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/>>. Acesso em 22 de janeiro de 2012.

MAYER, N.A.; UENO, B.; ANTUNES, L.E.C. **Seleção e clonagem de porta-enxertos tolerantes à morte-precoce do pessegueiro**. Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 2009, 16p. (Comunicado Técnico, 209).

NETO, J.F.B. **Application of molecular markers to genetic diversity and quantitative trait *loci* detection studies in oat and wheat**. Ithaca, NY: Cornell University, 1995. 87f. Thesis - Cornell University, Cornell, 1995.

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

TOFANELLI, M.B.D.; CHALFUN, N.N.J.; HOFFMANN, A.; CHALFUN JÚNIOR, A. Uso do ácido indolbutírico na propagação de cultivares copa de ameixeira através de estacas lenhosas. **Científica Rural**, Bagé, v.6, n.1, p.115-121, 2001.

TOFANELLI, M.B.D.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. Método de aplicação de ácido indolbutírico no enraizamento de estacas herbáceas de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 363-364, 2003.

ARTIGO 1

**Estimativa da diversidade fenotípica de uma coleção de porta-
enxertos de *Prunus* pelo uso de dados categorizados**

(Artigo a ser submetido à revista Tree Genetics & Genomes)

Estimativa da diversidade fenotípica de uma coleção de porta-enxertos de *Prunus* pelo uso de dados categorizados

Luis Willian Pacheco Arge · Daiane de Pinho Benemann · Willian Silva Barros · Newton Alex Mayer · José Antonio Peters · Valmor João Bianchi

L. W. P. Arge (✉) · D. de P. Benemann · J. A. Peters · V. J. Bianchi

Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, CEP 96010-900, Caixa-Postal: 354, Capão do Leão, RS, Brasil.

E-mail: lwillianpacheco@yahoo.com.br

W. S. Barros

Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Física e Matemática, Departamento de Matemática e Estatística, CEP 96010-900, Capão do Leão, RS, Brasil.

N. A. Mayer

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA Clima Temperado, BR 392, Km 78, CEP 96010-971, Caixa Postal: 403, Pelotas, RS, Brasil.

Resumo: A introdução da cultura do pessegueiro no Brasil ocorreu pelo atual Estado de São Paulo, por mudas provenientes da Ilha da Madeira, em 1532, por Martín Afonso de Souza. Porém, esta cultura adquiriu maior importância no Estado do Rio Grande do Sul (região sul do Brasil), que possui a maior área cultivada e a maior produção nacional. Entretanto, esta região possui baixa produtividade média por hectare, devido principalmente ao cultivo ser direcionado a agroindústria, e com isso há baixos investimentos nos pomares por parte dos agricultores. Além disso, outros fatores que limitam o aumento da produtividade é a utilização de porta-enxertos sem idoneidade genético-sanitária, suscetíveis a pragas e doenças, e baixa tolerância a estresses ambientais. O presente estudo focou a caracterização da diversidade morfológica de uma coleção de porta-enxertos de *Prunus* da EMBRAPA Clima Temperado. O objetivo foi elucidar a estrutura e a diversidade fenotípica, bem como a relação existente entre os acessos e entre os grupos de acessos que compõem a coleção de porta-enxertos, baseada na análise fenotípica. As análises fenotípicas foram conduzidas pela avaliação de 21 caracteres qualitativos e 26 quantitativos de diferentes órgãos das plantas. Os dados dos caracteres quantitativos foram categorizados

pelo método de agrupamento Scott & Knott, e submetidos juntamente com os dados qualitativos às análises de agrupamento, diversidade e relação fenotípica. O dendograma UPGMA obtido através da matriz de distância computada pelo coeficiente de Jaccard, não mostrou perfis idênticos, e esta análise de agrupamento juntamente com a abordagem Bayesiana do software STRUCTURE possibilitou a identificação de três grandes pools com alta relação com os diferentes grupos que compõem a coleção de porta-enxertos. Entretanto, a análise de coordenadas principais mostrou-se mais eficaz para a identificação dos três pools detectados com o dendograma e com a abordagem Bayesiana. Os acessos do grupo sul-brasileiro originários de coletas em pomares do Rio Grande do sul, não possuem genealogia conhecida, porém 33,3% apresentaram similaridade fenotípica mínima de 0,49 com os acessos Aldrighi e Capdeboscq, e máxima de 0,64 com Cons 594. Destes acessos conhecidos, os dois primeiros foram tradicionalmente usados no passado como porta-enxertos no estado do Rio Grande do Sul. As diferenças fenotípicas globais existentes entre os três grupos foi baixa (17,46%), com contribuição similar de ambos os grupos para a diversidade fenotípica. Entretanto, os grupos não são constituídos pelo mesmo número de acessos, e proporcionalmente o grupo de outras espécies foi o que mais contribuiu para a diversidade, como já era esperado, pois são espécies diferentes e com características bastante distintas. A metodologia de categorização de dados possibilitou realizar análises que tradicionalmente são restritas a dados genético-moleculares. As análises de diversidade, estrutura e relação possibilitaram elucidar eficientemente a diversidade fenotípica existente na coleção de porta-enxertos de *Prunus*.

Palavras-chave: *Prunus* spp. · diversidade fenotípica · relação fenotípica · estrutura fenotípica · categorização de dados · abordagem hierárquica · abordagem Bayesiana.

Abstract: The peach culture introduction in Brazil occurred by the current state of São Paulo, by seedlings from the island of Madeira, in 1532, by Martin Afonso de Souza. However, this crop has become more important in the state of Rio Grande do Sul (Southern Brazil), which has the largest cultivated area and hence increased domestic production. However, this region has low average productivity per hectare, mainly due to cultivation be directed to agroindustry, and thus there is low investment in orchards by farmers. In addition, other factors that limit productivity growth is the use of rootstocks without genetic health, pests susceptible and diseases, and low tolerance to environmental stresses. This study focused on the phenotypic characterization of a Embrapa Clima Temperado collection. The aim was to elucidate the structure and diversity, and relationships among the access and between groups of access comprising the collection, based on analysis of phenotypic. The phenotypic analyzes were conducted by evaluation of 21 qualitative and 26 quantitative traits of different plant organs. The data of quantitative traits were categorized by the Scott & Knott method, and submitted along with the qualitative data to cluster analysis, diversity and phenotypic relationship. The UPGMA dendrogram obtained by distance matrix computed by Jaccard coefficient, showed not identical profiles, and this cluster analysis with the Bayesian approach of STRUCTURE software allowed the identification of three large pools with high relation with the different groups that make up the collection. However, the principal coordinates analysis proved more effective for the identification of three pools detected with the dendrogram and the Bayesian approach. The access of group South Brazilian originating from collections in Rio Grande do Sul orchards, have not known pedigree, but 33.3% showed phenotypic similarity of 0.49 with the minimum access and Aldrighi and Capdeboscq, and the maximum of 0.64 in Cons 594. These known hits, the first two were traditionally used in the past as rootstocks in the Rio Grande do Sul state. Genetic differences overall between the three groups was low (17.46%), with similar contribution of both groups to phenotypic diversity. However, the groups are not formed by the same number of hits, and the proportion of other species group was the largest contributor to the diversity, as expected, they are different species and with very different characteristics. The categorization methodology enabled perform data analyzes that are traditionally restricted to molecular genetic data. Analyses of diversity, structure and relationship possibility efficiently elucidate the phenotypic diversity in collection.

Keywords: *Prunus* spp. · phenologic diversity · phenologic relationship · phenologic structure · data categorization · hierarchical approach · Bayesian approach.

Introdução

As prunáceas são amplamente cultivadas no mundo em regiões de climas subtropicais e temperados, sendo o pessegueiro a espécie mais importante. De acordo com dados da FAO (2012), em 2010 a produção mundial de pêssegos atingiu a marca de 20,27 milhões de megagramas (Mg), e os maiores produtores foram a China, Itália, Espanha e EUA, enquanto que o Brasil ocupou a décima quarta posição no ranking mundial.

Em 2010, a produção brasileira de pêssegos atingiu 220.739 Mg, colhidas em uma área de 20.194 hectares, com produtividade média de 13,036 Mg ha⁻¹ (IBGE, 2012). A região Sul do Brasil destaca-se como a maior produtora de frutas de caroços, e o estado do Rio Grande do Sul produziu neste mesmo ano o total de 132.874 Mg, representando 60,19% da produção brasileira em uma área cultivada de 14.839 hectares. Naquele ano, assim como em anos precedentes a 2010, a produção foi insuficiente para suprir a demanda do mercado interno, além da sazonalidade da produção brasileira, o que acabou contribuindo negativamente para a balança comercial deste segmento da fruticultura. Um dos principais motivos é a baixa produtividade do principal estado produtor, o RS, que apresentou 8,95 Mg ha⁻¹ de produtividade média, considerada como baixa, pois os estados de Minas Gerais e São Paulo apresentaram média acima de 20 Mg ha⁻¹ no mesmo ano (IBGE, 2012).

A baixa produtividade dos pomares de prunáceas no estado do Rio Grande do Sul está relacionada ao predominante cultivo de frutas para a agroindústria, principalmente na metade sul do estado, a qual tem valor de mercado inferior às frutas de consumo *in natura*, o que conseqüentemente afeta os investimentos em tecnologia de manejo e produção dos pomares. Além disso, há problemas de ordem climática, que juntamente com problemas fitossanitários e o tipo de porta-enxerto utilizado nos pomares do RS, contribuem para a baixa produtividade de frutas de caroço no estado.

O RS é o principal pólo de produção de frutas de caroço do Brasil, entretanto, os porta-enxertos utilizados são tradicionalmente obtidos a partir de sementes oriundas das agroindústrias conserveiras, das quais são produzidos os seedlings, e enxertado sobre estes borbulhas de cultivares-copa de interesse (Tofanelli et al., 2001). As mudas de pessegueiro obtidas por esse método não possuem garantia de qualidade genética e sanitária do porta-enxerto, ocasionando a perda de características agrônomicas desejáveis, as quais influenciam de forma negativa a produção (Fachinello, 2000; Tofanelli et al., 2003). Dentre estas características pode-se citar perdas na tolerância a estresses abióticos, resistência ao ataque de pragas e doenças, os quais podem conseqüentemente culminar na morte precoce das plantas no pomar (Mayer et al., 2009).

Assim, pesquisas sobre a resposta fisiológica e o melhoramento genético vegetal voltado aos principais pontos que limitam o aumento da produção de frutas de caroços são fundamentais para o desenvolvimento e seleção de genótipos que rompam esta barreira que impede o aumento da produção. Neste contexto, a caracterização e a identificação de cultivares e variedades de *Prunus* é de fundamental importância para estes estudos, pois possibilita conhecer a diversidade genética disponível, bem como a realização de estudos para identificar qual a melhor metodologia para a manutenção da diversidade disponível sem haver perdas genéticas. Dentre as metodologias de conservação pode-se citar a

conservação *ex situ*, *in situ* e *in vitro*. Neste contexto, a análise de caracteres morfológicos tem sido tradicionalmente empregada para a caracterização e identificação de genótipos de *Prunus*.

Nos últimos anos, a EMBRAPA Clima Temperado juntamente com a Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) tem buscado dar maior atenção ao melhoramento de porta-enxertos de *Prunus*, através da formação e reativação de coleções de germoplasma com o objetivo de introduzir, selecionar ou desenvolver genótipos capazes de superar alguns dos principais problemas da cultura de prunáceas no sul do Brasil, no que tange a qualidade dos porta-enxertos, como por exemplo: a identificação e seleção de genótipos resistentes ao ataque de nematóides das galhas (*Meloidogyne* spp.) (Paula et al., 2011); mais tolerantes a morte precoce do pessegueiro e ao estresse hídrico (Martinazzo et al., 2011), além da busca de genótipos que melhorem a produção e a qualidade dos frutos (Picolotto et al., 2009; Picolotto et al., 2010; Picolotto et al., 2012).

Como relatado acima, a variabilidade genética dos porta-enxertos em pomares comerciais é um fator negativo devido ao desconhecimento da identidade genética, desuniformidade das plantas, diversidade nas reações à estresses bióticos e abióticos e alterações da fisiologia de toda a planta. Por outro lado, a diversidade genética é de suma importância para a constituição dos bancos de germoplasma e uso no melhoramento genético de plantas, pois ambas são caracterizadas como fonte de genes de interesse agrônomo.

No contexto de bancos de germoplasma e coleções, a caracterização da variabilidade e da diversidade genética ou fenotípica dos acessos é de suma importância para a condução de cruzamentos controlados específicos. A tradicional metodologia de caracterização é a do uso de descritores morfológicos, pois este tipo de caracterização é indispensável às diferentes pesquisas a serem conduzidas posteriormente, sendo que o emprego de outras metodologias de caracterização, como as avaliações moleculares, são consideradas como complementares (Barbieri, 2003).

As análises estatísticas para a computação de diferentes parâmetros de diversidade e análises hierárquicas e não hierárquicas tem sido tradicionalmente mais abundantes para dados genético-moleculares, ou seja, qualitativos. Para dados genético-moleculares há uma grande disponibilidade de softwares que permitem avaliar diferentes parâmetros, como índices de diversidade, análise de particionamento de variância, estrutura de população, entre outros. Entretanto alguns autores tem empregado a metodologia de categorização de dados quantitativos, possibilitando computar parâmetros que são restritos para dados moleculares.

Frente ao exposto, o presente estudo objetivou caracterizar a diversidade e elucidar a estrutura fenotípica da coleção de porta-enxertos de *Prunus* da EMBRAPA Clima Temperado, e analisar a relação existente entre os grupos e entre os acessos dos grupos que compõem a coleção, por meio de diferentes abordagens estatísticas.

Material e métodos

Material Vegetal

O material vegetal avaliado no presente estudo foi proveniente da "Coleção Porta-enxerto de *Prunus*", mantida em área experimental (condições de campo- Apêndice 1) na Sede da Embrapa Clima Temperado (Figura 1 e Apêndice 1), sendo constituídos por 34 acessos representados por cultivares-copa e por genótipos coletados em propriedades rurais nos distritos de Pelotas e Morro Redondo, região sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil; 28 acessos de porta-enxertos introduzidos de outros países como EUA, França, Hungria, Itália, Japão e México; e 13 acessos de outras espécies do gênero *Prunus*. As avaliações foram realizadas para estimar a diversidade fenotípica dos acessos da coleção de porta-enxertos de *Prunus*. A lista dos genótipos avaliados neste estudo está descrita na tabela 1.

Descritores morfológicos

Foram analisados 47 caracteres fenotípicos, de acordo com os descritores morfológicos desenvolvidos pelo MAPA (MAPA, 2008), sendo 21 qualitativos e 26 quantitativos, relacionados à folha (Figura 1), flor (Figura 2) e fruto (Figura 3). O número de repetições para cada tipo de órgão variou de 10 a 20, avaliados em uma e/ou duas plantas, em função da disponibilidade do material na coleção. As mensurações foram realizadas com o auxílio de paquímetro digital para medir comprimentos, larguras e diâmetros; e balança analítica de precisão para massa fresca. Estas análises foram realizadas nos anos de 2010, 2011 e 2012. O conjunto de descritores morfológicos avaliado neste estudo está apresentado na tabela 2, e ilustrados nos apêndices 2a, 2b, 2c e 2d. Na figura 4 está demonstrado plantas em estádios de desenvolvimento vegetativo e florífero.

Análise de dados

Categorização de dados

Os dados obtidos pelas avaliações dos caracteres quantitativos foram submetidos à análise de variância e posteriormente a análise de agrupamento pelo método Scott & Knott (1974). Ambas as análises foram realizadas com o uso do software GENES Ver. 7.0 (Cruz, 2006). Os resultados obtidos pela análise de agrupamento foram convertidos para dados qualitativos e, subsequentemente, para diferentes formatos de arquivos, juntamente com os resultados das avaliações dos caracteres qualitativos. Após, as matrizes foram submetidas a diferentes análises em softwares destinados a dados genético-moleculares.

Análise multivariada

A matriz binária contendo os resultados dos caracteres qualitativos e quantitativos avaliados foi submetida à análise de distância genética pelo coeficiente Jaccard (Jaccard, 1908), posteriormente realizou-se a análise de agrupamento utilizando o método de médias aritméticas UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sneath & Sokal, 1973). Os resultados das análises de agrupamento foram visualizados na forma de dendograma. O coeficiente de correlação cofenética foi calculado com o teste de Mantel (Mantel, 1967) utilizando 1000 permutações para avaliar o grau de confiabilidade entre a matriz de similaridade e a distância geográfica no dendograma. As análises descritas acima foram conduzidas com o software NTSYS-PC Ver. 2.1 (Rohlf, 2000). Para avaliar a robustez do dendograma, a análise de bootstrap foi conduzida utilizando 1000 réplicas no software BOOD Ver. 3.03 (Coelho, 2000).

A análise Eigen foi conduzida para a obtenção das coordenadas principais (PCoA) da diversidade fenotípica da coleção de porta-enxertos em estudo. Os resultados desta análise foram representados em gráfico tridimensional. Ambas as análises de obtenção das coordenadas principais e a representação tridimensional foram computadas utilizando o software NTSYS-PC Ver. 2.1 (Rohlf, 2000).

Parâmetros de diversidade genética

Os parâmetros de diversidade genética computados foram número de formas alternativas e agrupamentos observados (N_a) e efetivos ($N_e = 1/H_e$) (Hartl and Clark, 1989), e índice de informação de Shannon ($D = - \sum p_i \ln p_i$) (Lewontin, 1972). Tais parâmetros foram calculados utilizando o software POPGENE Ver. 1.32 (Yeh et al., 1997).

O poder de discriminação (PD), o qual determina a habilidade de um marcador discriminar dois acessos aleatoriamente foi estimado para cada caractere de acordo com a fórmula $PD = 1 - \sum g_{ij}^2$, onde g_{ij} é a frequência do genótipo j para o caractere morfológico i , avaliando-se todas as variações para este caractere. Esta formula foi desenvolvida por Kloosterman et al. (1993) para a avaliação do poder discriminação de marcadores moleculares, e empregada no presente trabalho para estudo da diversidade fenotípica.

Agrupamento dos acessos baseado em abordagem Bayesiana

A estrutura fenotípica da coleção de acessos de porta-enxertos de *Prunus* foi elucidada com o emprego da abordagem Bayesiana de agrupamento do software STRUCTURE Ver. 2.3.1 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003) com a matriz binária, a qual também foi utilizada para a obtenção do

dendograma, coordenadas principais e para a análise dos parâmetros de diversidade fenotípica. Os agrupamentos foram detectados com o emprego de um modelo de combinação, que utiliza a correlação de frequências entre os agrupamentos (K), e com o modelo de ancestralidade Admixture Model. A partir deste modelo foram computadas 10 réplicas para valores de K de 1 a 12 analisados por um período de gravação de 20^4 seguido de 20^5 interações. O número correto de agrupamentos (K) foi identificado com o auxílio do software on line STRUCTURE HARVESTER Ver. 0.6.92 (Earl & Von Holdt, 2012), o qual emprega o método estatístico não paramétrico de ΔK descrito por Evanno et al. (2005), com os valores de K de 2 a 11. As réplicas das análises de agrupamento dos valores de K selecionados foram posteriormente sumarizadas pelo software CLUMPP Ver. 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg, 2007) como o algoritmo Greedy e Large K Greedy, utilizando 10^4 repetições em combinações aleatórias, objetivando identificar os valores comuns e combinar os resultados de agrupamentos das 10 réplicas. Os resultados das combinações juntamente com os valores comuns de agrupamentos foram representados de forma gráfica através do software DISTRUCT Ver. 1.1 (Rosenberg, 2004).

Relação genética entre e dentro dos grupos de acessos

A análise de particionamento da variância foi conduzida para verificar a relação genética existente entre os grupos e entre os acessos dentro de cada grupo da coleção de porta-enxertos. Esta análise foi computada com os dados da matriz binária das avaliações dos caracteres morfológicos utilizando a metodologia descrita por Excoffier et al. (1992) para dados moleculares. O teste de significância da análise de particionamento da variância foi conduzido com 1023 permutações calculadas com o software ARLEQUIN Ver. 3.1 (Excoffier, 2006).

Resultados

Diversidade genética

Neste estudo foram empregados 47 descritores fenotípicos compreendendo caracteres qualitativos e quantitativos, cujos resultados dos parâmetros de diversidade fenotípica estão sumarizados na tabela 3. Os 21 caracteres qualitativos avaliados geraram 62 formas alternativas variando de duas (coloração da folha em estágio maturo, pubescência foliar na face abaxial, coloração das flores, etc.) a cinco (coloração do fruto em estágio maturo), com média de 2,95. Os 26 caracteres quantitativos geraram 214 agrupamentos pelo método Scott & Knott (1974), com o número mínimo de agrupamentos de três para largura do limbo foliar e número de sépalas florais, a 16 para razão entre comprimento do pecíolo pelo comprimento do limbo foliar. O número de formas alternativas efetivas para os caracteres qualitativos variou de 1,08 para pubescência foliar na face abaxial a 2,47 para tipo de superfície do caroço, com média de 1,73 e total de efetivos de 36,28. Nos caracteres quantitativos o mínimo de

agrupamentos efetivos foi de 1,06 para número de sépalas foliares e o máximo de 7,87 no comprimento do limbo foliar, com média de 4,9 e total de efetivos de 127,4 agrupamentos.

O índice de informação de Shannon, o qual estima a riqueza e abundância da diversidade fenotípica por caractere avaliado variou de 0,17 (pubescência foliar) a 1,14 (formato do fruto) para os caracteres qualitativos. Nos caracteres quantitativos este índice variou de 0,15 (número de sépalas florais) a 2,22 (comprimento do limbo foliar).

O poder de discriminação dos caracteres qualitativos variou de 0,08 para pubescência da folha a 0,62 para formato de fruto. Para os caracteres quantitativos o poder de discriminação variou de 0,11 para número de pétalas das flores a 0,87 para o comprimento do limbo foliar.

Identificação dos acessos

Os resultados provenientes das avaliações dos caracteres qualitativos e quantitativos foram utilizados para discriminar os acessos da coleção de porta-enxertos de *Prunus*. A combinação dos resultados distinguiram os 75 acessos da coleção (Figura 5).

Relação genética entre acessos e estrutura genética

A elucidação da relação fenotípica entre os acessos de porta-enxertos de *Prunus* está demonstrada na forma de um dendograma (Figura 5), o qual foi obtido pelo algoritmo UPGMA, a partir da matriz de distância genética calculada pelo coeficiente de Jaccard pela avaliação de 47 caracteres fenotípicos qualitativos e quantitativos. O teste de Mantel foi empregado para verificar o grau de confiabilidade entre a matriz de distância e os dados de agrupamento, o que resultou no valor de 0,85, indicando uma ótima correlação. A partir da análise de agrupamento UPGMA foi possível constatar a alta taxa de diversidade fenotípica existente dentro da coleção de porta-enxertos, pois as distâncias variaram desde de 0,15 a 1,00.

A abordagem Bayesiana foi empregada neste estudo para auxiliar a identificação de pools fenotípicos juntamente com a análise de agrupamento hierárquico, ou seja, com o dendograma. O teste do K verdadeiro baseado na estatística delta (Δ) K descrita por Evanno et al. (2005) foi aplicado para identificar os melhores K s entre $K=4$ e $K=11$. O teste estatístico do K verdadeiro mostrou o $K=6$ e $K=9$ como os melhores K s entre 4 e 11. O agrupamento Bayesiano de $K=6$ apresentou valor de ΔK de 5,3 e o $K=9$ o valor de 6,20. Entretanto, o melhor valor de ΔK foi identificado com o agrupamento de $K=3$ com valor de 855,21. A sumarização das 10 réplicas de cada valor de K , realizada com o software CLUMPP foram computadas com diferentes algoritmos. Para o agrupamento de $K=3$ utilizou-se o algoritmo Greedy, e Large K Greedy para os agrupamentos de $K=6$ e $K=9$. Os diferentes algoritmos foram utilizados devido ao limite de recursos computacionais, pois as análises foram computadas primeiramente em uma estação de trabalho com processador Intel® Xeon®, não havendo problema para computar o conjunto de dados de $K=3$, e com limite de análises para os conjuntos de dados de $K=6$ e $K=9$. Os resultados das

sumarizações estão representados graficamente na Figura 5B com os respectivos valores de similaridade média de pares permutados para cada agrupamento K .

A abordagem Bayesiana com valor de $K=3$ possibilitou a discriminação de três pools fenotípicos, identificados na Figura 5B como: 'a' abrangendo 91,17% dos acessos sul-brasileiros e 28,57% de introduzidos; 'b' abrangendo 53,57% dos acessos introduzidos, 8,82% dos sul-brasileiros e 7,14% dos acessos de outras espécies de *Prunus*, e o "c" abrangeu 14,28% dos introduzidos e 92,86% dos acessos de outras espécies. O agrupamento de $K=5$ juntamente com $K=9$ possibilitaram a identificação de nove subagrupamentos. Os resultados obtidos pela abordagem Bayesiana foram em grande parte suportados pelos resultados da abordagem hierárquica de agrupamento.

A análise de coordenadas principais (PCoA) possibilitou representar e verificar o grau de diversidade fenotípica em três dimensões. Além disso, possibilitou a identificação de três grupos os quais estão representados graficamente na figura 6, com os autovalores dos vetores sumarizados na tabela 4. A PCoA apresentou autovalores de: PCo1= 31,51%, PCo2= 4,72% e PCo3= 4,03%. O somatório das coordenadas principais representam 40,26%, sendo o PCo1 o componente que mais representa a diversidade fenotípica da coleção de porta-enxertos de *Prunus*.

Relação genética entre grupos

A análise de particionamento da variância da diversidade fenotípica entre os grupos de porta-enxertos de *Prunus* mostrou-se como moderada, com índice de F_{ST} de 0,17. A maior variação dos caracteres fenotípicos foi detectada dentro dos grupos (82,54%), sendo que a variação detectada entre os grupos foi de apenas 17,46%. Os resultados do particionamento da variância fenotípica estão descritos de forma mais detalhada na tabela 5. A contribuição de cada grupo para a diversidade da coleção de porta-enxertos variou muito pouco entre os grupos. O grupo de acessos de porta-enxertos sul-brasileiros contribuiu com 35% da diversidade, com índice de F_{ST} de 0,18. O grupo de acessos de porta-enxertos introduzidos contribuiu com 34% da diversidade com índice de F_{ST} de 0,17; e o grupo de acessos de outras espécies contribuiu com 31% e índice de F_{ST} de 0,16. A partir dos índices F_{ST} de cada grupo de acessos de porta-enxertos de *Prunus* foi calculado o F_{ST} médio por acessos para verificar a contribuição média dos acessos de cada grupo para a diversidade da coleção. Levando em consideração o número de acessos dentro de cada grupo, verificou-se que o grupo de porta-enxertos de outras espécies, com base na média de F_{ST} , foi o que mais contribuiu para a diversidade, seguidos pelos acessos do grupo de porta-enxertos introduzidos e pelos de sul-brasileiros.

Discussão

Categorização de dados

Neste estudo optou-se por uma metodologia alternativa para a computação de diferentes parâmetros fenotípicos, pois as análises de diversidade e relação genética são mais abundantes para dados genético-moleculares, sendo restrito para dados provenientes de avaliações fenotípicas quantitativas. A categorização de dados quantitativos possibilita sua conversão para qualitativos para subsequentemente serem analisados em diferentes softwares desenvolvidos para análise de dados genético-moleculares. O método estatístico de máxima verossimilhança Scott & Knott (1974) foi empregado neste estudo devido aos seus resultados serem expressos de forma única, ao contrário dos métodos clássicos que utilizam comparação de médias distinguindo-os por vários caracteres, a exemplo destes são os testes de Tukey (1960) e Duncan (1955). Esta metodologia foi eficaz para a computação de diferentes parâmetros fenotípicos. Neste contexto, Jaradat et al. (2004) empregaram metodologia alternativa através da categorização de dados quantitativos para a computação de diversos parâmetros fenotípicos em software destinados a computação de dados genético-moleculares, os quais possibilitaram elucidar a diversidade fenotípica.

Diversidade fenotípica

Os resultados de diversidade fenotípica obtidos neste estudo foram através da categorização dos dados fenotípicos. Diversos autores (Kadkhodaei et al., 2011; Khadivi-Khub et al., 2011; Fresnedo-Ramírez et al., 2011) tem caracterizado a diversidade genética de genótipos de *Prunus* por abordagens hierárquicas. Neste contexto, a categorização de dados fenotípicos para elucidação da diversidade mostrou-se como uma eficiente técnica neste estudo.

Relação entre acessos e estrutura fenotípica

A abordagem Bayesiana tem sido tradicionalmente empregada para a análise de estrutura genética de populações com dados moleculares dominantes e co-dominantes, tendo suas primeiras aplicações em espécies vegetais (Thomsberry et al. 2001; Harter et al., 2004), animais (Rosenberg et al., 2001; Fonseca et al., 2004), bacterianas (Falush et al., 2003) e na espécie humana (Rosenberg et al., 2002). Em espécies do gênero *Prunus* esta abordagem também foi empregada para inferir agrupamentos e para se elucidar a estrutura genética de populações (Martín et al., 2011; Aranzana et al., 2010; Bourguiba et al., 2010). A metodologia de categorização dos dados obtidos pela avaliação dos caracteres quantitativos foi eficiente para a verificação da estrutura fenotípica da coleção de porta-enxertos de

Prunus pela abordagem Bayesiana e para a elucidação da relação entre os acessos pela abordagem hierárquica.

A abordagem Bayesiana corrobora em grande parte com os agrupamentos gerados pelo dendograma UPGMA. Na figura 5, o distanciamento observado no dendograma do subagrupamento 'b1' do grande grupo 'b' é devido ao baixo valor de bootstrap observado no dendograma, ou seja, 2,16, justificando assim a categorização do subagrupamento 'b1' dentro do grupo 'b'. Desta maneira, a abordagem Bayesiana foi complementar a abordagem hierárquica de agrupamento, as quais possibilitaram a detecção de três pools fenotípicos, 'a', 'b' e 'c'.

O pool fenotípico 'a', o qual abrangeu 100% dos acessos de porta-enxertos provenientes de coletas em diferentes produtores rurais e a grande maioria dos acessos utilizados como cultivares-copa no sul do Brasil. Os acessos provenientes de coletas não possuem genealogia comprovada. A falta de identidade genética destes acessos de *Prunus* é devido à forma com que as mudas de pessegueiro são obtidas. A forma de obtenção tradicional das mudas de pessegueiro pelos agricultores e viveiristas da região sul é através enxertia de borbulhas, de cultivar-copa específica, sobre porta-enxertos obtidos de caroços provenientes de agroindústrias locais, onde ocorre mistura varietal e, conseqüentemente, os seedlings não possuem garantia de correspondência genética (Tofanelli et al., 2001). Os genótipos Aldrighi e Capdeboscq foram por muitos anos, as principais cultivares utilizadas para obtenção de porta-enxertos. No entanto, atualmente, a grande maioria destes porta-enxertos de origem agroindustrial tem em sua genealogia diversas cultivares-copa de ciclo tardio, originadas de cruzamentos complexos, cujos seedlings apresentam grande variabilidade genética (Bianchi et al., 2004). Esta relação genealógica foi suportada neste estudo pela abordagem Bayesiana e hierárquica (dendograma) para os diferentes acessos coletados em produtores rurais e para as cultivares copas de pessegueiros.

No grupo sul brasileiro com genealogia desconhecida, apenas 33,3% dos acessos apresentaram relação fenotípica com acessos conhecidos, ou seja, distância fenotípica mínima de 0,49 com Capdeboscq e Aldrighi, e máxima de 0,67 com acesso Cons 594. Resultado este que foi similar ao encontrado pela avaliação de *loci* SSR (Simple Sequence Repeat) (Artigo 2 da dissertação). A coleção de acessos avaliada é constituída por dois acessos de Aldrighi, sendo que estes acessos não se agruparam lado-a-lado com alta similaridade fenotípica, fato este que é justificado pela existência de inúmeras variedades deste genótipo na região sul do Brasil (comunicação pessoal, Newton Alex Mayer). Os genótipos Aldrighi e Capdeboscq são provenientes de seleção e melhoramento genético, respectivamente. O genótipo Aldrighi é uma seleção realizada por um persicultor de sobrenome Aldrighi na década de 1940, no município de Pelotas, a qual é provavelmente originária de pêssegos provenientes da Argentina (Raseira et al., 2008). Aldrighi e Capdeboscq foram amplamente utilizados no passado como porta-enxertos, devido a boa adaptação as condições edafoclimáticas do estado do Rio Grande do Sul. Atualmente o uso destes dois genótipos se restringe a pequenos agricultores que possuem estas plantas em seus quintais.

No pool fenotípico 'b', o qual é constituído em grande parte por acessos de porta-enxertos introduzidos, houve a formação de um subgrupo que abrange os acessos de folhas vermelhas. Os acessos Tsukuba-1, Tsukuba-2 e Tsukuba-3, mostraram-se idênticos pela análise molecular de *loci* SSR (Artigo 2 da dissertação), porém baseado na análise fenotípica detectou-se dissimilaridade entre estes acessos. O acesso Tsukuba-1 mostrou-se como o mais dissimilar entre os demais Tsukubas. A maior relação

fenotípica observada de Flordaguard, em vez de Tsukuba-1, com os acessos Tsukuba-2, 3 e 2 CPACT, deve-se aos caracteres quantitativos avaliados, principalmente aos relacionados com a massa de fruto. Pela avaliação dos caracteres qualitativos, não foi possível discriminar os acessos Tsukubas, os quais embora não se conheça a verdadeira origem, provavelmente sejam originários de uma mesma população. O acesso GxN9 é um genótipo obtido pelo cruzamento entre Garfi e Nemared (genealogia na Tabela 1), porém neste estudo GxN9 e Nemared se apresentaram com baixa relação fenotípica, apesar de agruparem-se lado-a-lado. GxN9 apresentou maior relação com o acesso GF-677, devendo essa relação ao fato de GF677 ter em sua genealogia uma cultivar de damasqueiro (genealogia na Tabela 1), da mesma forma que GxN9, ou seja, tem como ancestral comum o damasqueiro cv. Garfi.

Na análise molecular baseada em *loci* SSR (Artigo 2 da dissertação), Nemared e GxN9 agruparam-se lado-a-lado com distância genética de 0,56. Desta forma, os resultados obtidos pela avaliação fenotípicas não corroboram com os resultados obtidos pela análise molecular. Os acessos iniciados pela letra 'I', embora não possuem genealogia conhecida, tratam-se de acessos introduzidos de outros países, apresentando maior relação genética com os acessos sul-brasileiros, por se tratarem de genótipos de *Prunus persica*.

O pool fenotípico 'c' é constituído em grande parte pelos acessos de outras espécies, com exceção do acesso *Prunus kansuensis*, o qual tem sido caracterizado como um pessegueiro selvagem por alguns autores (Cao et al., 2011a; Cao et al., 2011b). Verificou-se neste estudo que este acesso foi fenotipicamente similar aos acessos do grupo sul-brasileiro e ao do grupo de introduzidos, apresentando menor similaridade com o grupo de acessos de outras espécies. Este acesso mostrou-se altamente similar ao grupo sul-brasileiro e ao grupo introduzido pela avaliação de *loci* SSR (Artigo 2 da dissertação). A alta relação fenotípica observada entre os acessos introduzidos do grupo 'c' com os de outras espécies se deve ao fato de muitos dos porta-enxertos introduzidos também não produzirem frutos, não sendo possível avaliar os caracteres intrínsecos a este órgão. A não produção de frutos pelos acessos deste grupo, em parte se deve aos acessos apresentarem alta exigência em horas de frio, não apresentando boa brotação e diferenciação de gemas floríferas, além disso, alguns não são capazes de produzirem frutos por serem completamente estéreis. A esterilidade pode estar relacionada a alguns dos acessos serem híbridos interespecíficos.

Os resultados obtidos pela análise de coordenadas principais (PCoA) pelas três primeiras dimensões embora sejam inferiores a 60% (40,26%), esta análise foi mais eficiente para a identificação dos mesmos três pools fenotípicos detectados através do dendograma e da abordagem Bayesiana. A explicação de 60% da diversidade fenotípica da coleção de porta-enxerto de *Prunus* somente ocorre com a sumarização das 13 primeiras coordenadas principais.

Relação genética entre grupos

A análise de particionamento da variância teve como finalidade verificar a relação fenotípica existente entre os grupos de acessos de porta-enxertos de *Prunus* da coleção. A diferença existente entre os grupos foi baixa (17%), resultado este que é justificado ao fato de haver uma alta porcentagem de

fenótipos similares existente entre os grupos, como pode ser observado pela análise de agrupamento hierárquico no dendograma e pela abordagem Bayesiana.

Apesar do grupo sul-brasileiro abranger maior número de acessos, este não foi o grupo que mais contribuiu para a diversidade fenotípica da coleção de porta-enxertos de *Prunus*, pois este é o grupo que possui maior homogeneidade de características fenotípicas entre os acessos. Proporcionalmente, o grupo de acessos de outras espécies foi o de maior contribuição para a diversidade, como já era esperado, pois a maior diversidade de características ocorre entre espécies. Esta relação também foi observada na análise molecular de *loci* SSR (Artigo 2 dissertação).

A caracterização genética com base na avaliação de caracteres morfológicos, ou a caracterização fenotípica é de suma importância aos programas de melhoramento genético vegetal, pois possibilita a identificação de genótipos que são mais aptos para uso em cruzamentos controlados, ou seja, férteis, com características de interesse agrônomo, como a adaptabilidade a condições edafoclimáticas e resistência a pragas e doenças. Sendo que as avaliações moleculares devem ser consideradas como complementares a esta. Este artigo faz parte de uma sequência de três artigos, nos quais o objetivo principal é elucidar a relação genética existente entre os acessos. O artigo subsequente trata da caracterização genética desta mesma coleção com base na avaliação de *loci* SSR, e o terceiro tratará da sumarização dos resultados dos dois primeiros artigos, o qual possibilitará selecionar com maior precisão, acessos com características de interesse agrônomo para cruzamentos posteriores.

Conclusões

O método de categorização dos dados de caracteres quantitativos possibilitou, juntamente com os dados qualitativos, a realização de uma única análise de agrupamento, o emprego destes mesmos dados para diferentes análises de diversidade, particionamento da variância, e para elucidar a estrutura fenotípica da coleção de porta-enxertos de *Prunus* da EMBRAPA Clima Temperado.

A avaliação dos acessos possibilitou constatar que existe uma alta diversidade fenotípica nesta coleção, com alta fidelidade (>89%) aos diferentes grupos que constituem a coleção. Os acessos coletas, os quais não possuem genealogia conhecida, apresentaram alta relação fenotípica (distância inferior a 0,43) com os acessos Cons-594, Turquesa, Deguia, Bolinha, Aldrighi e Capdeboscq, através da abordagem hierárquica e Bayesiana. A análise de particionamento da variância detectou maior variância dentro dos diferentes grupos. Os resultados deste estudo, auxiliarão futuros trabalhos na área de fisiologia vegetal e melhoramento genético de plantas, com o intuito de selecionar e melhorar genótipos para serem utilizados como porta-enxertos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Genômica e Fitomelhoramento da UFPEL por ceder uso aos seus computadores para as análises do software CLUMPP. Este trabalho foi realizado com verbas

provenientes do Macroprograma 2, processo 02.08.06.003.00.00 da EMBRAPA, projeto Universal CNPq edital 2010/ proc. 482386-2010-0, FAPERGS - Pq. Proc. 1012710 e a CAPES pela concessão da bolsa mestrado.

Referências bibliográficas

Aranzana, MJ; Abbassi, El-Kadri; Howad, W; Arús, P. 2010. Genetic variation, population Structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. *BMC Genetics* 11:69.

Barbieri, RL. 2003. Conservação e uso de recursos genéticos. Em Brandão de Freitas L (Ed.) *Genética e Evolução Vegetal*. 1ª ed. UFRGS. Porto Alegre, Brasil, p. 403-413.

Bernhard, R; Grasselly, C. 1981. Les pêchers x amandiers. *L'Arboriculture Fruitière* 328: 37-42.

Bianchi, VJ; Fachinello, JC; Schuch, MW; Sansavini, S. 2004. Caracterização molecular de cultivares de pessegueiro e nectarineira com microssatélites. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 26, n. 3, p. 490-493.

Bourguiba, H; Khadari, B; Krichen, L; Trifi-Farah, N; Santoni, S; Audergon, Jean-Mare. 2010. Grafting versus seed propagated apricot populations: two main gene pools in Tunisia evidenced by SSR markers and model-based Bayesian clustering. *Genetica* 138: 1023-1032.

Cao, K; Wang, L; Zhu, G; Fang, W; Chen, C. 2011a. Isolation, characterization and phylogenetic analysis of resistance gene analogues in a wild species of peach (*Prunus kansuensis*). *Canadian Journal of Plant Science*, 91: 961-970.

Cao, K; Wang, L; Zhu, G; Fang, W; Chen, C; Zhao, P. 2011b. Construction of a Linkage Map and Identification of Resistance Gene Analog Markers for Root-knot Nematodes in Wild Peach, *Prunus kansuensis*. *Journal of the American society for Horticultural Science*, Vol. 136, n. 3, p. 190-197.

Coelho, ASG. 2000. BOOD: avaliação de dendogramas baseados em estimativas de distâncias/ similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Goiânia: UFG.

Cruz, CD. 2006. Programa Genes: Biometria. Editora UFV. Viçosa (MG), 382p.

De Salvador, FR; Liverani A; Fideghelli, C. 1991. La scelta dei portinnesti dele piantearboree da frutto: Pesco. *L'Informatore Agrario*, suplemento, 36: 43-50.

Duncan, D B. 1955. Multiple range and multiple *F* tests. *Biometrics* 11: 1-42.

Earl, DA; Von Holdt, BM. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.

Edin, M; Garcin, A. 1994. Un nouveau porte-greffe dupé cher Cadaman® Avimag. L'Arboriculture Fruitière 475: 20-23.

Evanno, G; Regnaut, S; Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology, 14:2611-2620.

Excoffier, L; Laval, G; Schneider, S. 2006. Arlequin version 3.01: an integrated software package for population genetics data analysis. Bern: University of Bern, zoological institute.

Excoffier, L; Smouse, PE; Quattro, JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 131:479-491.

Fachinello, JC. 2000. Problemáticas das mudas de plantas frutíferas de caroço. In: Simpósio internacional de frutas de caroço: pêssegos, nectarinas e ameixas. Porto Alegre. Anais....p. 25-40, 2000.

Falush, D; Wirth, T; Linz, B; Pritchard, JK; Stephens, M; et al. 2003 Traces of human migrations in Helicobacter pylori populations. Science, 299: 1582-1585.

Falush, D; Stephens, M; Pritchard JK. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked *loci* and correlated allele frequency. Genetics, 164: 1567-1587.

FAOSTAT, 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations Agricultural statistics. Banco de dados. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 23 janeiro de 2012.

Felipe, AJ; Gómez-Aparisi, J; Socias, R; et al. 1998. Breeding Almond X Peach Hybrid Rootstocks at Zaragoza. II International Symposium on Pistachios and Almonds, v. 1, 195-199.

Fonseca, DM; Keyghobadi, N; Malcolm, CA; Mehmet, C; Schaffner, F; Mogi, M; Fleischer, RC; Wilkerson, RC. 2004. Emerging vectors in the Culex pipiens complex. Science. 303:1535-8.

Fresnedo-Ramírez, J; Segura, S; Mutatall-Lúa, A. 2011. Morphovariability of capulín (*Prunus serotina* Ehrh.) in the central-western region of Mexico from a plant genetic resources perspective. Genetic Resources and Crop Evolution. 58: 481-495.

Harter, A V; Gardner, KA; Falush, D; Lentz, DL; Bye, RA; Rieseberg, LH. 2004. Origin of extant domesticated sunflowers in eastern North America. *Nature*. 430:201-5.

Hartl DL; Clark AG. 1989. *Principles of population genetics*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Banco de dados. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/>>. Acesso em 22 de janeiro de 2012.

Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, 44:223-270.

Jakobsson, M; Rosenberg, NA. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23: 1801-1806, 2007.

Jaradat, AA; Shahid, M; Al Maskri AY. 2004. Genetic Diversity in the Batini Barley Landrace from Oman: I. Spike and Seed Quantitative and Qualitative Traits. *Crop Science*. 44: 304-315.

Kadkhodaei, S; Shahnazari, M; Nekouei, MK; Ghasemi, M; Etmiani, H; Imani, A; Ariff, AB. 2011. *Australian Journal of Crop Science*. 5(1): 82-91.

Kloosterman, AD; Budowle, B; Daselaar, P. 1993. PCR-amplification and detection of the human DIS80 VNTR locus. Amplification conditions, population genetics and application in forensic analysis. *Intl. J. Legal. Med.* 105,257–264.

Khadivi-Khub, A; Zamani, Z; Fatahi, MR. 2011. Multivariate analysis of *Prunus* subgen. *Cerasus* germplasm in Iran using morphological variables. *Genetic Resources and Crop Evolution*. Published on line.

Layne, REC. 1987. Peach rootstocks. In: R. C. Rom & R. F. Carlson (Eds), *Rootstocks for Fruit Crops*, pp. 185-216, John Wiley & Sons, NY.

Lewontin, RC. 1972. The apportionment of human diversity. *Evol. Biol.* 6: 381-398.

Mantel, NA. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.*, Vol 27, p. 209-220.

Martín, C; Herrero, M; Hormaza, JL. 2011. Molecular characterization of apricot germplasm from an old stone collection. *PLoS ONE*, Vol. 6, ed. 8, e23979.

Martinazzo, EG; Perboni, AT; Farias, ME; Bianchi, VJ; Bacarin, MA. 2011. Photosynthetic activity in the rootstock of hybrid peach trees submitted to water restriction and flooding. *Brazilian Journal of Plant Physiology (Impresso)*, v. 23, p. 231-236.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2008. Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de pessegueiros e nectarineiras. <http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA>

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2008. Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de porta-enxertos de *Prunus L.* <http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA>

Mayer, NA; Ueno, B; Antunes, LEC. 2009. Seleção e clonagem de porta-enxertos tolerantes à morte precoce do pessegueiro. *Comunicado técnico*, 209: 1-13.

Nei, M; Li, WH. 1979. Mathematical-model for studying genetic-variation in terms of restriction endonucleases. *Proceeding of the National Academy of Science. USA* 76: 5269–5273.

Okie, WR. 1987. Plum rootstocks. In: R. C. Rom & R. F. Carlson (Eds), *Rootstocks for Fruit Crops*, pp. 321-360, John Wiley & Sons, NY.

Paula, LA de; Bianchi, VJ; Gomes, CB; Fachinello, JC. 2011. Reação de porta-enxertos de pessegueiro a *Meloidogyne incognita*. *Revista Brasileira de Fruticultura (Impresso)*, v. 33, p. 680-684.

Picolotto, L; Fachinello, JC; Bianchi, VJ; Manica-Berto, R; Pasa, MS; Schmitz, JD. 2010. Yield and fruit quality of peach scion by using rootstocks propagated by air layering and seed. *Scientia Agrícola (USP. Impresso)*, v. 67, p. 646-650.

Picolotto, L; Manica-Berto, R; Pasin, D; Pasa, MS; Schmitz, JD; Prezotto, ME; Betemps, D; Bianchi, VJ; Fachinello, JC. 2009. Características vegetativas, fenológicas e produtivas do pessegueiro cultivar Chimarrita enxertado em diferentes porta-enxertos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira (1977. Impressa)*, v. 44, p. 583-589.

Picolotto, L; Schmitz, JD; Pasa, MS; Bianchi, VJ; Fachinello, JC. 2012. Desenvolvimento vegetativo e produtivo da cultivar 'Maciel' em diferentes porta-enxertos. *Ciência Rural (UFSC. Impresso)*, v. 42, p. 1-6.

Pritchard, JK; Stephens, M; Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.

- Ramming, DW; Tanner, O. 1983. 'Nemared' peach rootstocks. Hort Science. 18: 376.
- Raseira, MCB; Nakasu, BH; Peters, JA. 1989. 'Piazito' - um mini pessegueiro ornamental. Horti Sul, Pelotas, vol1, No 1, p. 31-32.
- Raseira, MCB; Byrne, DH; Franzon, RC. 2008. Pessegueiro. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. Origem e evolução de plantas cultivadas. 1 ed. Brasília: EMBRAPA Clima Temperado, p. 679-705.
- Renaud, R; Bernhard, R; Grasselly, C; Dosba, F. 1988. Diploid plum x peach hybrid rootstocks for stone fruit trees. Hort Science 23:115-116.
- Rohlf, J. 2001. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. New York: Exeter. Software.
- Rosenberg, NA; Pritchard, JK; Weber, JL; Cann, HM; Kidd, KK; Zhivotovsky, LA; Feldman, MW. 2002. The genetic structure of human populations. Science, 298: 2381-2385.
- Rosenberg, NA; Burke, T; Elo, K; Feldman, MW; Freidlin, PJ; Groenen, MAM; Hillel, J; Mäki-Tanila, A; Tixier-Boichard, M; Vignal, A; Wimmers, K; Weigend, S. 2001. Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. Genetics. 159:699-713.
- Rosenberg, NA. 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. Molecular Ecology. Note, 4:137-138.
- Scott, AJ; Knott, M. 1974. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. Biometrics. 30: 507-512p.
- Sherman, WB; Lyrene, PM; Sharpe, RH. 1991. Flordaguard Peach Rootstocks. Hort Science, Vol. 26 (4): 427.
- Sneath, PHA; Sokal, RR. 1973. Numeric Taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W. H. Freeman, 573p.
- Thornsberry JM, Goodman MM, Doebley J, Kresovich S, Nielsen D, Buckler ES. 2001. Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. Nature Genetics. 28:286-9.
- Tofaneli, MBD; Chalfun, NNJ; Hoffmann, A; Chalfun Júnior, A. 2001. Uso do ácido indolbutírico na propagação de cultivares copa de ameixeira através de estacas lenhosas. Científica Rural, Bagé, v.6, n.1, p.115-121.

Tofanelli, MBD; Ono, EO; Rodrigues, JD. 2003. Método de aplicação de ácido indolbutírico no enraizamento de estacas herbáceas de pessegueiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 363-364.

Tukey, JW. 1960. A survey of sampling from contaminated distributions. In *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling* (I. Olkin et al., eds.) 448–485. Stanford Univ. Press.

Yeh, FC; Young, RC; Timothy, B; Boyle, TBJ; Ye ZH; et al. 1997. Popgene, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Mol Biol Biotech Center, University of Alberta, Canada.

Tabela 1. Acessos do banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus*, e suas respectivas espécies, origens e referências originais de desenvolvimento dos acessos.

Grupos	Espécie	Origem	Referência
Porta-enxertos sul-brasileiros			
Capdeboscq	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Melhoramento EMBRAPA
Aldrighi	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Seleção produtor rural
Aldrighi Cléber	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Seleção EMBRAPA
WFM-ESM-07-01	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
WFM-ESM-07-02	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
WFM-ESM-07-03	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
WFM-ESM-07-04	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
Cristal Taquari	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Seleção EMBRAPA
Chorão 2003-229-03	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Seleção EMBRAPA
Farrapos	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Melhoramento EMBRAPA
Bolinha	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Melhoramento EMBRAPA
Casc 1005	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Seleção EMBRAPA
Cons 594	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Seleção EMBRAPA
Maracotão	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Melhoramento EMBRAPA
Tardio-01	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Seleção EMBRAPA
Turquesa	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Melhoramento EMBRAPA
FRM-AGA-08-55	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
GGs-TUR-08-31	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
GGs-TUR-08-30	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
GGs-TUR-08-27	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
COAS-AME-08-25	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
COAS-AME-08-22	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
COAS-AME-08-20	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
COAS-SAA-08-17	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
JCB-PLA-08-16	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
JCB-PLA-08-15	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
JCB-SAA-08-13	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
JCB-SAA-08-11	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
MF-JUB-08-09	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
MF-GRA-08-01	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
Rosaflor	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Melhoramento EMBRAPA
Nem CPACT	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	EMBRAPA CPACT
Piazito	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Raseira et al. (1989)
<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	EMBRAPA CPACT
Porta-enxertos internacionais			
Tsukuba-1	<i>P. persica</i>	Japão	Desconhecida
Tsukuba-2	<i>P. persica</i>	Japão	Desconhecida
Tsukuba-3	<i>P. persica</i>	Japão	Desconhecida
Tsukuba-2CPACT	<i>P. persica</i>	Japão	Desconhecida
Flordaguard	<i>P. persica</i> x <i>P. davidiana</i>	EUA	Sherman et al. (1991)
De guia	<i>P. persica</i>	México	Desconhecida
Okinawa	<i>P. persica</i>	Okinawa	Desconhecida
Nemared	(<i>P. persica</i> x <i>P. davidiana</i>) x <i>P. persica</i>	EUA	Ramming and Tanner (1983)
Ishtara	(<i>P. ceracifera</i> x <i>P. salicina</i>) x (<i>P. ceracifera</i> x <i>P. persica</i>)	França	Renaud et al. (1988)
GxN9	<i>P. amygdalus</i> x <i>P. persica</i>	Espanha	Felipe et al. (1998)
GF 677	<i>P. dulcis</i> x <i>P. persica</i>	França	Bernhard and Grasselly (1981)
Cadamann	<i>P. persica</i> x <i>P. davidiana</i>	França-Hungria	Edin and Garcin (1994)
Barrier	<i>P. persica</i> x <i>P. davidiana</i>	Itália	De Salvador et al. (1991)
México Fila 2	<i>P. persica</i>	México	Desconhecida
México Fila 1	<i>P. persica</i>	México	Desconhecida

Tabela 1. Continuação...

Porta-enxertos introduzidos	Espécie	Origem	Referência
I-67-52-9	<i>P. persica</i>	Desconhecida	Desconhecida
I-67-52-4	<i>P. persica</i>	Desconhecida	Desconhecida
I-67-55-9	<i>P. persica</i>	Desconhecida	Desconhecida
I-67-54-12	<i>P. persica</i>	Desconhecida	Desconhecida
I-67-53-5	<i>P. persica</i>	Desconhecida	Desconhecida
I-93-27	<i>P. persica</i>	EUA/ Texas	Desconhecida
I-93-21	<i>P. persica</i>	EUA/ Texas	Desconhecida
I-67-57-14	<i>P. persica</i>	Desconhecida	Desconhecida
I-67-55-13	<i>P. persica</i>	Desconhecida	Desconhecida
I-93-38	<i>P. persica</i>	EUA/ Texas	Desconhecida
I-93-37	<i>P. persica</i>	EUA/ Texas	Desconhecida
I-93-30	<i>P. persica</i>	EUA/ New Jersey	Desconhecida
Outras espécies (<i>Prunus</i> spp.)			
Cereja Livramento	<i>P. sp.</i>	Brasil/ RS	EMBRAPA CPACT
Cereja Tardia	<i>P. sp.</i>	Brasil/ SC	EPAGRI
Cereja Precoce	<i>P. sp.</i>	Brasil/ SC	EPAGRI
Mirabolano 29C	<i>P. cerasifera</i>	EUA	Okie (1987)
Clone 15	<i>P. mume</i>	Brasil/ SP	Desconhecida
Rigitano	<i>P. mume</i>	Brasil/ SP	Desconhecida
<i>P. mume</i> CPACT	<i>P. mume</i>	Brasil/ RS	EMBRAPA CPACT
Marianna	<i>P. cerasifera</i> x <i>P. munsoniana</i>	Desconhecida	Desconhecida
Santa Rosa	<i>P. salicina</i> x <i>P. simonii</i> x <i>P. americana</i>	Desconhecida	Burbank (1907)
Genovesa	<i>P. salicina</i>	Desconhecida	Desconhecida
Julior	<i>P. insititia</i> x <i>P. domestica</i>	Desconhecida	Desconhecida
<i>P. kansuensis</i>	<i>P. kansuensis</i>	Brasil/ RS	EMBRAPA CPACT
<i>P. sellowii</i>	<i>P. sellowii</i>	Brasil/ RS	EMBRAPA CPACT
<i>P. manshurica</i>	<i>P. manshurica</i>	Brasil/ RS	EMBRAPA CPACT

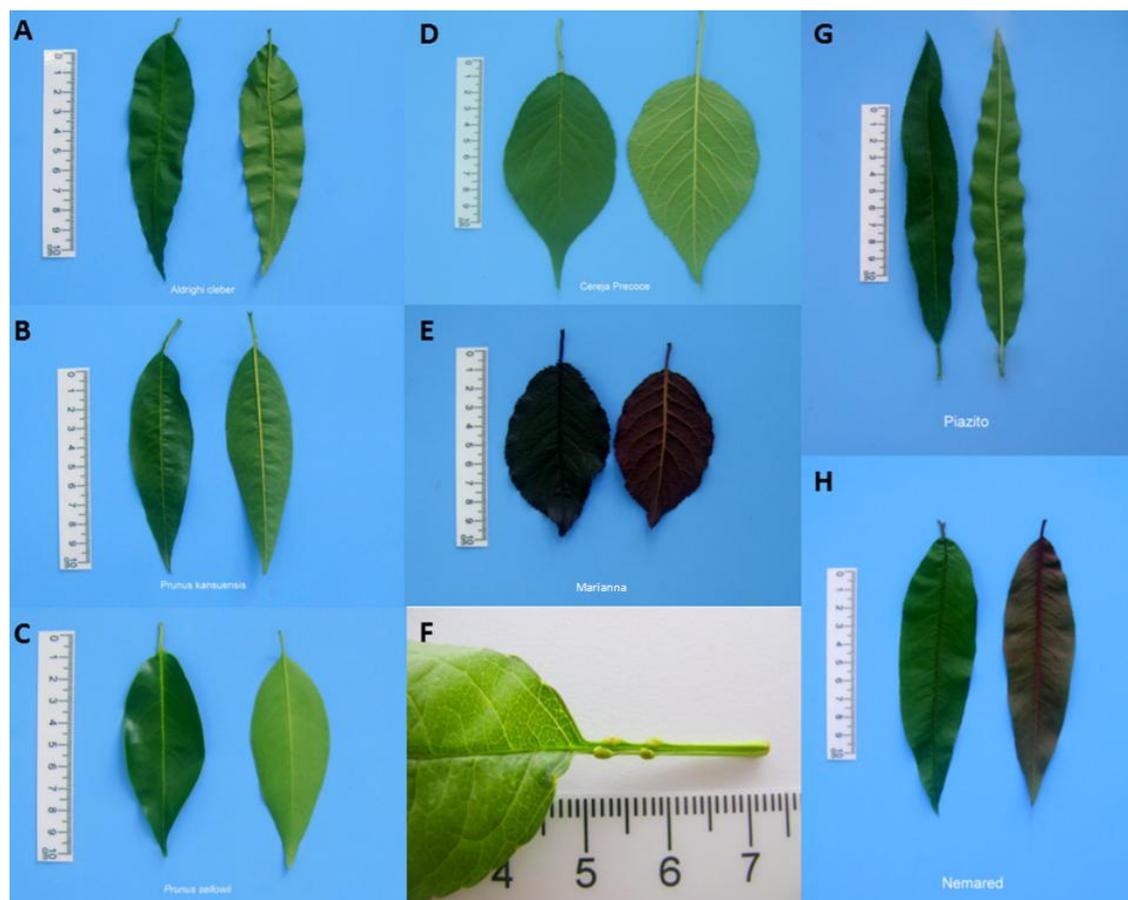


Figura 1. Ilustração da diversidade de características foliares de alguns dos acessos que compõem a coleção de porta-enxertos de *Prunus*. (A) Folhas de Aldrich Cléber, (B) *Prunus kansuensis*, (C) *Prunus sellowii*, (D) Cerejeira Precoce, (E) Marianna, (F) detalhes de limbo foliar, pecíolo e nectário mais comuns entre os acessos do banco de germoplasma, (G) Piaquito e (H) Nemared.

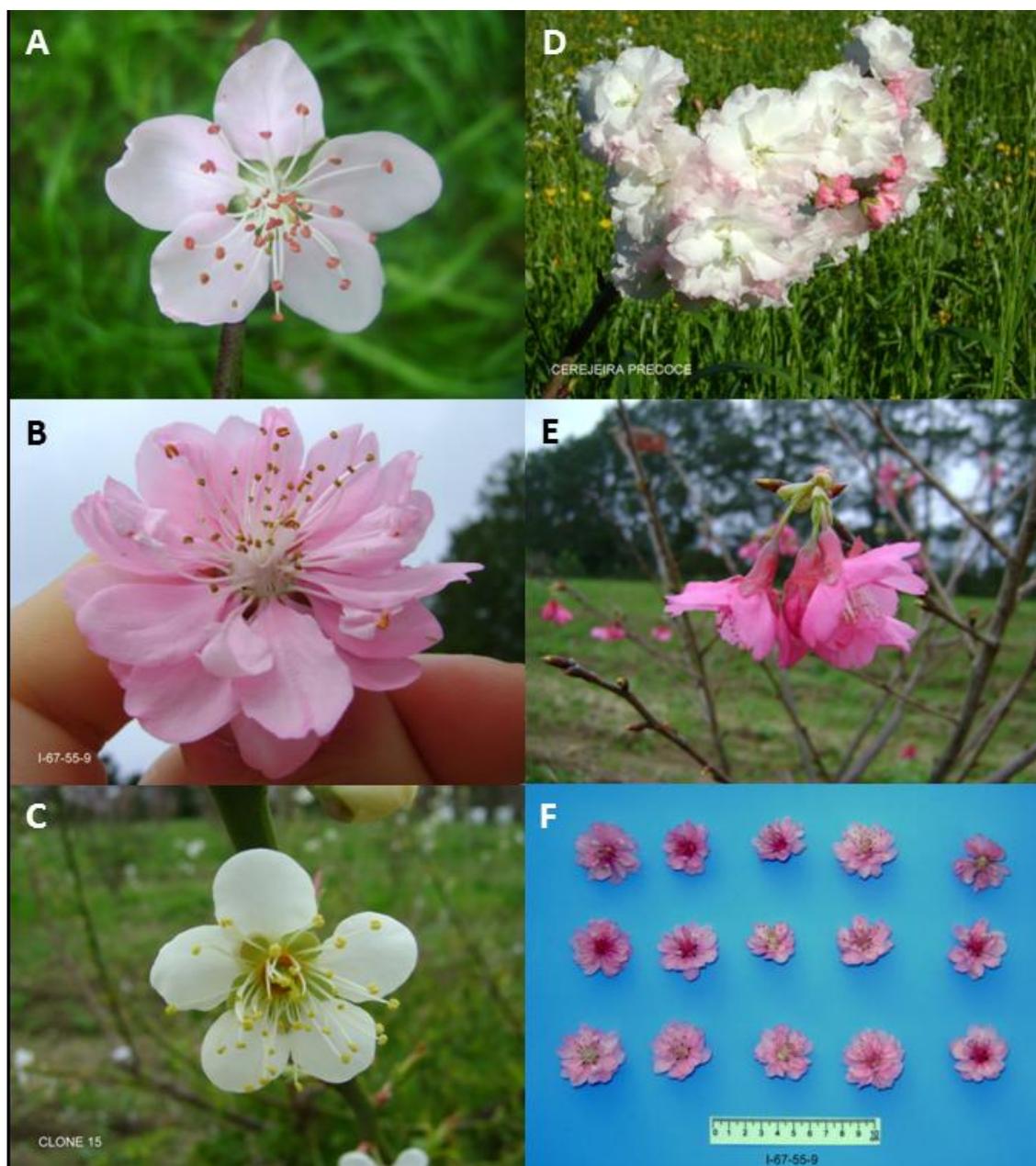


Figura 2. Ilustração da diversidade de características florais de alguns dos acessos que compõem a coleção de porta-enxertos de *Prunus*. (A) Aldrighi, (B) I-67-55-9, (C) Clone 15, (D) Cerejeira Precoce, (E) Cerejeira Tardia e (F) I-67-55-9.

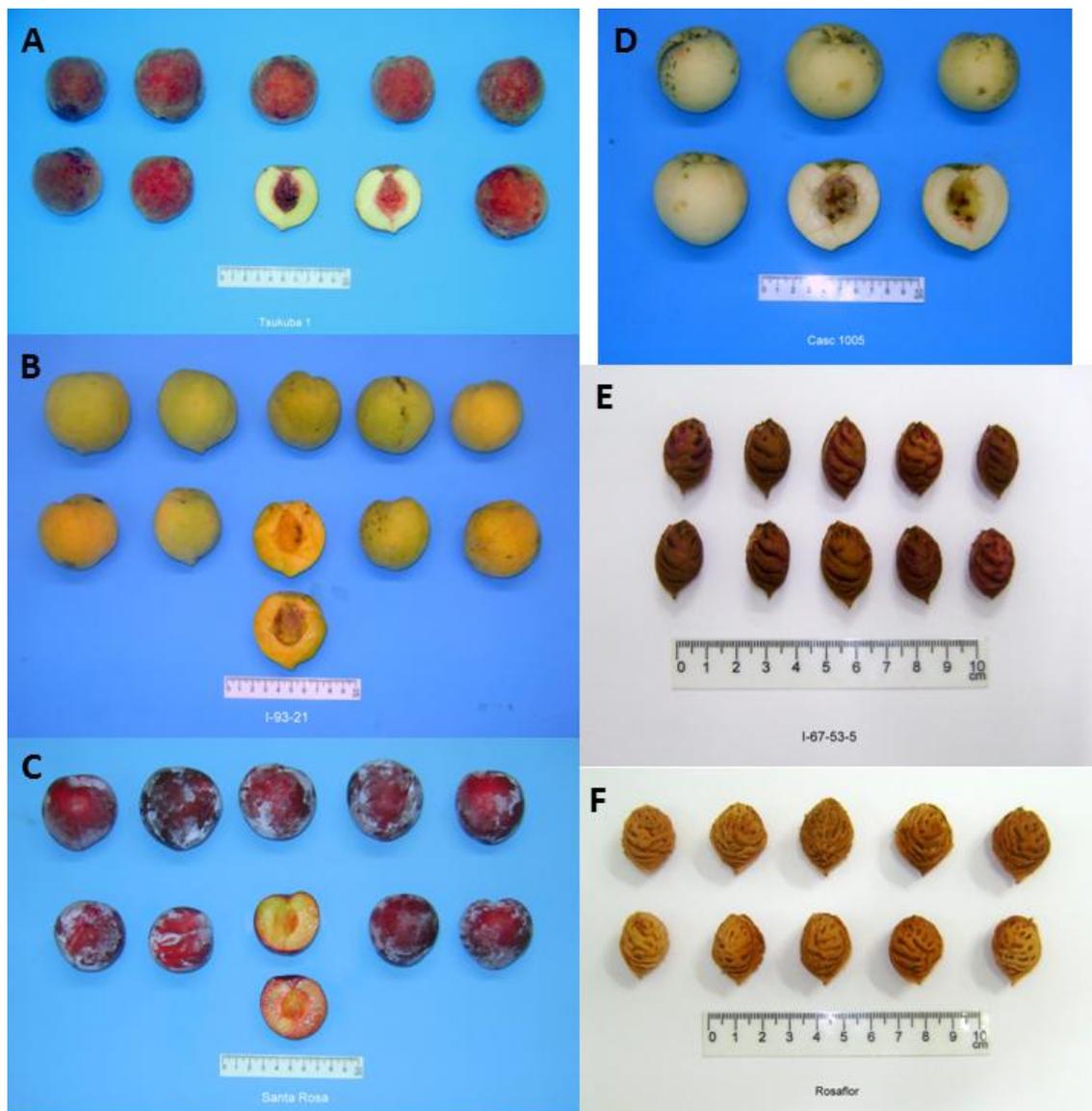


Figura 3. Ilustração da diversidade de características de frutos e caroços de alguns dos acessos que compõem a coleção de porta-enxertos de *Prunus*. (A) Frutos do acesso Tsukuba-1, (B) I-93-21, (C) Santa Rosa e (D) Casc 1005, (E) caroços do acesso I-67-53-5 e (F) Rosaflor.



Figura 4. Ilustração de alguns dos acessos que compõem a coleção de porta-enxertos de *Prunus* em diferentes estádios de desenvolvimento. (A) Planta em estágio de desenvolvimento vegetativo e (B) planta em estágio de desenvolvimento floral.

Tabela 2. Caracteres qualitativos e quantitativos avaliados nos acessos da coleção de porta-enxertos de *Prunus*.

No	Caractere	Abreviação	1	2	3	4	5
Parâmetros qualitativos e seus estados e códigos							
1	Folha- forma	FF	Elíptica estreita	Elíptica	Circular	Oval	-
2	Folha- cor matura	FCM	Verde	Vermelha	-	-	-
3	Folha- cor jovem	FCJ	Verde	Vermelha	-	-	-
4	Folha- jovem pigm. antociânica marg.	FJPAM	Ausente	Presente	-	-	-
5	Folha- pubescência	FP	Ausente	Presente	-	-	-
6	Folha- margens	FM	Lisa	Crenada	Serrilhada	-	-
7	Folha- profundidade incisões	FPI	Rasa	Média	Profunda	Lisa	-
8	Folha- posição nectários	FPN	Ausente	Folha	Pecíolo	Fol. pec.	-
9	Ápice- pigmentação antociânica	APA	Ausente	Presente	-	-	-
10	Flor- cor	FLC	Rosa	Branca	-	-	-
11	Flor- posição estigma/anteras	FLPEA	Abaixo	Acima	-	-	-
12	Fruto- formato	FRF	Ovalado	Truncado	Circular	Cônico	Oblato
13	Fruto- pubescência	FRP	Ausente	Presente	-	-	-
14	Fruto- cavidade pedúnculo	FRCP	Rasa	Profunda	Lisa	-	-
15	Fruto- cor maturação	FRCorM	Roxo	Verde	Amarelo	Branco	Vermelho
16	Fruto- cor de fundo	FRCorF	Verde	Amarelo	Branco	Vermelho	-
17	Fruto- cor de polpa	FRCorP	Vermelha	Amarela	Branca	-	-
18	Fruto- cor de polpa ao redor caroço	FRCorRC	Ausente	Presente	-	-	-
19	Fruto- aderência caroço	FRAC	Não aderente	Aderente	-	-	-
20	Caroço- forma	CF	Arredondado	Elíptico	Circular	-	-
21	Caroço- superfície	CS	Cavidades e sulcos	Sulcos	Grandes cavidades	Semi-lisa	Lisa
Parâmetros quantitativos e suas unidades							
1	Folha- ângulo ápice	FLAA	Grau (°)				
2	Folha- ângulo base	FLAB	Grau (°)				
3	Folha- comprimento pecíolo	FLCP	Mm				
4	Folha- comprimento limbo	FLCL	Mm				
5	Folha- largura limbo	FLL	Mm				
6	Folha- razão comp.fol./largura fol.	FLRCFLF	Valor				
7	Folha- razão comp.pec./comp. fol.	FLRCPCF	Valor				
8	Folha- número de nectários	FLNN	Valor				
9	Flor- tamanho	FLT	Mm				
10	Flor- número de pétalas	FLNP	Nº				
11	Flor- número de sépalas	FLNS	Nº				
12	Flor- número de anteras	FLNA	Nº				
13	Fruto- massa	FRM	Gr				
14	Fruto- diâmetro longitudinal	FRDLong	Mm				
15	Fruto- diâmetro latitudinal	FRDLat	Mm				
16	Fruto- razão massa/diâm. long.	FRRMDLong	Valor				
17	Fruto- razão massa/diâm. lat.	FRRMDLat	Valor				
18	Fruto- porcentagem cor de matur.	FRPC	%				
19	Fruto- massa de polpa	FRMP	Gr				
20	Caroço- massa	CM	Gr				
21	Caroço- diâmetro longitudinal	CDLong	Mm				
22	Caroço- diâmetro latitudinal 1	CDLat1	Mm				
23	Caroço- diâmetro latitudinal 2	CDLat2	Mm				
24	Amêndoa- diâmetro longitudinal	ADLong	Mm				
25	Amêndoa- diâmetro latitudinal 1	ADLat	Mm				
26	Amêndoa- diâmetro latitudinal 2	ADLat	Mm				

Nota: mm- milímetros, N°- número, % porcentagem e gr- gramas.

Tabela 3. Sumário dos parâmetros de diversidade genética obtidos pela avaliação de 21 caracteres qualitativos e 26 quantitativos na coleção de porta-enxertos de *Prunus*.

Caractere	Caracteres qualitativos				Caractere	Caracteres quantitativos			
	Na	Ne	I	PD		Na	Ne	I	PD
FF	3	1,43	0,57	0,30	FLÂA	11	4,68	1,80	0,79
FCM	2	1,17	0,28	0,15	FLÂB	10	4,59	1,85	0,78
FCJ	2	1,25	0,35	0,20	FLCP	12	6,64	2,08	0,85
FJPAM	2	1,27	0,37	0,21	FLCL	12	7,87	2,22	0,87
FP	2	1,08	0,17	0,08	FLL	3	1,28	0,44	0,22
FM	3	1,94	0,73	0,48	FLRCFLF	11	7,30	2,14	0,86
FPI	4	1,39	0,58	0,28	FLRCPCF	16	5,81	2,13	0,83
FPN	4	2,32	1,05	0,57	FLNN	7	3,00	1,36	0,67
APA	2	1,68	0,59	0,40	FLT	12	7,45	2,21	0,86
FLC	2	1,29	0,38	0,22	FLNP	4	1,13	0,28	0,11
FLPEA	2	1,90	0,67	0,47	FLNS	3	1,06	0,15	0,06
FRF	5	2,64	1,14	0,62	FLNA	8	5,96	1,90	0,83
FRP	2	1,17	0,27	0,11	FRM	7	5,19	1,77	0,81
FRCP	3	2,05	0,77	0,51	FRDLong	9	4,88	1,80	0,79
FRCorM	5	2,43	1,05	0,59	FRDLat	8	4,88	1,80	0,79
FRCorF	4	1,55	0,70	0,35	FRRMDLong	6	5,26	1,72	0,82
FRCorP	3	2,08	0,78	0,52	FRRMDLat	6	5,04	1,68	0,80
FRCorRC	2	1,98	0,69	0,49	FRPC	4	3,63	1,33	0,72
FRAC	2	1,96	0,68	0,49	FRMP	7	5,19	1,77	0,81
CF	3	1,26	0,41	0,21	CM	9	6,47	2,00	0,85
CS	5	2,47	1,08	0,59	CDLong	9	5,89	1,93	0,83
Média	2,95	1,73	0,63	0,37	CDLat1	8	5,35	1,81	0,81
Total	62	36,28	-	-	CDLat2	11	6,19	2,04	0,85
					ADLong	9	5,27	1,83	0,81
					ADLat1	5	3,14	1,33	0,68
					ADLat2	7	4,28	1,61	0,77
					Média	8,23	4,90	1,65	0,73
					Total	214	127,4	-	-

Nota: Na- número de categorias observadas, Ne- número de categorias efetivas, I- índice de diversidade de Shannon, e PD- poder de discriminação.

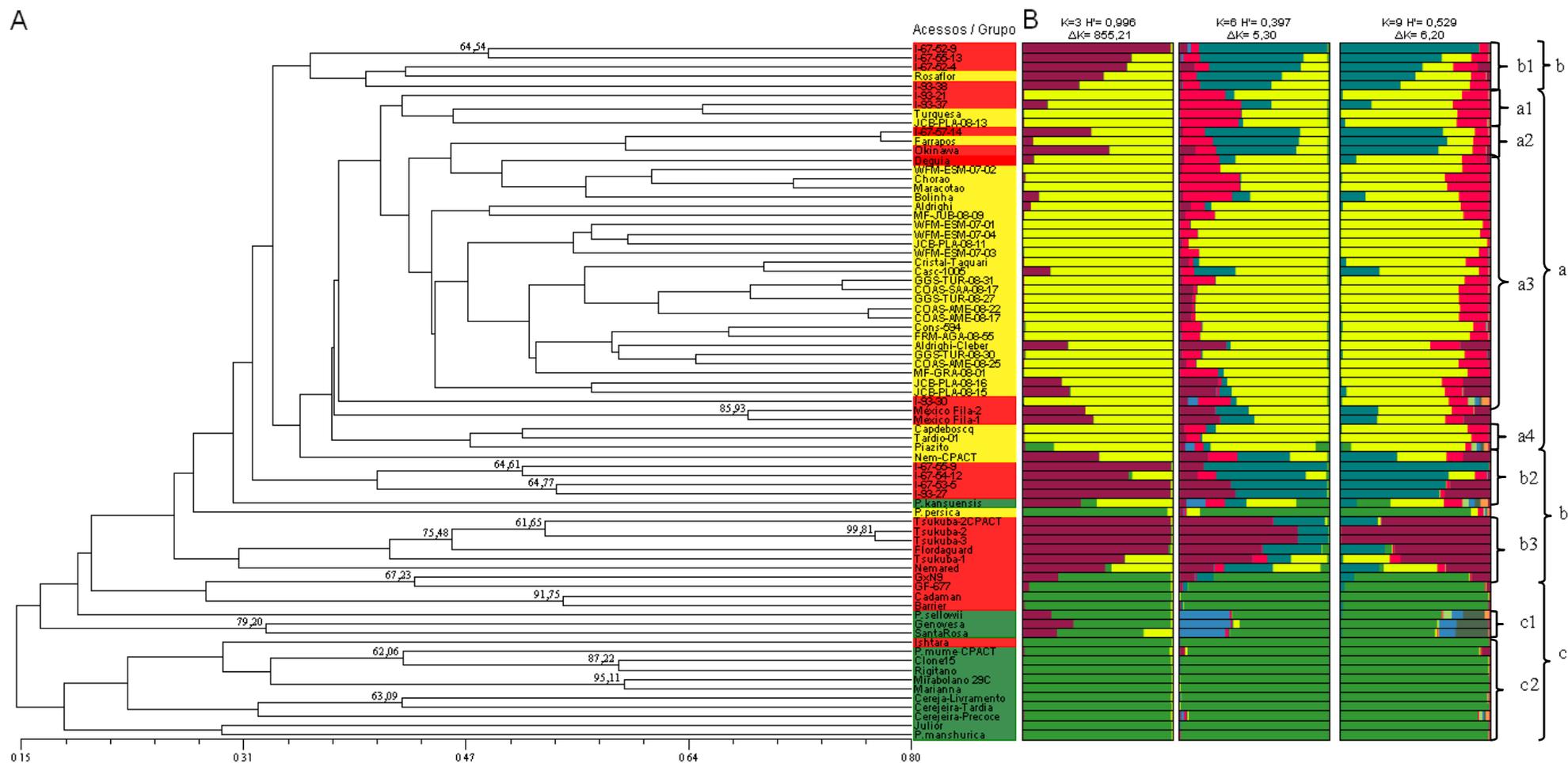


Figura 5. Agrupamento dos 75 acessos da coleção de porta-enxertos de *Prunus*. O dendograma foi obtido através da análise de agrupamento UPGMA usando-se a matriz de distâncias gerada pelo coeficiente Jaccard (Jaccard, 1908), baseada na avaliação de 47 caracteres fenotípicos. Os acessos estão identificados por grupo de acordo com cores: amarelo- sul-brasileiro, vermelho- introduzidos e verde- outras espécies. (B) Plot de estimativa da estrutura fenotípica por diferentes valores de K , valores de similaridade média de pares permutados (H') e valores de delta K (ΔK).

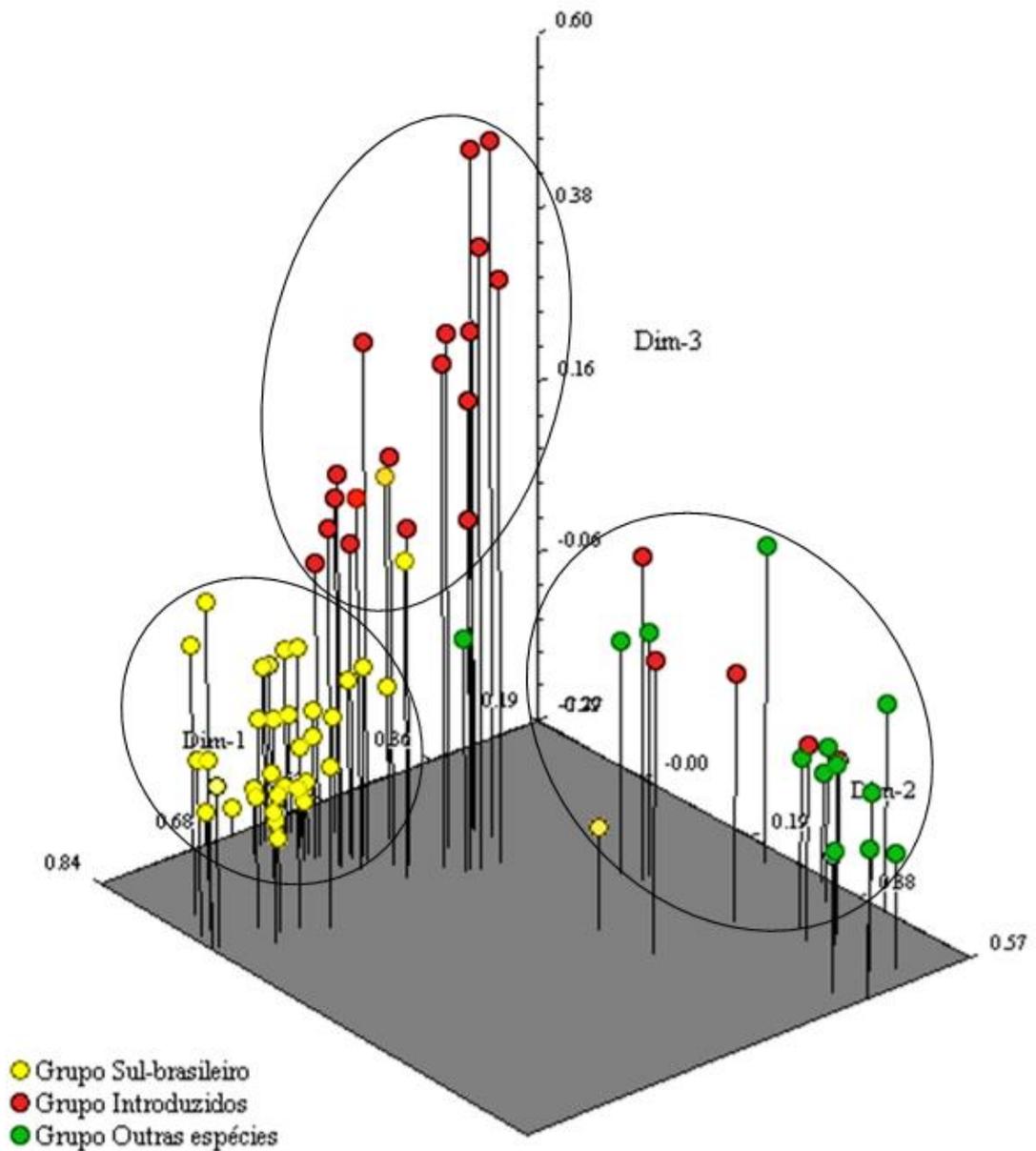


Figura 6. Dispersão tridimensional dos acessos da coleção de porta-enxerto de *Prunus*, baseada na análise de Coordenadas Principais (PCoA). Os valores das coordenadas principais são PCo1= 31,51%, PCo2= 4,72% e PCo3= 4,03%, obtidos pela análise Eigen através da matriz de distância fenotípica Jaccard (Jaccard, 1908). Os grupos que compõem a coleção estão representados por diferentes círculos coloridos.

Tabela 4. Vetores Eigen, valores Eigen, porcentagem de variância e variância acumulada de três coordenadas principais dos 75 acessos de porta-enxertos de *Prunus* para os 47 caracteres fenotípicos avaliados.

Acessos	Eigen Vectors		
	PCo 1	PCo 2	PCo 3
Capdeboscq	0.601	-0.196	-0.084
Aldrighi	0.601	-0.182	-0.147
Aldrighi Cléber	0.620	-0.163	-0.062
Tardio-01	0.594	-0.141	-0.169
Rosaflor	0.518	-0.075	0.182
Deguaia	0.608	-0.153	-0.042
Piazito	0.515	-0.078	-0.091
Nem-CPACT	0.565	0.015	0.125
WFM-ESM-07-01	0.622	-0.148	-0.247
WFM-ESM-07-02	0.617	-0.169	-0.206
WFM-ESM-07-03	0.617	-0.155	-0.287
WFM-ESM-07-04	0.662	-0.143	-0.202
Cristal-Taquari	0.835	-0.022	-0.058
Chorão	0.808	-0.068	0.061
Farrapos	0.815	-0.029	0.134
Bolinha	0.615	-0.091	-0.094
Casc-1005	0.578	-0.072	-0.060
A Cons-594	0.743	-0.127	-0.198
<i>Prunus persica</i>	0.475	0.254	-0.153
Maracotão	0.642	-0.157	-0.122
Turquesa	0.626	-0.094	-0.210
FRM-AGA-08-55	0.779	0.044	-0.117
GGs-TUR-08-31	0.843	0.007	-0.043
GGs-TUR-08-30	0.705	0.053	-0.078
GGs-TUR-08-27	0.832	0.008	-0.080
COAS-AME-08-25	0.734	0.032	-0.108
COAS-AME-08-22	0.745	0.002	-0.157
COAS-AME-08-17	0.756	0.023	-0.111
COAS-SAA-08-17	0.771	0.002	-0.116
JCB-PLA-08-16	0.634	-0.161	-0.059
JCB-PLA-08-15	0.613	-0.122	-0.026
JCB-PLA-08-13	0.606	-0.101	-0.136
JCB-PLA-08-11	0.652	-0.196	-0.251
MF-JUB-08-09	0.602	-0.162	-0.227
MF-GRA-08-01	0.614	-0.104	-0.193
I-67-52-9	0.472	0.015	0.297
I-67-52-4	0.604	-0.060	0.188
I-67-55-9	0.479	-0.012	0.375
I-67-54-12	0.554	-0.022	0.238
I-67-53-5	0.515	0.022	0.361
I-93-27	0.573	-0.046	0.380
I-93-21	0.593	-0.161	-0.134
I-67-57-14	0.603	-0.056	0.219
I-67-55-13	0.540	-0.011	0.147
B I-93-38	0.582	-0.063	0.119
I-93-37	0.569	-0.057	-0.040
I-93-30	0.556	-0.129	-0.136
Ishtara	0.273	0.435	-0.061
GxN9	0.359	0.190	0.132
GF-677	0.464	0.338	0.090
Cadamann	0.310	0.424	-0.034
Barrier	0.340	0.334	0.031
Tsukuba-2 CPACT	0.484	0.052	0.508
México Fila-2	0.607	-0.092	0.092
México Fila-1	0.577	-0.108	0.121

	Tsukuba-1	0.427	-0.032	0.354
	Tsukuba-2	0.423	-0.002	0.604
	Tsukuba-3	0.431	-0.027	0.587
	Flordaguard	0.457	0.053	0.459
	Okinawa	0.592	-0.034	0.193
	Nemared	0.493	0.041	0.164
	<hr/>			
	<i>Prunus mume</i> CPACT	0.289	0.450	-0.055
	Mirabolano 29C	0.276	0.539	-0.139
	Marianna	0.314	0.472	-0.155
	Julior	0.204	0.328	-0.143
	Clone 15	0.367	0.536	-0.105
	<i>Prunus manshurica</i>	0.195	0.426	-0.019
C	Rigitano	0.348	0.573	-0.094
	Genovesa	0.223	0.247	0.122
	Santa Rosa	0.367	0.163	0.015
	Cerejeira Livramento	0.294	0.394	-0.068
	Cerejeira Tardia	0.301	0.523	-0.058
	Cerejeira Precoce	0.230	0.364	-0.087
	<i>Prunus sellowii</i>	0.347	0.189	0.030
	<i>Prunus kansuensis</i>	0.502	0.044	0.013
	<hr/>			
	Eigen Value	2,363	3,542	3,029
	Variação	31,51%	4,72%	4,03%
	Variação acumulada	31,51%	36,23%	40,26%

Nota: A- grupo de acessos de porta-enxertos Sul-brasileiros, B- grupo de acessos de porta-enxertos Introduzidos e C- grupo de acessos de porta-enxertos de outras espécies de *Prunus*.

Tabela 5. Sumário da análise de particionamento de variância morfológica entre grupos, e dentro de grupos que constituem a coleção de porta-enxerto de *Prunus* com o teste de probabilidade de 1023 permutações (Excoffier et al., 1992).

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	2	102,912	1,79874 Va	17,46
Dentro de grupos	72	612,141	8,50196 Vb	82,54
Total	74	715,053	10,30071	100

Índice de fixação F_{ST} : 0,175

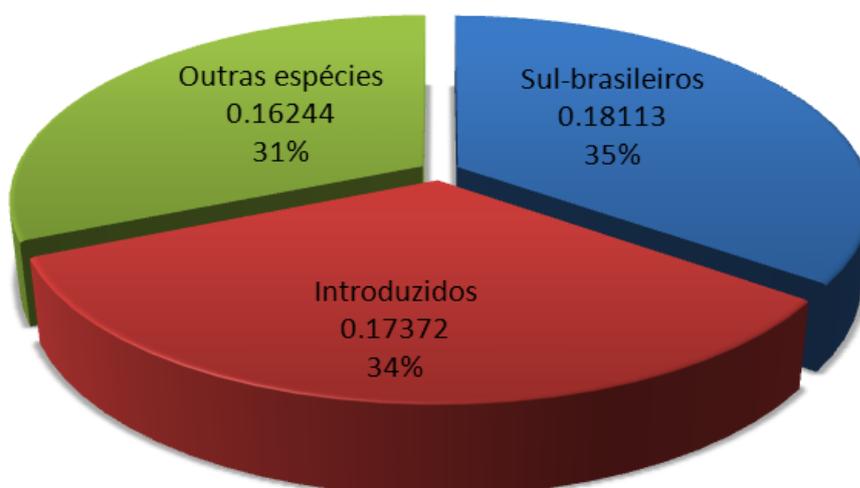


Figura 7. Diferenciação dos grupos de acessos da coleção de porta-enxertos de *Prunus* pelo índice de fixação (F_{ST}) obtido através do teste de probabilidade com 1023 permutações (Excoffier et al., 1992).

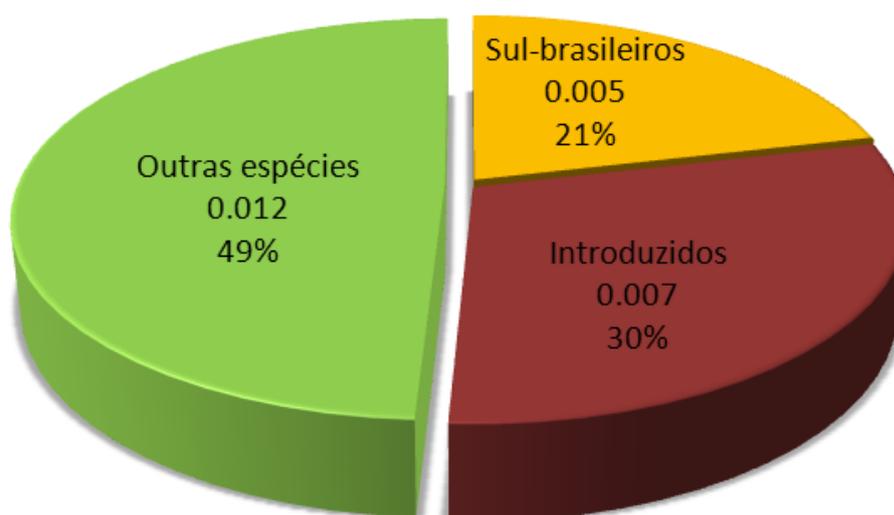


Figura 8. Índice de fixação (F_{ST}) médio por acesso de cada grupo de porta-enxertos de *Prunus* da coleção, obtido através da análise de particionamento da variância pelo teste de probabilidade de 1023 permutações (Excoffier et al., 1992).

ARTIGO 2

Estimativa da diversidade, estrutura e relação genética de porta-enxertos de *Prunus* baseados na avaliação de *loci* SSR

[Artigo a ser submetido à revista Theoretical and Applied Genetics (TAG)]

Estimativa da diversidade, estrutura e relação genética de porta-enxertos de *Prunus* baseados na avaliação de *loci* SSR

Luis Willian Pacheco Arge · Daiane de Pinho Benemann · Newton Alex Mayer · José Antonio Peters · Valmor João Bianchi

L. W. P. Arge (✉) · D. de P. Benemann · J. A. Peters · V. J. Bianchi

Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, CEP 96010-900, Caixa-Postal: 354, Capão do Leão, RS, Brasil.

E-mail: lwillianpacheco@yahoo.com.br

N. A. Mayer

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA Clima Temperado, BR 392, Km 78, CEP 96010-971, Caixa Postal: 403, Pelotas, RS, Brasil.

Resumo: Os programas de melhoramento genético de prunáceas do Brasil estiveram voltados durante muitos anos para a obtenção de novas cultivares-copas, deixando de lado os porta-enxertos. Entretanto, nos últimos anos esta perspectiva tem se modificado, pois órgãos como a Universidade Federal de Pelotas e a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Clima Temperado tem dado maior importância às pesquisas voltadas ao melhoramento genético de porta-enxertos de *Prunus*. Ambos os órgãos possuem coleções de germoplasma e a caracterização genética destes faz-se necessária. No presente estudo deu-se enfoque na caracterização da diversidade genética de uma coleção de porta-enxertos de *Prunus* da EMBRAPA Clima Temperado, a qual é constituída por 75 acessos. O objetivo foi elucidar a relação genética existente entre os acessos e entre os grupos de acessos, e a estrutura genética da coleção, por meio de avaliações moleculares baseadas na análise de 17 *loci* SSR. O dendograma UPGMA obtido a partir da matriz de distância genética obtida pelo coeficiente Nei & Li, não foi capaz de distinguir todos os acessos da coleção pelos *loci* SSR avaliados. Os acessos que não se distinguiram foram Tsukuba-1, Tsukuba-2 e Tsukuba-3, os quais provavelmente foram selecionados a partir de uma população de seedlings com origem comum. O dendograma UPGMA juntamente com a abordagem Bayesiana possibilitou a identificação de três pools alélicos, os quais são constituídos em grande parte por acessos de um único grupo da coleção. Os acessos do grupo sul-brasileiro originários de coletas, não possuem genealogia conhecida, e estes apresentaram em parte (32,35%) estreita relação genética com os acessos Aldrighi e Capdeboscq, que tradicionalmente no Rio Grande do Sul foram os principais porta-

enxertos utilizados na produção de mudas. A análise de coordenadas principais mostrou-se menos efetiva para a detecção dos grupos que constituem a coleção quando comparada com os agrupamentos UPGMA e Bayesianos. O grupo de acessos introduzidos de outros países foi o que mais contribuiu para a diversidade genética. No entanto, devido os grupos não serem constituídos pelo mesmo número de acessos, a proporção de contribuição do grupo de outras espécies foi maior do que a dos demais grupos, como já era esperado, pois as maiores diferenças moleculares e morfológicas são encontradas entre espécies distintas. Concluiu-se que a abordagem Bayesiana juntamente com a hierárquica foram eficientes para detectar três pools alélicos, os quais tem alta relação com os grupos que compõem a coleção, sendo que dois destes são integrantes da subfamília *Amygdalus* e o terceiro da *Prunophora*. Além disso, possibilitou avaliar-se a diversidade genética da coleção.

Palavras-chave: *Prunus* spp. · SSR · diversidade genética · relação genética · estrutura genética · abordagem hierárquica · abordagem Bayesiana.

Abstract: The breeding programs of prunaceas in Brazil for many years been directed to obtain new scion cultivars, leaving aside the rootstocks. However, in recent years this view has changed because agencies like Federal University of Pelotas and EMBRAPA (Brazilian Agricultural Research Corporation) Clima Temperado has given greater importance to research aimed at breeding rootstocks *Prunus*. Both institutions have collections, and genetic characterization of these is necessary. In this context, the present study focus on the genetic diversity characterization of *Prunus* rootstocks collection belonging EMBRAPA Clima Temperado, which consists of 75 access. The aim was to elucidate the genetic relationships among the access and between groups of accessi, and genetic structure of collection, through evaluations based on molecular analysis of 17 SSR *loci*. The UPGMA dendrogram obtained from the genetic distance matrix computed by Nei & Li coeficiente, was not able to distinguish all accessions of collection by SSR *loci* evaluated. Tsukuba-1, Tsukuba-2 access were not distinguished and Tsukuba-3, which probably were selected from a population of seedlings with common origin. The UPGMA dendrogram with the Bayesian approach allowed the identification of three allelic pools, which consist largely of accesses of a single group of collection. The South Brazilian access originating from collections samples, have not known pedigree, and they showed in part close genetic (32.35%) relationship with the Aldrighi and Capdeboscq access, traditionally in Rio Grande do Sul were the main rootstocks used in the production of seedlings. The principal coordinates analysis was less effective for forming groups compared to Bayesian groups by UPGMA. The group of access introduced globally was the largest contributor to genetic diversity. However, because the groups are not formed by the same number of requests, the proportion of contribution from the other species was larger than that of the other groups, as expected, because the larger molecular and morphological differences are found between different species. In conclusion, the Bayesian approach with the hierarchy were effective to detect allelic pools, which is high compared with the groups that make up the collection, and two of these are members of the subfamily of *Amygdalus* and third *Prunophora*. Furthermore, it was possible to evaluate the genetic diversity of the collection.

Keywords: *Prunus* spp. · SSR · genetic diversity · genetic relationship · genetic structure · hierarchical approach · Bayesian approach.

Introdução

A família *Rosaceae* abrange aproximadamente 90 gêneros e três mil espécies, dentro dela está inserida a subfamília *Prunoideae*, que se divide nos subgêneros *Prunophora* (onde estão inseridas as diferentes espécies de ameixeira) e *Amygdalus* (composta principalmente pelas variedades botânicas de pessegueiro, damasqueiro e amêndoeira). Dentre as inúmeras espécies do gênero *Prunus*, as de maior importância agrônômica são: *P. persica* (L.) Batsch (pessegueiro e a nectarineira), *P. salicina* L. (ameixeira japonesa), *P. domestica* L. (ameixeira europeia), *P. armeniaca* (L.) Kostina (damasqueiro); *P. cerasus* (cerejeira ácida); *P. avium* (cerejeira doce) e *P. amygdalus* (amêndoeira) (Potter, 2003). Estas espécies são utilizadas como fonte de produção de frutas, óleos e madeira, além de serem utilizadas como ornamentais e porta-enxertos.

No Brasil, a espécie de maior importância dentro do gênero *Prunus* é a *P. persica*. A introdução da cultura ocorreu pela Capitania de São Vicente (atual Estado de São Paulo) por mudas de pessegueiros trazidas da Ilha da Madeira, em 1532, por Martim Afonso de Souza. Posteriormente o pessegueiro começou a ser cultivado no Estado do Rio Grande do Sul (região Sul do Brasil), estado em que a cultura mais se expandiu em área cultivada no país (Raseira et al., 2008).

No ano de 2010, o Brasil ocupou a décima quarta posição no ranking mundial de produção de pêssegos e nectarinas (FAOSTAT, 2012), com a produção de 220.739 Mg (IBGE, 2012). Mesmos assim, a produção foi insuficiente para suprir a demanda do mercado interno, sendo compensada pelas importações, o que acabou contribuindo negativamente para a cadeia produtiva de frutas de caroço. Um dos motivos da necessidade de importação de pêssegos e nectarinas foi à baixa produtividade média da principal região produtora do país, o Sul do Brasil. O estado do Rio Grande do Sul apresenta produtividade média de 8,95 Mg ha⁻¹, que é baixa quando comparada com a produtividade média dos outros estados, os quais chegaram a apresentar médias acima de 20 Mg ha⁻¹ (estados de Minas Gerais e São Paulo) (IBGE, 2012).

A baixa produtividade dos pomares de prunáceas no estado do Rio Grande do Sul está relacionada ao predominante cultivo de frutas para a agroindústria, a qual tem valor de mercado inferior às frutas de consumo *in natura*, o que conseqüentemente afeta os investimentos em tecnologia e no manejo de produção. Além disso, problemas de ordem climática, fitossanitária e de indefinição no uso de porta-enxertos utilizados nos pomares do RS influenciam negativamente a produção de frutas de caroço. Os porta-enxertos utilizados são tradicionalmente obtidos a partir de sementes de caroços oriundos das agroindústrias de conservas, normalmente derivados de misturas de cultivares de ciclo tardio, nos quais se enxertam borbulhas de cultivar-copa de interesse para a produção de mudas (Tofanelli et al., 2001).

As mudas de pessegueiros obtidas por esse método não possuem garantia de qualidade genética e sanitária do porta-enxerto, resultando conseqüentemente na perda de características agrônômicas desejáveis, o que afeta de forma negativa a produção de frutas de prunáceas (Fachinello, 2000; Tofanelli et al., 2003). Os principais problemas associados ao uso desse tipo de semente para produção de porta-enxertos são: o variável estande de plantas devido a variabilidade genética existente e a desconhecida tolerância a estresses bióticos e abióticos. Além disso, as cultivares-copa de onde são obtidos os caroços para a produção de porta-enxertos não foram selecionadas para a resistência ao ataque de pragas e

doenças do solo, o que pode aumentar os danos causados pela síndrome conhecida como morte precoce do pessegueiro (Mayer et al., 2009). Neste contexto, as pesquisas nas áreas de fisiologia e melhoramento genético vegetal sob os principais pontos que limitam o aumento da produção de prunáceas são de fundamental importância para o desenvolvimento de genótipos de porta-enxertos adaptados às condições do estado para que em parte possam aumentar a produção de pêssego da principal região produtora do Brasil.

Os principais órgãos de pesquisa em atuação na região sul do Brasil na linha de porta-enxertos de *Prunus* são a Universidade Federal de Pelotas juntamente com a EMBRAPA CPACT (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Centro de Pesquisa Agropecuária em Clima Temperado), ambas possuindo coleções de germoplasma com genótipos de seleção local, introduzidos de outros países e derivados de cruzamentos controlados. Essas instituições tem desenvolvido pesquisa buscando identificar e selecionar novos genótipos de porta-enxertos mais adaptadas as condições ambientais do Rio grande do Sul e com resistência as principais pragas e doenças de solo que limitam a produtividade da cultura (Fachinello & Bianchi et al., 2005). Assim, estudos de caracterização da diversidade genética existente em bancos de germoplasma e coleções se fazem necessários, com o intuito de auxiliar no desenvolvimento de estratégias para a conservação dos acessos e também para auxiliar programas de melhoramento vegetal.

Os marcadores moleculares têm sido tradicionalmente utilizados para a caracterização de diversidade genética e identificação de porta-enxertos de *Prunus*. Dentre os marcadores moleculares, vários tipos têm sido empregados com sucesso para estudos de diversidade genética em espécies do gênero *Prunus* como: RAPD (Randomly Amplification Polymorphic DNA) (Bianchi et al., 2003; Cheng, 2007; Mayer et al., 2008; Ercisli et al., 2009; Sharma & Sharma, 2010; Nikoumanesh et al., 2011), RAMP (Random Amplified Microsatellite Polymorphism) (Cheng, 2001), SSR (Simple Sequence Repeat) (Bianchi et al., 2004a; Bianchi et al., 2004b; Bouhadida et al., 2009; Martín et al., 2011) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Bianchi et al., 2002; Xu et al., 2006; Wickert et al., 2007).

Dentre esses marcadores, os baseados em *loci* SSR se destacam por serem altamente polimórficos, pois sua composição e taxa de mutação são influenciadas pela variável tempo, possuem caráter co-dominante, comportamento seletivo neutro, herança mendeliana, podem estar geneticamente ligados a características quantitativas, além de não sofrerem influência das interações epistáticas e pleiotrópicas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Devido a estas características, os marcadores moleculares do tipo SSR são muito importantes para a análise de variabilidade e diversidade genética, quando comparados aos marcadores baseados em caracteres morfológicos que muitas vezes não são capazes de diferenciar determinadas cultivares de *Prunus*, principalmente quando se trata de *P. persica*, pois esta possui uma estreita base genética.

Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi caracterizar a variabilidade e a diversidade genética existente dentro dos diferentes grupos de acessos que compõem a coleção de porta-enxertos de *Prunus* pertencente a EMBRAPA Clima Temperado, elucidar a estrutura e analisar a relação genética existente entre os acessos e entre os grupos de acessos que compõem a coleção, com base no polimorfismo de *loci* SSR.

Material e métodos

Material vegetal

O material vegetal avaliado no presente estudo foi proveniente da "Coleção Porta-enxerto de *Prunus*", mantida em área experimental (condições de campo) na Sede da Embrapa Clima Temperado (Apêndice 1), sendo constituídos por 34 acessos de cultivares-copa, obtidas por seleção e coletas realizadas em propriedades rurais nos distritos de Pelotas e Morro Redondo (Figura 1), região sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil; 28 acessos de porta-enxertos introduzidos de outros países como EUA, França, Hungria, Itália, Japão e México; e 13 acessos de outras espécies do gênero *Prunus*. A lista dos acessos utilizados neste estudo e a sua origem está descrita na tabela 1.

Extração de DNA

O DNA genômico foi isolado utilizando o procedimento descrito Doyle & Doyle (1987) com modificações, conforme descrito a seguir: 150 mg de folhas jovens completamente expandidas foram maceradas em nitrogênio líquido, condicionadas em tubos Eppendorf estéreis de 1,5 ml e adicionando 750 µl de tampão de extração CTAB (100 mM de Tris-HCl, 1,4 M de NaCl, 20 mM de EDTA, 2% de CTAB, 1% de PVP, 0,5% de β-Mercaptoetanol). Após, as amostras foram incubadas a 65°C por 60 min, posteriormente adicionou-se igual volume de CIA 24:1 (Clorofórmio: Álcool Isoamílico) mantendo-as sob agitação por 10 min. e logo após centrifugadas a 12.000 g por igual período de tempo. A fase sobrenadante foi recuperada cuidadosamente e misturada com igual volume de isopropanol a -20°C, para a precipitação dos ácidos nucleicos. Seguindo desta etapa realizou-se lavagens do pellet com 2 mL de etanol 70% e 100% respectivamente, que após completamente seco foi diluído em 150 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8.0) contendo 0,5 µg mL⁻¹ de RNase e incubado a 37°C por 60 min. para a digestão do RNA.

A quantificação do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, com marcador de peso molecular de DNA do fago *Lambda* digerido com *Hind III* (Invitrogen®). O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado em equipamento fotodocumentador VilberLourmat® sob raios UVs (ultravioletas). Após as amostras foram padronizadas para a concentração 20 ng µl⁻¹ e armazenadas a temperatura de -20°C para o subsequente uso em amplificações por PCR (Polymerase Chain Reaction).

Amplificação de DNA

O DNA genômico isolado foi amplificado por PCR utilizando 17 pares ou conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para *loci* SSR da série BPPCT e UDP, cujas sequências e características estão descritas na tabela 2, e a posição nos grupos de ligação na figura 2.

A reação de PCR foi realizada com o volume final de 25 µl, contendo 2,5 µL de tampão 10X; 2 mM de MgCl₂; 125 µM de dNTPs; 0,125 µM de cada primer; 40 ng de DNA genômico; 1 unidade de Taq polimerase (Ludwig®) e água milli-Q estéril. A PCR foi realizada em termociclador Bio-Rad modelo ICycler®. O programa utilizado para amplificação das amostras foi de: 1 ciclo de 94°C por 5 min.; 35 ciclos de 94°C por 45 seg., temperatura de anelamento entre 58 a 60°C por 1 min., dependendo da característica de cada par de *primer*, 72°C por 2 min. e 30 seg.; 1 ciclo de 72°C por 10 min.

Os produtos de PCR foram desnaturados com 32% de SD [solução desnaturante (99% de formamida; 0,5% de EDTA 0,5M; 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xileno cianol)] à temperatura de 95°C por 5 min. e imediatamente condicionados em gelo. Destas amostras desnaturadas retirou-se 4,5 µL para aplicação em gel de poliacrilamida 5% com tampão TBE 1X (89 mM de Tris; 0,89 M de ácido bórico e 8 mM de EDTA pH 8,0). Para o controle do tamanho dos alelos foi aplicado 4,5 µL de marcadores de peso molecular Ladder de 50 e 100 pb da marca Ludwig®. A eletroforese foi conduzida em voltagem de 9 V cm⁻¹ por 2 horas e 30 min., e a revelação foi realizada com nitrato de prata conforme o protocolo descrito por Bassam et al. (1991).

Análise dos dados

Análise de géis e conversão de dados

Os perfis eletroforéticos dos géis de acrilamida foram fotografados e analisados de forma manual. A presença e a ausência de alelos para cada *locus* e acesso foram registradas em uma matriz de dados. Alelos nulos foram atribuídos aos acessos com produtos de amplificação não confirmados sob as condições normais de amplificação por PCR.

As análises foram conduzidas utilizando-se diferentes matrizes. Algumas matrizes foram construídas de forma manual e outras foram transformadas com o auxílio do software CONVERT Ver. 1.31 (Glaubitz, 2004), o qual converte uma matriz padrão para diferentes formatos de arquivos, para análises posteriores em softwares distintos.

As análises estatísticas foram conduzidas de forma conjunta e separadas na forma de grupos, de acordo com a classificação dos acessos que constituem a coleção de porta-enxertos de *Prunus* da Empresa Clima Temperado (Tabela 1). O detalhamento das análises moleculares está descrito a seguir.

Parâmetros de diversidade genética

As análises dos parâmetros de diversidade genética para cada *locus* e para todo o banco de germoplasma e cada grupo de acessos foram: número de alelos por *locus* (Na); número efetivo de alelos ($Ne = 1/1 - He$) (Hartl and Clark, 1989); frequência alélica; heterozigosidade esperada ($He = 1 - \sum p_i^2$, onde p_i é a frequência alélica na população i^{th} para cada *locus*); heterozigosidade observada (Ho) foi calculada a partir do número de acessos heterozigotos dividido pelo número total de acessos (Nei, 1973); índice de

fixação ou coeficiente de endogamia ($F = 1 - Ho/He$) (Wright, 1978); e o índice de informação de Shannon (Lewontin, 1972). Tais parâmetros foram calculados utilizando o software POPGENE Ver. 1.32 (Yeh et al., 1997).

O conteúdo de informação polimórfica [$PIC = 1 - \sum p_i^2 - \sum \sum 2p_i^2 p_j^2$] (Botstein et al., 1980), o qual determina a habilidade de um marcador discriminar dois acessos aleatoriamente foi estimado para cada locus com o software POWERMARKER Ver. 3.25 (Liu & Muse, 2005). O software IDENTITY Ver. 1.0 (Wagner & Sefc, 1999) foi empregado neste estudo para determinar a probabilidade de alelos nulos ($r = [He - Ho]/[1 + He]$) e a probabilidade de identidade [$Pi = 1 - \sum p_i^4 + \sum (2p_i p_j)^2$]. Para a probabilidade de identidade assume-se que dois genótipos tem a probabilidade de serem aleatoriamente idênticos baseado na observação da frequência alélica e na escolha de *locus* ao acaso (Paetkau et al., 1995).

Agrupamento dos acessos

A análise de relação genética entre os acessos foi conduzida pelo coeficiente Nei & Li (1979), posteriormente realizou-se a análise de agrupamento com o método de médias aritméticas UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sneath & Sokal, 1973), os resultados foram apresentados na forma de dendograma. O coeficiente de correlação cofenética foi calculado com o teste de Mantel (Mantel, 1967) utilizando 1000 permutações para avaliar o grau de confiabilidade entre a matriz de similaridade e os dados de agrupamento. As análises descritas acima foram conduzidas com o software NTSYS-PC Ver. 2.1 (Rohlf, 2000). A análise de bootstrap foi conduzida utilizando 1000 réplicas no software WINBOOT Ver. 1.0 (Yap & Nelson, 1996) para avaliar a robustez do dendograma.

A análise Eigen foi conduzida para a obtenção das coordenadas principais (PCoA). Os resultados da análise de coordenadas principais da diversidade genética da coleção de porta-enxertos de *Prunus* foram representados em gráfico tridimensional. As análises e a representação gráfica foram também realizadas no software NTSYS-PC Ver. 2.1 (Rohlf, 2000).

Agrupamento dos acessos baseado em abordagem Bayesiana

A estrutura genética da coleção de porta-enxertos foi elucidada com o emprego da abordagem Bayesiana de agrupamento do software STRUCTURE Ver. 2.3.1 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003). Os agrupamentos foram detectados com o emprego de um modelo de combinação, que utiliza a correlação das frequências alélicas entre os agrupamentos (K), e com o modelo de ancestralidade Admixture Model. A partir deste modelo foram computadas 10 réplicas para valores de K de 1 a 12 analisados por um período de gravação de 20^4 seguido de 20^5 interações. O número correto de agrupamentos (K) foi identificado com o auxílio do software on line STRUCTURE HARVESTER Ver. 0.6.92 (Earl & Von Holdt, 2012), o qual emprega o método estatístico de ΔK descrito por Evanno et al. (2005), com os valores de K de 1 a 12. As réplicas das análises de agrupamento dos valores de K selecionados foram posteriormente sumarizadas pelo software CLUMPP Ver. 1.1.2 (Jakobsson &

Rosenberg, 2007) com o algoritmo Greedy e Large K Greedy, utilizando 10^4 repetições em combinações aleatórias, objetivando identificar os valores comuns e combinar os resultados de agrupamentos das dez réplicas. Os resultados das combinações juntamente com os valores comuns de agrupamentos foram representados de forma gráfica através do software DISTRUCT Ver. 1.1 (Rosenberg, 2004).

Relação genética dentro e entre os grupos

A relação genética entre os grupos foi conduzida através das análises de distância genética (Nei, 1978), identidade genética (Nei, 1978) e análise descritiva do compartilhamento de alelos. As análises de distância genética e identidade genética foram calculadas no software POPGENE Ver. 1.32 (Yeh et al., 1997). A partir dos resultados de frequências alélicas obtidos pela análise dos parâmetros de diversidade genética, construiu-se um diagrama de Venn (Venn, 1880) para representar o número de alelos compartilhados entre grupos e exclusivos de grupos.

A análise de particionamento da variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) foi calculada para verificar a relação genética existente entre grupos, entre acessos dentro de grupos e entre os acessos da coleção de porta-enxertos. O teste de significância da análise de variância molecular foi conduzido com 1023 permutações calculadas com o software ARLEQUIN Ver. 3.1 (Excoffier, 2006).

Resultados

Análise conjunta da diversidade genética

Neste estudo foram empregados inicialmente 17 pares de primers alvos de *loci* SSR isolados a partir de pessegueiro (Tabela 2). Destes, dois deles (BPPCT008 e UDP96005) não permitiram a reprodução dos resultados e apresentaram amplificação inconsistente, enquanto que os outros 15 foram polimórficos, sendo estes utilizados para a análise dos 75 acessos da coleção de porta-enxerto de *Prunus*. A amplificação destes *loci* resultou na identificação de um ou dois alelos por acesso, sendo desta maneira, considerados como marcadores *unilocus*.

A avaliação dos 15 *loci* polimórficos revelou 171 alelos, variando de sete (BPPCT030 e UDP96019) a 18 (BPPCT002) e com média de 11,3 alelos por *locus*. O número de alelos efetivos apresentou média de 3,76 e total de 58,1 (33,97%). O índice de informação de Shannon dos *loci* variou de 0,92 (UDP96109) a 2,14 (UDP98025), com média de 1,58 e o total de 23,7. A probabilidade de alelos nulos apresentou valores variando entre 0,10 (UDP96008) a 0,31 (UDP98414), com a média de 0,23 alelos nulos por *locus*. Os resultados dos parâmetros de diversidade genética avaliados neste estudo estão apresentados na tabela 3 e 4.

A heterozigosidade esperada apresentou média de 0,69 com valores variando de 0,47 (UDP96019) a 0,83 (UDP96003). Em todos os *loci* avaliados a heterozigosidade observada apresentou valores inferiores aos da heterozigosidade esperada, com valores variando de 0,09 (UDP98411) a 0,47

(UDP96008). O parâmetro de índice de fixação de Wright, o qual mensura a deficiência ou excesso de heteroziguidade, apresentou-se com valores positivos e média de 0,58 por *locus*, indicando certo grau de deficiência de heteroziguidade. O máximo valor de conteúdo de informação polimórfica (PIC) detectado foi de 0,83 (UDP96003, UDP98025 e UDP98407), o mínimo de 0,52 (UDP96019) e média de 0,69. A máxima probabilidade de identidade (PD) (0,31) foi identificada para o *locus* que apresentou o menor número de alelos (UDP96019), e o melhor valor (0,04) para o *locus* (UDP96003) que apresentou o segundo maior valor de alelos observados (17 alelos). A probabilidade de identidade total dos *loci* avaliados foi de $9,5e^{-15}$.

O número total de alelos de baixa frequência ($f \leq 0,05$) detectados foi de 113, sendo que a frequência desses alelos por *locus* variou de 0,0296 (UDP96019) a 0,2392 (UDP96013), com média de 0,197 (Tabela 4). Além desse parâmetro, detectou-se 52 alelos únicos distribuídos pelos 15 *loci* em 24 diferentes acessos (Tabela 5). Os parâmetros de frequência de alelos normais ($f \geq 0,051$), raros e únicos estão representados de forma gráfica na figura 5, demonstrando o número de alelos por grupos, compartilhados entre grupos e únicos.

O segundo e terceiro maiores valores detectados nos parâmetros de heteroziguidade esperada (0,83 e 0,82) e índice de informação de Shannon (2,13 e 2,14), juntamente com o menor valor de probabilidade de identidade (0,04) apresentaram relação com o segundo e terceiro maiores valores do parâmetro de número de alelos observados (17 e 16) respectivamente para os *loci* UDP96003 e UDP98025.

Após a análise conjunta dos parâmetros de diversidade genética, os 75 acessos foram divididos em três grupos, visando fazer inferências sobre a variabilidade genética dentro de cada grupo e qual a contribuição para a diversidade genética total da coleção de porta-enxertos.

Variabilidade genética entre acessos coletados na região sul do Brasil

O primeiro grupo de acessos de porta-enxertos de *Prunus* da coleção é constituído por 34 acessos originários de coletas realizadas em diferentes pomares comerciais, com incidência da síndrome da morte precoce, dos distritos de Pelotas e Morro Redondo, região sul do Rio Grande do Sul-Brasil, e cultivares copas, os quais apresentam potencial de uso como porta-enxertos. Verificou-se uma alta variabilidade nas taxas de polimorfismo nos 15 *loci* SSR estudados. Foram detectados o total de 69 alelos, com valores variando de 2 (BPPCT024) a 7 (UDP96003 e UDP98411), com média de 4,5 alelos por *locus*. A média de alelos efetivos detectada foi de 2,28, com o mínimo de 1,13 (BPPCT034 e UDP98411) e máximo de 3,88 (UDP96003). O índice de informação de Shannon dos *loci* variou de 0,26 (BPPCT034 e UDP98412) a 1,53 (UDP98411), com média de 0,91. A probabilidade de alelos nulos apresentou valores variando entre 0,01 (UDP96008) a 0,24 (UDP98414), e média de 0,12 alelos nulos por *locus*.

A heteroziguidade esperada apresentou média de 0,49, enquanto que a heteroziguidade observada com média de 0,30. O parâmetro de índice de fixação de Wright apresentou valores positivos variando entre 0,07 (UDP96008) indicando alto coeficiente de endogamia, próximo a panmixia (0), a 1,0 (UDP98411) indicando alta taxa de deficiência de heteroziguidade, e média de 0,42.

O conteúdo de informação polimórfica dos *loci* apresentaram máximo de 0,70 (UDP96003), mínimo de 0,11 (BPPCT034 e UDP98411) e média de 0,43. A máxima probabilidade de identidade (0,80) foi identificada para o *locus* BPPCT034, e a mínima de 0,11 para UDP96003 e UDP98407, e o total de $1,19e^{-9}$.

Os maiores valores detectados no *locus* UDP96003 para os parâmetros de heterozigosidade esperada (0,74) e índice de informação de Shannon (1,49), juntamente com o menor valor observado para a probabilidade de identidade (0,11) estão relacionados com o maior número de alelos observados (7), assim como observado na análise conjunta dos 75 acessos.

A porcentagem de alelos de baixa frequência detectada dentro deste grupo foi de 48%, com frequências variando de zero (BPPCT024) a 0,08 (UDP98407) (Tabela 6 A).

Variabilidade genética entre acessos introduzidos no Brasil

O segundo grupo foi representado por 28 acessos de porta-enxertos introduzidos no Brasil (Tabela 1), o qual objetiva-se realizar avaliações diretas sob o seu potencial de uso nas condições brasileiras. Os 15 *loci* polimórficos avaliados permitiram distinguir todos os acessos, com exceção dos acessos Tsukuba-1, Tsukuba-2 e Tsukuba-3. O total de alelos identificados foi de 107 alelos, com média de sete alelos por *locus*, variando de três (BPPCT024) a 12 (UDP98407). O *locus* BPPCT024 foi o menos informativo para os seguintes parâmetros: número de alelos efetivos (2), índice de informação de Shannon (0,83), heterozigosidade esperada (0,50) e observada (0), e conteúdo de informação polimórfica (0,43), quando comparado aos outros *loci* avaliados. O número de alelos efetivos apresentou seu melhor valor com 5,19 alelos (UDP98407), apresentando média de 3,37 e total de 50,6 alelos efetivos neste grupo.

Com relação ao índice de informação de Shannon, os resultados variaram desde o valor observado no *locus* BPPCT024 a 1,96 observado no UDP98025. O índice de fixação de Wright apresentou valores variando de 0,33 (UDP96008) a 1 (BPPCT024), com média de 0,68. O valor máximo observado de índice de fixação de Wright observado no *locus* BPPCT024 indica uma deficiência em heterozigosidade. A probabilidade de alelos nulos variou de 0,11 (UDP96008) a 0,39 (UDP98414) apresentando média de 0,27.

O valor médio da heterozigosidade esperada foi de 0,68, enquanto que a média da heterozigosidade observada foi de 0,21, com variação desde zero (BPPCT024) a 0,39 (BPPCT002). Os *loci* UDP98025 e UDP98407 apresentaram os melhores valores para os parâmetros de conteúdo de informação polimórfica (0,78) e probabilidade de identidade (0,06) respectivamente, sendo que a probabilidade de identidade total foi de $1,35e^{-13}$.

A porcentagem de alelos de baixa frequência detectada dentro deste grupo foi de 43,92%, com valores de frequência alélica variando de zero (BPPCT024 e BPPCT030) a 0,2035 (UDP98025), com média de 0,08 (Tabela 6 B)

Diversidade genética entre acessos do grupo de outras espécies

O terceiro grupo, constituído por acessos de diversas espécies (Tabela 1), obteve-se total transfereabilidade para o *locus* BPPCT002, com amplificação de alelos em todos os acessos avaliados, enquanto que os demais pares de *primers* não foram totalmente transferíveis. O *locus* BPPCT002 além de ser transferível para todos os acessos do grupo de outras espécies deste estudo, apresentou os melhores valores para número de alelos observados (12); número de alelos efetivos (9,38); índice de informação de Shannon (2,34); heterozigosidade esperada (0,89); heterozigosidade observada (0,69); e probabilidade de identidade (0,02) que também compartilhou o mesmo valor (0,02) com outros dois *loci* (BPPCT034 e UDP96008). O número total de alelos detectados foi de 99, e os *loci* polimórficos apresentaram mínimo de 5 (BPPCT026, BPPCT030 e UDP98414), com média de 6,6 alelos por *locus*. Identificou-se um total de 70,9 alelos efetivos, com o mínimo observado no *locus* UDP96018 (12).

O índice de informação de Shannon apresentou valor médio de 1,52. Ambos os parâmetros de probabilidade de alelos nulos e índice de fixação de alelos de Wright apresentaram seus valores mínimos negativos para os mesmos *loci* (UDP96013 e UDP98414), os quais foram -0,15 e -0,03, respectivamente. O *locus* UDP96013 também apresentou o menor valor (0,02) para o parâmetro probabilidade de identidade, juntamente com os *loci* BPPCT034 e UDP96008.

O conteúdo de informação polimórfica apresentou média de 0,69, com índices variando de 0,52 (UDP96019) a 0,83(UDP96003, UDP98025 e UDP98411).

A heterozigosidade esperada apresentou média de 0,67, enquanto a observada foi de 0,43. O poder de discriminação apresentou o menor valor (0,68) para os *locus* UDP96018, com média de 0,67.

Os maiores valores detectados no *locus* BPPCT002 para os parâmetros de heterozigosidade esperada (0,89) e índice de informação de Shannon (2,34), juntamente com o menor valor observado para a probabilidade de identidade (0,02), estão relacionados com o maior número de alelos observados nesse *locus* (12). Esta relação também foi observada nos *loci* UDP96008 e BPPCT034.

A porcentagem de alelos de baixa frequência detectada dentro deste grupo foi de 17,17%, com valores de frequência variando de zero (BPPCT024, BPPCT026, BPPCT030, UDP96013, UDP96018, UDP96019, UDP98407, UDP98412 e UDP98414) a 0,2694 (BPPCT002) (Tabela 6 C).

Identificação de diferentes acessos

A combinação dos resultados dos diferentes *loci* SSR avaliados foi usada para distinguir os 75 acessos da coleção de porta-enxertos de *Prunus* avaliados neste estudo. A combinação dos resultados gerou 72 perfis genéticos únicos e três idênticos. Os acessos que não se diferenciaram pelos 15 *loci* avaliados foram os acessos Tsukuba-1, Tsukuba-2 e Tsukuba-3, do grupo de porta-enxertos introduzidos.

Relação genética entre acessos e estrutura genética

A elucidação da relação genética entre os acessos de porta-enxertos de *Prunus* está demonstrada na forma de um dendograma (Figura 3A), o qual foi obtido pelo algoritmo UPGMA a partir da matriz de distância genética de Nei & Li (1979), baseada no polimorfismo de 15 *loci*. O teste de Mantel foi empregado para verificar o grau de confiabilidade entre a matriz de distância e os dados de agrupamento, o que resultou no valor de 0,90 indicando uma ótima correlação. A partir da análise de agrupamento UPGMA foi possível constatar a alta taxa de diversidade genética existente dentro da coleção, com distância variando desde 0,01 a 1,00, com variação de até 99,99 entre acessos.

A abordagem Bayesiana foi empregada com todo o conjunto de *loci* para a identificação de pools alélicos. O teste do K verdadeiro baseado na estatística de delta (Δ) K descrita por Evanno et al. (2005) foi aplicado para identificar os melhores K s entre $K=4$ e $K=11$, revelando o valor de $K=5$ como sendo o melhor valor de agrupamentos (Figura 3B). O teste do K verdadeiro mostrou $K=5$, $K=7$ e $K=9$ como os melhores K s entre 5 e 11. O agrupamento Bayesiano de $K=5$ apresentou valor de ΔK de 8,81, $K=7$ com $\Delta K=1,82$ e $K=9$ $\Delta K=1,10$. O agrupamento de $K=3$ apresentou valor de $\Delta K=93,26$. A sumarização das 10 réplicas da abordagem Bayesiana para cada valor de K foi realizada com o software CLUMPP utilizando o algoritmo Greedy para $K=3$, $K=5$ e $K=7$, e Large K Greedy para $K=9$. Os diferentes algoritmos foram utilizados devido ao limite de recursos computacionais, pois as análises foram computadas em uma estação de trabalho com processador Intel® Xeon®, não havendo problema para computar os conjuntos de dados de $K=3$ e $K=5$, mas havendo para $K=9$. Dentre os valores de $K=7$ e $K=9$ optou-se pelo $K=9$, devido este apresentar a melhor similaridade média de pares permutados e por melhor discriminar em grupos os acessos. Os resultados das sumarizações estão representados graficamente na Figura 3B com os respectivos valores de similaridade média de pares permutados (H') para cada K .

A abordagem Bayesiana com valor de $K=3$ possibilitou a discriminação de três pools alélicos, identificados na Figura 3B como: 'a' abrangendo em sua maioria (acima de 90%) os acessos de porta-enxertos sul-brasileiros; 'b' abrangendo a maioria (89%) dos acessos de porta-enxertos introduzidos; e, 'c' abrangendo quase que totalmente (acima de 90%) os acessos de porta-enxertos de outras espécies de *Prunus*. Além destes três pools alélicos, foi possível inferir onze subagrupamentos em alta eficiência pelo valor de $K=9$ (Figura 3B). O valor de K verdadeiro, ou seja, $K=5$ não mostrou-se capaz de distinguir subagrupamentos no pool alélico 'a' e no pool alélico 'b', devido isso realizou-se inferências com um valor de K mais elevado ($K=9$). Verificou-se que os resultados da abordagem Bayesiana são suportados pelos resultados da análise clássica de agrupamentos baseada em dendograma gerado pelo método UPGMA.

A análise de coordenadas principais (PCoA) possibilitou verificar o grau de diversidade genética em dimensões. Os resultados obtidos pela análise de coordenadas principais revelou que a contribuição do PCo1 foi de 37,98%, PCo2= 7,31% e PCo3= 6,2%, e que o somatório das coordenadas principais representam 51,5%, sendo PCo1 a coordenada que mais representa a diversidade genética de acessos da coleção de porta-enxertos de *Prunus*, conforme pode ser verificado na representação gráfica tridimensional na figura 4.

Relação genética entre grupos

Análise descritiva

A análise conjunta dos grupos de acessos de porta-enxertos apresentou o total de 171 alelos sob diferentes frequências, como mencionado anteriormente. Cada grupo de acessos apresentou o mínimo de 69 alelos, no entanto nem todos os alelos são exclusivos de um único grupo, e estes são os que estabelecem uma relação genética direta entre dois ou os três grupos (Figura 5A).

O grupo sul-brasileiro apresentou 69 diferentes alelos, sendo apenas sete exclusivos deste grupo. O grupo de acessos de porta-enxertos introduzidos apresentou o total de 107 alelos, compartilhando 26 alelos com o grupo sul-brasileiro e 39 exclusivos deste grupo. No grupo de outras espécies, este apresentou 99 alelos, sendo 51 exclusivos, 12 compartilhados com o grupo internacional e 6 com o sul-brasileiro. Os três grupos compartilharam 30 alelos entre si.

Como mencionado acima, os diferentes alelos foram detectados em diferentes frequências. Alelos de baixa frequência ($f \leq 0,05$) considerados como alelos raros, também foram detectados em comum entre grupos e com exclusividade (Figura 5B). O grupo sul-brasileiro apresentou 21 alelos de baixa frequência, sendo que cinco foram únicos e exclusivos para este grupo. Os porta-enxertos introduzidos apresentaram 55 alelos de baixa frequência com 36 exclusivos, 22 únicos, oito compartilhados com o grupo sul-brasileiro e sete com outras espécies. No grupo de outras espécies, este apresentou 65 alelos de baixa frequência, destes 50 foram exclusivos, 25 únicos distribuídos por 23 acessos, e quatro compartilhados com o grupo sul-brasileiro. Quatro alelos de baixa frequência foram comuns aos três grupos. O grupo de outras espécies apresentou o maior número de alelos de baixa frequência e únicos, característica que está relacionada ao grupo ser composto por poucos acessos com uma alta diversidade de alelos quando comparado com os outros dois grupos.

Parâmetros de relação genética de Nei e análise de variância molecular

A análise dos parâmetros de diversidade genética de Nei (1978) (distância e identidade genética), e a análise de variância molecular foram utilizadas para verificar de forma mais concisa a relação genética existente entre os grupos, entre os acessos dentro de grupos e dentre os acessos do banco de germoplasma.

A partir da análise de distância genética entre os grupos, verificou-se a menor distância existente entre o grupo de acessos sul-brasileiros e o grupo de introduzidos. A mesma relação foi encontrada para o parâmetro de identidade genética.

A análise de variância molecular apresentou moderada significância no particionamento da variação genética entre os grupos porta-enxerto de *Prunus*, com valor de $F_{ST} = 0,23$. O coeficiente de endogamia (F_{IS}) e o coeficiente de endogamia total (F_{IT}) foram 0,46 e 0,58, respectivamente (Figura 6). Alta variação molecular (41,76%) foi detectada entre o conjunto total de acessos do banco de

germoplasma. A variação molecular remanescente foi distribuída entre acessos dentro de grupos (35,83%) e entre os grupos (22,41%), conforme detalhado na tabela 8.

A diferenciação dos grupos pelo coeficiente de endogamia (Figura 6) apresentou os seguintes resultados: grupo de acessos de porta-enxertos sul-brasileiro= 0,31, grupo de acessos de porta-enxertos introduzidos= 0,61, e o grupo de acessos de porta-enxertos de outras espécies= 0,39. O grupo de porta-enxertos introduzidos apresenta a maior contribuição para a diversidade genética do banco de germoplasma. Entretanto estes valores são para todo o grupo, e cada grupo não é constituído pelo mesmo número de acessos, devido isso foi calculado o coeficiente de endogamia médio por acesso dos três diferentes grupos (Figura 8). Os valores médios por acesso de cada grupo foram: grupo acessos de porta-enxertos sul-brasileiro= 0,009, grupo de acessos de porta-enxertos introduzidos= 0,022, e o grupo de acessos de porta-enxertos de outras espécies= 0,030. Com isso, verificou-se que os acessos do grupo de outras espécies apresentaram os maiores valores médios por acesso, contrariamente ao índice total de endogamia de grupo, o qual indicou o grupo de acessos introduzidos como o grupo que mais contribui para a diversidade genética da coleção. Neste mesmo contexto, porém agora para o parâmetro do índice de informação de diversidade genética de Shannon médio por *locus* (Figura 9), o grupo de acessos de porta-enxertos de outras espécies também apresenta os maiores valores, indicando a maior diversidade genética existente neste grupo.

Discussão

Polimorfismo de loci SSR

Os resultados obtidos neste estudo mostram que os marcadores SSR podem efetivamente serem empregados para análises de diversidade e estrutura genética de bancos de germoplasmas de porta-enxertos de *Prunus*, corroborando com resultados obtidos por diversos autores, que têm empregado esta técnica para a caracterização de genótipos de *Prunus* (Bianchi et al., 2004a; Bouhadida et al., 2009; Turkoglu et al., 2010; Cheng et al., 2011). Os 15 *loci* SSR analisados neste estudo apresentaram polimorfismo sob diferentes taxas e geraram 72 perfis genéticos únicos dos 75 analisados, os quais possibilitaram elucidar a estrutura genética da coleção.

A análise conjunta dos acessos identificou o total de 171 alelos sob diferentes frequências, com média de 2,28 alelos por acesso e 11,3 alelos por locus, indicando uma alta taxa de diversidade genética existente dentro da coleção de porta enxertos de *Prunus*. Essa taxa de diversidade pode ser considerada ótima, pois quanto maior a diversidade e a variabilidade genética da coleção de porta-enxertos, maiores são as possibilidades de desenvolvimento de novas variedades com características de interesses agronômicos.

O grupo de acessos de porta-enxerto sul-brasileiro apresentou 34 perfis genéticos únicos com média de 4,46 alelos por locus em todo o grupo, sendo este considerado como de baixa variabilidade genética quando comparado com a média de alelos por locus dos outros grupos, 7,13 alelos por locus no grupo de porta-enxertos introduzidos e 6,6 no de outras espécies, ou ainda com a distância genética da

análise conjunta. Bianchi et al. (2004b) identificaram o total de 56 alelos com média de 4,3 alelos por *locus* identificados na análise de 13 *loci* SSR em 36 genótipos de pessegueiros e nectarineiras do sul do Brasil. Além disto, o mesmo autor detectou uma baixa similaridade existente entre os genótipos de pessegueiro tipo indústria. Este grupo de acessos (sul-brasileiros) foi o único que apresentou *locus* avaliado (UDP96008) com alto coeficiente de endogamia pelo parâmetro índice de fixação de Wright (0,04), mostrando-se com valor próximo a panmixia (0). Resultado este que pode estar relacionado ao fato de que grande parte dos acessos deste grupo apresentarem parentais comuns (Bianchi et al., 2004b). No entanto este valor não apresenta relação direta com a heterozigosidade observada, pois esta foi de 51%, estando acima da média por *locus*.

O grupo de acessos de porta-enxertos introduzidos apresentou 25 perfis genéticos únicos de um total de 28 perfis. Este resultado é explicado pela não diferenciação dos acessos Tsukuba-1, Tsukuba-2 e Tsukuba-3, que não apresentaram polimorfismo nos 15 *loci* analisados. Os diferentes genótipos de Tsukubas por serem idênticos pelos *loci* SSR avaliados neste estudo e por receberem nomes similares, provavelmente sejam originários de uma mesma população tratando-se de genótipos irmãos, porém não foi encontrado referencia na literatura para validar esta hipótese. Entretanto, a análise baseada no nível morfológico (Artigo 1 da dissertação) possibilitou a diferenciação destes acessos. Este grupo apresentou média de sete alelos por *locus*, sendo considerando como de alta variabilidade genética, pois quando comparado com o grupo de acessos de porta-enxertos sul-brasileiros, este grupo apresenta uma porcentagem de diversidade alélica 35,72% maior que o grupo sul-brasileiro. Zhebentyayeva et al. (2003) avaliando 12 *loci* SSR em 74 cultivares de damasco detectou 7,64 alelos por *locus*, considerando como de alta variabilidade genética, resultados esse que é muito similar ao obtido no presente estudo.

O terceiro grupo, o qual é constituído por acessos de porta-enxertos de outras espécies apresentou perfis genéticos únicos com transfereabilidade média de 8,5 acessos por *locus*. Foram detectadas ampliações em 64,61% dos acessos, com 13 *loci* polimórficos. O parâmetro de probabilidade de alelos nulos deste grupo de acessos apresentou o mesmo valor que o grupo de acessos sul-brasileiros, entretanto o grupo sul-brasileiro não apresentou alelos nulos, ao contrário do grupo de outras espécies que apresentou um número alto destes alelos. A justificativa deste resultado é que este parâmetro é apenas uma probabilidade de ocorrência, não mostrando-se efetivo em nosso estudo, pois tratando-se de probabilidade, este índice não pode gerar valores negativos. A transfereabilidade de marcadores SSR através de espécies de *Prunus* tem sido relatada com eficiência por alguns autores (Wünsch, 2009; Mnejja et al., 2010). O conjunto de *primers* para os *loci* BPPCT002 e BPPCT026 também foram identificados como transferíveis simultaneamente em diferentes espécies de *Prunus* por Wünsch (2009), entretanto, a transfereabilidade nem sempre ocorre para alguns genótipos de espécies do mesmo gênero, devendo isso a baixa relação genética.

A classe de marcadores SSR adquire grande importância em espécies que apresentam baixo ou nenhum número destes marcadores identificados em seu genoma. Estas espécies com baixo número de marcadores SSR identificados, ou seja, com defasagem em pesquisas na área de genômica e genético-molecular são comumente denominadas de espécies órfãs (Varshney et al., 2009). Para estas, existe a possibilidade de transferência de marcadores a partir de espécies estreitamente relacionadas com esta, adquirindo desta maneira, grande importância em estudos de mapeamento e caracterização genética.

Além da transfereabilidade de marcadores entre espécies, alguns autores tem relatado sintenia entre espécies de *Prunus* (Jung et al., 2009) e com espécies de outros gêneros ou famílias (Jung et al., 2009; Vilanova et al., 2008).

Agrupamento e estrutura genética

Neste estudo empregou-se dois métodos de agrupamento para classificar os acessos de porta-enxertos de *Prunus*, o tradicional método hierárquico baseado em dendograma e o não hierárquico de abordagem Bayesiana. A abordagem Bayesiana tem sido eficientemente utilizada para inferir agrupamentos e para a elucidação da estrutura genética de populações em espécies vegetais do gênero *Prunus* (Martín et al., 2011; Aranzana et al., 2010; Bourguiba et al., 2010) e em espécies de outros gêneros (Sun et al., 2012; Asfaw et al., 2009). Embora a população em estudo não esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg, este modelo leva em consideração este equilíbrio para inferir a estrutura genética e classificar os acessos em subpopulações, sendo que indivíduos que se apresentam em desequilíbrio, estes agrupam-se juntamente em valores de K baixos, com baixa diferenciação, como a observada neste estudo. O modelo Bayesiano foi empregado juntamente com a análise hierárquica para agrupar os acessos deste estudo em diferentes pools alélicos. Com o valor de $K=3$ foi possível diferenciar o banco de germoplasma em três diferentes pools, os quais são referentes em alta relação genética (em torno de 90%) com os diferentes grupos que compõem a coleção de porta-enxerto. Destes três grupos, dois são (“a” e “b”) de acessos constituintes da subfamília *Amygdalus* e o terceiro da *Prunophora*. Assim, a abordagem Bayesiana juntamente com a hierárquica mostraram-se eficientes para o agrupamento de acessos em diferentes subfamílias.

O pool alélico “a” identificado pela abordagem Bayesiana conjuntamente com a análise de agrupamento hierárquica UPGMA, abrangeu 91,17% dos porta-enxertos provenientes de coletas realizadas em produtores rurais no sul do estado do Rio Grande do Sul e de cultivares-copa brasileiras, com exceção dos acessos I-93-21, I-93-20 e Deguia. Estes acessos provenientes de coletas constituem 55,88% dos acessos deste pool alélico, e os mesmos acessos são caracterizados por não terem sua identidade genética comprovada.

A falta de identidade genética entre os porta-enxertos do sul do Brasil é devido aos viveiristas e alguns piscicultores obterem tradicionalmente suas mudas pela enxertia de borbulhas de cultivar copa específica sobre plantas oriundas de caroços provenientes das agroindústrias locais, o que consequentemente não garante a idoneidade genética de seus porta-enxertos (Tofanelli et al., 2001; Pereira & Mayer, 2005). No entanto, parte destes porta-enxertos de origem agroindustrial tem em sua genealogia a cultivar Aldrighi e/ou Capdeboscq (Bianchi et al., 2004b), sendo este relato suportado aqui pela abordagem Bayesiana conjuntamente com a alta similaridade genética existente para parte dos acessos de porta-enxertos coletados em diferentes produtores rurais, entre alguns outros acessos, como Tardio e Turquesa. Os acessos coletados em pomares de produtores do distrito de Pelotas e região, de identidade desconhecida, juntamente com Tardio e Turquesa, representam 32,35% dos acessos do grupo de porta-enxertos sul-brasileiros que possuem similaridade genética de até 0,65 com os acessos

Capdeboscq e Aldrighi. Além destes acessos, WFM-ESM-07-02 apresentou alta similaridade genética (0,94) com o acesso Farrapos.

As duas cultivares, Aldrighi e Capdeboscq, são provenientes de seleção e melhoramento genético, respectivamente. A cultivar Aldrighi é uma seleção realizada por um persicultor de sobrenome Aldrighi na década de 1940, no município de Pelotas, a qual é provavelmente originária de pêssegos provenientes da Argentina. Este genótipo juntamente com cerca de 200 genótipos introduzidos em meados da década de 1950 constituíram o material genético básico para o início dos programas de melhoramento no sul do Brasil (Raseira et al., 2008). Aldrighi e Capdeboscq foram amplamente utilizadas no passado como porta-enxertos, devido à abundância e disponibilidade de suas sementes nas indústrias processadoras e por apresentarem boa adaptação às condições edafoclimáticas estado do Rio Grande do Sul. Atualmente o uso destas duas cultivares como porta-enxerto é raro e se restringe a pequenos agricultores que possuem estas plantas em seus quintais.

Para a melhor elucidação da genealogia dos outros acessos coletados que não possuem identidade genética, faz-se necessário o emprego de mais genótipos conhecidos para aumentar a eficiência de identificação destes acessos com identidades genéticas desconhecidas.

O segundo pool alélico (b) abrangeu 89,28% dos porta-enxertos internacionais, com exceção dos acessos Rosafior (grupo sul-brasileiro), *Prunus persica* (grupo sul-brasileiro), *Prunus kansuensis* (grupo outras espécies) e Piaquito (grupo sul-brasileiro). Os porta-enxertos de folhas avermelhadas formaram dois subgrupos diferentes. Isto pode estar relacionado à alta diversidade genética de acessos existente dentro da coleção. O acesso Tsukuba-2 CPACT distinguiu-se dos demais acessos de Tsukubas, sendo que os Tsukubas 1, 2 e 3 não se distinguiram pelos *loci* avaliados neste estudo. A variação genética que o acesso Tsukuba-2 CPACT apresentou em relação aos demais Tsukubas pode estar relacionado ao Tsukuba-2 CPACT ter sido originado de uma população de seedlings obtidas por polinização livre.

Os acessos Nemaguard, GxN9 e Nemared agruparam-se juntos. A similaridade genética entre Nemared e GxN9 foi de 0,56, e Nemared e Nemaguard foi de 0,38. Relação genética esta que era esperada, pois segundo Ramming & Tanner (1983), Nemared é derivado de Nemaguard, e GxN9 é um cruzamento entre Garfi (*Prunus amygdalus*) e Nemared (*Prunus persica*). Bouhadida et al. (2009) e Bianchi et al. (2004a) utilizando marcadores SSR encontraram boa similaridade genética entre Nemaguard e Nemared, demonstrando desta maneira que a avaliação de diferentes *loci* SSR permite a eficiente elucidação da relação genética existente entre genótipos do gênero *Prunus*. A similaridade observada entre Cadaman e Barrier com GF 677 foi de 0,40, valor similar ao encontrado por Bouhadida et al. (2009), cujo valor encontrado foi de 0,32.

Além disso, este grupo também é constituído por acessos que não possuem identidade genética conhecida. Estes acessos tem seu nome iniciado pela letra 'I' de introduções. Alguns destes acessos possuem alta similaridade genética com acessos conhecidos, porém há outros acessos que não possuem relação genética satisfatória, devido isso é necessário o emprego de mais genótipos com identidade genética conhecida para a eficiente elucidação de suas relações genealógicas.

O terceiro pool alélico (c) abrangeu 92,3% dos acessos de outras espécies, com exceção de *Prunus kansuensis*, como mencionado acima. Este acesso é morfologicamente similar ao pessegueiro e é considerado como pessegueiro selvagem por alguns pesquisadores (Cao et al., 2011a; Cao et al., 2011b).

Esta espécie tem sido empregada em programas de melhoramento de porta-enxertos e estudos de fisiologia vegetal, realizados por alguns pesquisadores como Goffreda et al. (1991) e Marino (1988). Além disso, um estudo recente de mapeamento genético conduzido por Cao et al. (2011b), conseguiram identificar marcadores de genes análogos de resistência (RGA) para nematóides das galhas (*Meloidogyne incognita*), praga de solo que possui grande importância em diversas culturas e em diversas regiões do mundo, inclusive no sul do Brasil.

As ameixeiras agruparam-se em um mesmo subagrupamento neste estudo, com similaridade genética mínima de 0,32 e máxima de 0,29. Resultado similar em relação a similaridade genética de ameixeiras foi encontrado por Bianchi et al. (2003) em estudo o qual utilizou marcadores RAPD e obteve similaridade genética de 0,31 entre os acessos Santa Rosa e Mirabolano 29C, valor este que é próximo ao detectado nesse estudo utilizando-se marcadores SSR.

Os resultados do agrupamento Bayesiano de acessos de determinados grupos estarem inserido dentro de outro é devido a esses acessos terem maior relação genética com outro pool alélico. Em estudo conduzido por Bourguiba et al. (2010), os autores conseguiram distinguir eficientemente pelo uso da abordagem Bayesiana as populações de damasqueiro propagadas vegetativamente e por sementes, com valor de $K=2$. A abordagem Bayesiana também foi conduzida neste estudo com os valores de $K=5$ e $K=9$, sendo que o valor de $K=5$ não possibilitou a efetiva diferenciação de subagrupamentos no pool alélico 'a' e no pool alélico 'c', com isso houve a necessidade do uso de um valor de K mais alto. O $K=9$ mostrou-se eficiente para diferenciar os pools alélicos 'a' e 'c' em diferentes subgrupos, corroborando com os resultados obtidos pelo dendograma UPGMA.

Da mesma forma, como verificado pela abordagem Bayesiana, a análise de coordenadas principais também suportam parcialmente os resultados obtidos pela análise hierárquica, para a detecção dos três diferentes pools alélicos. Os resultados da análise de coordenadas principais mostram que 51,5% da diversidade genética da coleção de porta-enxertos de *Prunus* é representada pelos três primeiros componentes principais, sendo que, a alta representação da diversidade (>70%) é detectada além da terceira dimensão. Dimensões estas que não são bem elucidadas, e devido a isso os estudos de relação genética existente entre indivíduos se restringe à terceira dimensão.

Relação genética entre grupos de acessos

Análise descritiva

A relação genética a partir do número de alelos compartilhados entre os grupos foi de 60,81% do total de alelos. Esta porcentagem representa 104 alelos identificados sob diferentes frequências compartilhados entre dois grupos ou entre os três grupos. O maior compartilhamento de alelos entre dois grupos ocorreu entre o grupo de porta-enxertos sul-brasileiros (pessegueiros) e o grupo de introduzidos (pessegueiros e híbridos), valor este que era esperado, pois ambos os grupos possuem em sua genealogia algum genótipo de *Prunus persica*, o que contribui para a maior relação genética destes dois grupos dentro do banco de germoplasma (Tabela 1). O menor compartilhamento de alelos ocorreu entre o grupo

de acessos de porta-enxertos sul-brasileiros (*Prunus persica*) com o grupo de outras espécies (*Prunus* spp. exceto *P. persica*), característica esta que também está relacionada com a genealogia de cada grupo, justificada aqui pelo fato de se tratarem de grupos sem relação genética entre espécies. Esta relação genética está relacionada apenas com o gênero dos diferentes acessos que constituem cada um dos grupos. Entretanto, foi detectada uma relação genética global entre os três grupos, a qual foi de 17,54% (30 alelos) do total de alelos observados. A relação genética existente entre espécies de *Prunus* tem sido relatada por diversos autores (Mnejja et al., 2010; Wünsch, 2008; Turkoglu et al., 2010; Aradhya et al., 2004) e mostrou-se neste estudo com uma significativa taxa de transfereabilidade de marcadores moleculares SSR através das espécies analisadas neste estudo.

A detecção de alta porcentagem de alelos de baixa frequência é diretamente relacionada à diversidade genética do germoplasma em estudo, pois quanto maior a diversidade genética de espécies maior será a detecção de diferentes alelos sob frequências distintas. Desta maneira, a detecção do maior número de alelos de baixa frequência no grupo de outras espécies deste estudo é justificada por este fato. Os acessos do grupo de porta-enxertos sul-brasileiros apresentaram a maior similaridade genética, assim logo esperava-se uma menor identificação destes alelos de baixa frequência neste grupo, como a que foi observada. A manutenção destes alelos bem como pelo menos um de cada alelo compartilhado por dois ou pelos três grupos faz-se essencial para a disponibilidade de recursos genéticos para programas de melhoramento.

Parâmetros de relação genética de Nei e análise de variância molecular

As análises de distância e identidade genética mostraram os melhores valores entre os grupos de acessos de porta-enxertos sul-brasileiros e introduzidos. Resultados estes que estão relacionados à genealogia de ambos os grupos, como mencionado anteriormente. A menor distância observada entre estes dois grupos de acessos de porta-enxertos é devido a ambos os grupos serem constituídos por acessos da espécie *P. persica* (grupo de acessos sul-brasileiros) ou híbridos que possuam esta mesma espécie em sua genealogia (grupo de acessos introduzidos).

A análise de particionamento da variância genética, a AMOVA, teve como finalidade ser concisa na elucidação da taxa de contribuição de diversidade dos grupos e dos acessos para a diversidade genética total da coleção de porta-enxertos de *Prunus*. Esta análise detectou de forma eficiente a taxa de contribuição dos grupos para a diversidade do banco, mostrando que proporcionalmente quem mais contribui é o grupo de outras espécies. Com base na diversidade de características morfológicas (Artigo 1 da dissertação), as maiores diferenças de características são detectadas entre as espécies ou entre acessos híbridos que não possuem em sua constituição genealógica a espécie *Prunus persica*. Assim, a maior diversidade de características genéticas ao nível morfológico (Artigo 1 da dissertação) e ao nível molecular ocorreram entre as diferentes espécies da coleção de porta-enxertos deste estudo.

Estratégias de conservação e diversidade genética da coleção de porta-enxertos de *Prunus*

Os resultados obtidos neste estudo mostram que há uma alta diversidade alélica dentro e entre os diferentes grupos que constituem a coleção de porta-enxertos de *Prunus*. A conservação desta alta diversidade alélica faz-se necessária, pois é uma fonte de recursos genéticos para programas de melhoramento genético vegetal. Entretanto, quanto maior o número de acessos a ser mantido em conservação, maior será os custos financeiros e a dedicação para manter a coleção de germoplasma. Neste contexto, os alelos que são compartilhados entre os grupos podem ser representados por um ou poucos acessos da coleção, o que possibilita desta maneira excluir acessos que apresentam perfis genéticos idênticos a outros acessos, reduzindo assim os custos de manutenção do germoplasma.

A diversidade genética desta coleção pode ser aumentada com a introdução de genótipos de pessegueiro de diferentes regiões do mundo, abrangendo outras espécies, selvagens ou domesticadas. O aumento da diversidade genética a partir de diferentes regiões edafoclimáticas do mundo poderá facilitar a obtenção ou seleção de genótipos bem adaptados às condições de solo e clima do sul do Brasil. No contexto de patogenicidade, o estudo de ecogeografia desenvolvido por Toval & Vega (1988), no qual estudaram a adaptação de espécies relativamente selvagens em altas altitudes, revelaram maior resistência a pestes quando comparadas com variedades comerciais que são tradicionalmente cultivadas em baixas altitudes (< 600m), as quais foram mais sensíveis ao ataque de patógenos. No entanto, alguns dos acessos da coleção são tradicionalmente utilizados em programas de melhoramento como fontes conhecidas de resistência a pragas e doenças, a exemplo disto temos os acessos Tsukubas, Okinawa e Flordaguard como resistentes a nematoides, *Meloidogynes* spp.

Assim, a caracterização genética pelo uso de marcadores moleculares além de ser rápida e de baixo custo é eficiente para a elucidação da diversidade existente em germoplasmas. A eficiência desta técnica deve-se ao fato de não sofrer influência do meio ambiente, ao contrário da caracterização morfológica. Assim, o presente estudo é o segundo de uma sequência de três artigos, os quais têm por objetivo elucidar de maneira eficiente a relação genética existente entre os acessos, e a estrutura da coleção de porta-enxertos de *Prunus* deste estudo. O artigo posterior a este possibilitará alcançar estes objetivos de forma mais eficiente, pois tratará da sumarização dos resultados dos dois primeiros artigos, este e o anterior, o que possibilitará selecionar com maior precisão, acessos com características de interesse agrônomo para cruzamentos posteriores.

Conclusões

A coleção de porta-enxertos de *Prunus* avaliada neste estudo, apresenta uma alta diversidade genética, no entanto a variabilidade existente no grupo sul-brasileiro é baixa, sendo que a composição alélica pode ser representada por poucos acessos, possibilitando desta maneira reduzir o número de acessos da coleção. A abordagem Bayesiana juntamente com a hierárquica foram eficientes para detectar três pools alélicos, os quais apresentam alta relação com os grupos que compõem a coleção, sendo que

dois destes grupos são integrantes da subfamília *Amygdalus* e o terceiro da *Prunophora*. O maior particionamento de variância foi detectado entre os acessos (F_{ST}), o que corrobora com o relatado acima. Através da abordagem Bayesiana e da hierárquica foi possível inferir a relação genética entre acessos de genealogia conhecida com acessos coletados que não possuem genealogia conhecida. Assim, os *loci* podem ser empregados para caracterização de genótipos do gênero *Prunus*, e inferir sobre a genealogia de acessos desconhecidos, além de possibilitar inferir sobre a estrutura genética de populações de espécie distintas deste gênero.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Genômica e Fitomelhoramento da UFPEL por ceder uso aos seus computadores para as análises do software CLUMPP. Este trabalho foi realizado com verbas provenientes do Macroprograma 2, processo 02.08.06.003.00.00 da EMBRAPA, projeto Universal CNPq edital 2010/ proc. 482386-2010-0, FAPERGS - Pq. Proc. 1012710 e a CAPES pela concessão da bolsa mestrado.

Referências bibliográficas

- Aradhya, MK; Weeks, C; Simon, CJ. 2004. Molecular characterization of variability and relationships among seven cultivated and selected wild species of *Prunus* l. using amplified fragment length polymorphism. *Scientia Horticulturae*, 103: 131–144
- Aranzana, MJ; Abbassi, El-Kadri; Howad, W; Arús, P. 2010. Genetic variation, population Structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. *BMC Genetics* 11:69.
- Asfaw, A; Blair, MW; Almekinders, C. 2009. Genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from the East African highlands. *Theoretical and Applied Genetics* 120:1-12.
- Bassam, BJ; Caetano-Anollés, G; Gresshoff, P. M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochemistry*, v.196, p.80-83.
- Bernhard, R. & Grasselly C. 1981. Les pêchers x amandiers. *L'Arboriculture Fruitière* 328: 37-42.
- Bianchi, VJ; Fachinello, JC; Schuch, MW. 2003. RAPD's na caracterização genético-molecular e no estudo da variabilidade genética de cultivares de ameixeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 25, n. 2, p. 272-274.
- Bianchi, VJ; Fachinello, JC; Sansavini, S. 2004a. Microsatellite markers for identification of *Prunus* spp. rootstocks. *Scientia Agricola*, v.61, n.3, p.303-306.
- Bianchi, VJ; Fachinello, JC; Schuch, MW; Sansavini, S. 2004b. Caracterização molecular de cultivares de pessegueiro e nectarineira com microssatélites. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 26, n. 3, p. 490-493.
- Bianchi, VJ; Venturi, S; Fachinello, JC; Tartarini, S; Sansavini, 2002. S. I marcatori AFLP e SSR, risolutivi nella identificazione genética delle varietà di susino. *Frutticoltura (Bologna)*, Bologna, v. 64, n. 4, p. 83-87.
- Botstein, D; White, RL; Skolnick, M; Davis, RW. 1980. Construction of a genetic linkage in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32: 314-331.
- Bouhadida, M; Casas, AM; Gonzalo, MJ; Arús, P; Moreno, MA; Gogorcena, Y. 2009. Molecular characterization and genetic diversity of *Prunus* rootstocks. *Scientia Horticulturae*, n. 120, p. 237-245.

Bourguiba, H; Khadari, B; Krichen, L; Trifi-Farah, N; Santoni, S; Audergon, Jean-Mare. 2010. Grafting versus seed propagated apricot populations: two main gene pools in Tunisia evidenced by SSR markers and model-based Bayesian clustering. *Genetica* 138: 1023-1032.

Cao, K; Wang, L; Zhu, G; Fang, W; Chen, C. 2011a. Isolation, characterization and phylogenetic analysis of resistance gene analogues in a wild species of peach (*Prunus kansuensis*). *Canadian Journal of Plant Science*, 91: 961-970.

Cao, K; Wang, L; Zhu, G; Fang, W; Chen, C; Zhao, P. 2011b. Construction of a Linkage Map and Identification of Resistance Gene Analog Markers for Root-knot Nematodes in Wild Peach, *Prunus kansuensis*. *Journal of the American society for Horticultural Science*, Vol. 136, n. 3, p. 190-197.

Cipriani, G; Lot, G; Huang, WG; Marrazzo, MT; Peterlunger, E; Testolin, R. 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterization and cross-species application in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, n.99, p.65-72.

Cheng, HY; Yang, WC; Hsiao, JY; 2001. Genetic diversity and relationship among peach cultivars based on Random Amplified Microsatellite Polymorphism (RAMP). *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, n.42, p. 201-206.

Cheng, Z. 2007. Genetic characterization of different demes in *Prunus persica* revealed by RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, n.111, p. 242-247.

Cheng, Z; Gasic, K; Wang, Z; Chen, X. 2011. Genetic Diversity and Genetic Structure in Natural Populations of *Prunus davidiana* Germplasm by SSR Markers. *Journal of Agricultural Science*, Vol. 3, No. 4, pag. 113:125.

De Salvador, FR, Liverani A; Fideghelli C, 1991. La scelta dei portinnesti delle piantearboree da frutto: Pesco. *L'Informatore Agrario*, supplemento, 36: 43-50.

Dirlewanger, E; Cosson, P; Tavaud, M; Aranzana, MJ; Poizat, C; Zanetto, A; Arús, P; Laigret, F. 2002. 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.

Dirlewanger, E; Cosson, P; Howad, W; Capdeville, G; Bosselut, N; Claverie, M; Voisin, R; Poizat, C; Lafargue, B; Baron, O; Laigret, F; Kleinhentz, M; Arús, P; Esmenjaud, D. 2004. Microsatellite genetic linkage maps of myrabolan plum and an almond-peach hybrid-location of root-knot nematode resistance genes. *Theoretical and Applied Genetics*, v.109, p.827-838.

Doyle, JJ; Doyle, JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, v. 19, p. 11-15.

Earl, Dent A. and von Holdt, Bridgett M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.

Edin, M & GARCIN, A. 1994. Un nouveau porte-greffe dupê cher Cadaman® Avimag. *L'Arboriculture Fruitière* 475: 20-23.

Ercisli, S; Agar, G; Yildirim, N; Esitken, A; Orhan, E. 2009. Identification of apricot cultivars in Turkey (*Prunus armeniaca* L.) using RAPD markers. *Romanian Biotechnological Letters*, Vol. 14, No. 4, p. 4582-4588.

Evanno, G; Regnaut, S; Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14:2611-2620.

Excoffier, L; Laval, G; Schneider, S. 2006. Arlequin version 3.01: an integrated software package for population genetics data analysis. Bern: University of Bern, zoological institute.

Excoffier, L; Smouse, PE; Quattro, JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131:479-491.

Fachinello, JC. Problemáticas das mudas de plantas frutíferas de caroço. In: Simpósio internacional de frutas de caroço: pêssegos, nectarinas e ameixas. Porto Alegre. Anais...,p. 25-40, 2000.

Fachinello, JC; Bianchi, VJ. 2005. Porta-enxertos para frutas de caroço: banco ativo de germoplasma (BAG) e atividades de pesquisa na UFPel. In: Simpósio Brasileiro de Recursos Genéticos, 2005, Pelotas. Resumos e Palestras. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. V. 1. p. 103-107.

Falush, D; Stephens, M; Pritchard JK. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequency. *Genetics*, 164: 1567-1587.

FAOSTAT, 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations Agricultural statistics. Banco de dados. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 23 janeiro de 2012.

Felipe, AJ; Gómez-Aparisi, J; Socias, R.; et al. 1998. Breeding Almond X Peach Hybrid Rootstocks at Zaragoza. II International Symposium on Pistachios and Almonds, v. 1, 195-199.

Ferreira, ME; Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3 ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEM, 220p.

Glaubitz, JC. 2004. CONVERT: a user friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes* 4: 309-310.

Goffreda, JC; Nick, JMA; Mehlenbacher, SA; Vorsa, N. 1991. Inheritance of isozymes in peach X *Prunus kansuensis* and peach X *Prunus davidiana* hybrids. *Euphytica*. 54: 161-168.

Hartl DL; Clark AG. 1989. Principles of population genetics. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Banco de dados. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/>>. Acesso em 22 de janeiro de 2012.

Jakobsson, M; Rosenberg, NA. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23: 1801-1806.

Joobeur T, Viruel MA, de Vicente MC, Jáuregui B, Ballester J, Dettori MT, Verde I, Truco MJ, Messeguer R, Batlle I, Quarta R, Dirlwanger E, Arús P. 1998. Construction of a saturated linkage map in *Prunus* using an almond × peach F2 progeny. *Theoretical and Applied Genetics*, v.97: p.1034–1041.

Jung, S; Jiwan, D; Lee, T; Abbott, A; Sosinski, B.; Main, D. 2009. Synteny of *Prunus* and other model plant species. *BMC Genomics*, 10:76.

Layne, REC. 1987. Peach rootstocks. In: R. C. Rom & R. F. Carlson (Eds), *Rootstocks for Fruit Crops*, pp. 185-216, John Wiley & Sons, NY.

Lewontin, RC. 1972. The apportionment of human diversity. *Evol. Biol.* 6: 381-398.

Liu, K; Muse, SV. 2005. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21 (9): 2128-2129.

Mantel, N. A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.*, Vol 27, p. 209-220.

- Martín, C; Herrero, M; Hormaza, JL. 2011. Molecular characterization of apricot germplasm from an old stone collection. PLoS ONE, Vol. 6, ed. 8, e23979.
- Marino, G. 1988. The effect of paclobutrazol on in vitro rooting, transplant establishment and growth of fruit plants. Plant growth regulation, Vol. 7, nº 5, 237-247.
- Mayer, NA; Lemos, EG de M; Pereira, FM; Wickert, E. 2008. Caracterização de três genótipos de umezeiro (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) por marcadores RAPD. Revista Brasileira de Fruticultura, v.30, n.04, p.1045-1050.
- Mayer, NA; Ueno, B; Antunes, LEC. 2009. Seleção e clonagem de porta-enxertos tolerantes à morte precoce do pessegueiro. Comunicado técnico, 209: 1-13, 2009.
- Mnejja, M; Garcia-Mas, J; Audergon, JM; Arús, P. 2010. *Prunus* microsatellite marker transferability across *rosaceous* crops. Tree Genetics & Genomes, Vol. 6, p. 689-700.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-290.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 70: 3321-3323.
- Nei, M; LI, WH. 1979. Mathematical-model for studying genetic-variation in terms of restriction endonucleases. Proceeding of the National Academy of Science. USA 76: 5269–5273.
- Nikoumanesh, K; Ebadi, A; Zeinalabedini, M; Gogorcena, Y. 2011. Morphological and molecular variability in some Iranian almond genotypes and related *Prunus* species and their potentials for rootstock breeding. Scientia Horticulturae. 129: 108-118.
- Okie, WR. 1987. Plum rootstocks. In: R. C. Rom & R. F. Carlson (Eds), Rootstocks for Fruit Crops, pp. 321-360, John Wiley & Sons, NY.
- Paetkau, D.; Calvert, W.; Stirling, I.; Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. Mol Ecol 4: 347–354.
- Peakall, R. and Smouse P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes. 6, 288-295.
- Pereira, FM; Mayer, NA. 2005. Pessegueiro: tecnologias para a produção de mudas. Jaboticabal: Funep, 65p.

- Potter D. 2003. Molecular phylogenetic studies in *Rosaceae*. In: Sharma A. K., Sharma A. (eds.) Plant genome: Biodiversity and evolution, vol. I, Pt. A: Phanerogams. Science Publishers, Inc. Enfield, New Hampshire, pp. 319–351.
- Pritchard, JK; Stephens, M; Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Ramming, DW; Tanner, O. 1983. 'Nemared' peach rootstocks. *HortSci* 18: 376.
- Raseira, MCB; Byrne, DH; Franzon, RC. 2008. Pessegueiro. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. Origem e evolução de plantas cultivadas. 1 ed. Brasília: EMBRAPA Clima Temperado, p. 679-705.
- Raseira, MCB; Nakasu, BH; Peters, JA. 1989. 'Piazito' - um mini pessegueiro ornamental. *Horti Sul, Pelotas*, vol. 1, No 1, p. 31-32.
- Renaud, R; Bernhard R, Grasselly, C; Dosba, F. 1988. Diploid plum x peach hybrid rootstocks for stone fruit trees. *Hort Sci* 23:115-116.
- Rohlf, J. 2001. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. New York: Exeter. Software.
- Rosenberg, N.A. 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Note*, 4:137-138.
- Sharma G; Sharma N. 2010. Molecular characterization of diversity and relationship among almond [*Prunus dulcis* Miller (D.A. Webb)] cultivars and indigenous selections. *Indian Journal of Biotechnology*, 9: 378-383.
- Sherman, WB; Lyrene, PM; Sharpe, RH. 1991. Flordaguard Peach Rootstocks. *Hort Science*, Vol. 26 (4): 427.
- Sneath, PHA; Sokal, RR. 1973. *Numeric Taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. San Francisco: W. H. Freeman, 573p.
- Sun, Y; Wen, X; Huang, H. 2012. Genetic diversity and differentiation of *Micheliamaudiae* (*Magnoliaceae*) revealed by nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Genetica*, online published.

Tofanelli, MBD; Chalfun, NNJ; Hoffmann, A; Chalfun Júnior, A. 2001. Uso do ácido indolbutírico na propagação de cultivares copa de ameixeira através de estacas lenhosas. Científica Rural, Bagé, v.6, n.1, p.115-121.

Tofanelli, MBD; Ono, EO.; Rodrigues, JD. Método de aplicação de ácido indolbutírico no enraizamento de estacas herbáceas de pessegueiro. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 363-364, 2003.

Toval, G; Vega, G. 1988. Ensayos de procedencias. In: Pardos J. A (ed.), Mejora genética de especies arbóreas forestales. Fucovasa & Etsim, Madrid.

Turkoglu, Z; Bilgener, S; Ercisli, S; et al. 2010 Simple sequence repeat-based assessment of genetic relationships among *Prunus* rootstocks. Genetics and Molecular Research, 9 (4): 2156-2165.

Varshney, RK; Close, TJ; Singh, NK; Hoisington, DA; Cook, DR. 2009. Orphan legume crops enter the genomics era!. Current Opinion in Plant Biology. 12: 202-210.

Venn, J. “On the Diagrammatic and Mechanical Representation of Propositions and Reasonings”, The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science [Fifth Series] July 1880, 1-18.

Vilanova, S; Sargent, DJ; Arús, P; Monfort, A. 2008. Synteny conservation between two distantly-related *Rosaceae* genomes: *Prunus* (the stone fruits) and *Fragaria* (the strawberry). BMC Plant Biology 8: 67.

Wagner, HW; Sefc, KM. 1999. Identity 1.0. Centre for Applied Genetics. University of Agricultural Sciences, Vienna. Disponível em: <<http://www.boku.ac.at/zag/forsch/identity.htm>>. Acessado em Janeiro de 2012.

Wickert, E; Lemos, EG de M; Pereira, FM; Mayer, NA. 2007. Marcadores AFLP na caracterização de três genótipos de umezeiro selecionados como porta-enxertos para pessegueiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.42, n.12, p.1741-1746.

Wright S. 1978. Evolution and the genetics of populations. Vol. 4. Variability within and among natural populations. Chicago, University of Chicago Press. 590p.

Wünsch H.A. 2009. Cross-transferable polymorphic SSR *loci* in *Prunus* species. Scientia Horticulturae, Vol. 120, p. 348-352.

Xu, DH; Wahyuni, S; Sato, Y; Yamaguchi, M, Tsunematsu, H; Ban, T. 2006. Genetic diversity and relationships of Japanese peach (*Prunus persica* L.) cultivars revealed by AFLP and pedigree tracing. Genetic Resources and Crop Evolution, Vol. 53, p. 883–889.

Yap, IV; Nelson, RJ. 1996. WinBoot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendograms.

Yeh, FC; Young, RC; Timothy, B; Boyle, TBJ; Ye ZH; et al. 1997. Popgene, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Mol Biol Biotech Center, University of Alberta, Canada.

Zhebentyayeva TN, Reighard GL, Gorina VM, Abbott AG. 2003. Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm. Theor Appl Genet 106:435–444.

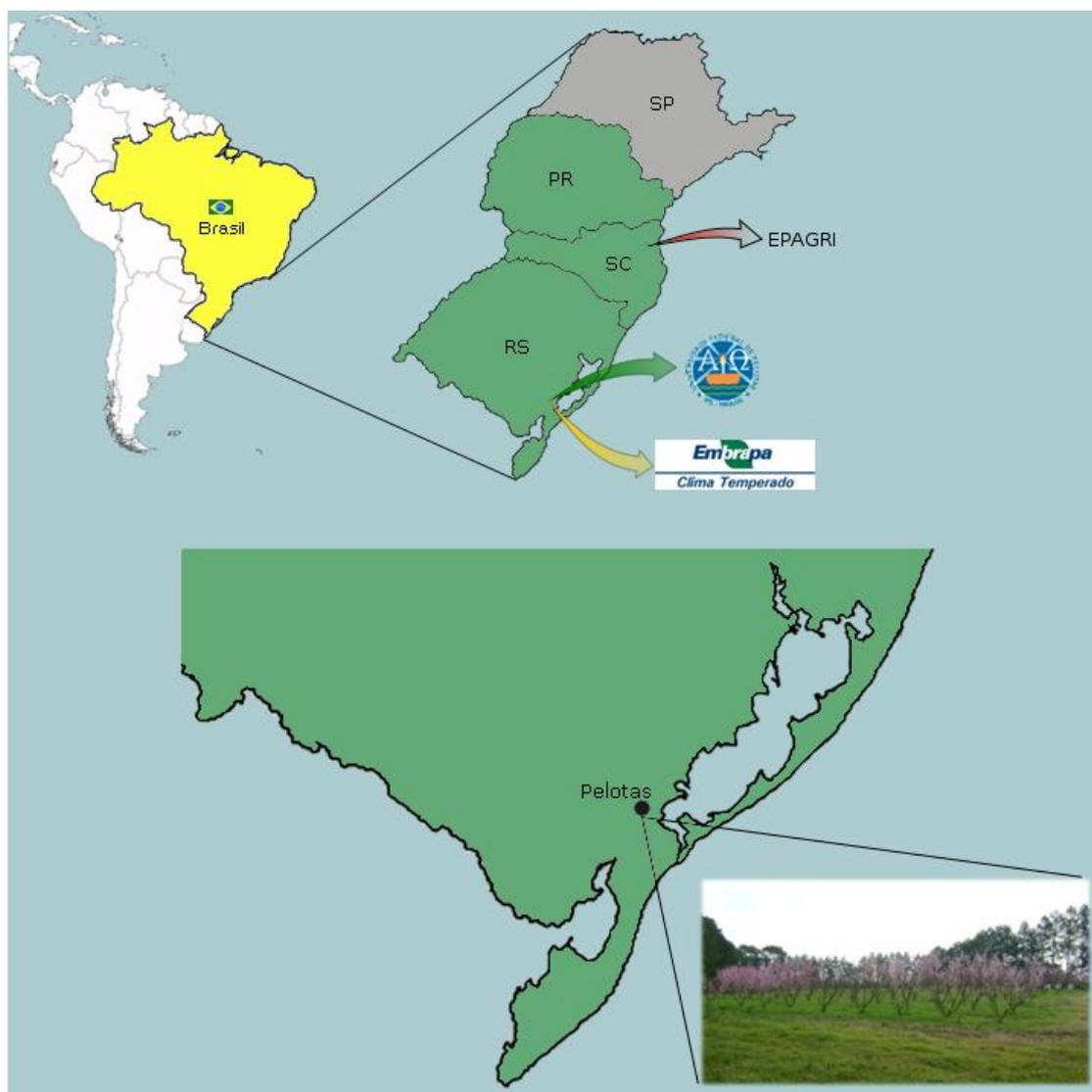


Figura 1. Localização dos órgãos de pesquisas: EMBRAPA Clima Temperado, EPAGRI e UFPEL. Ilustração da coleção de porta-enxertos de *Prunus* sob condições a campo. Nota: Cor verde- região sul, cinza- região sudeste do Brasil.

Tabela 1. Acessos da coleção de porta-enxertos de *Prunus* e suas respectivas espécies, origens e referências originais de desenvolvimento dos acessos.

Grupos	Espécie	Origem	Referência
Porta-enxertos sul-brasileiros			
Capdeboscq	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Melhoramento EMBRAPA
Aldrighi	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Seleção produtor rural
Aldrighi Cléber	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Seleção EMBRAPA
WFM-ESM-07-01	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
WFM-ESM-07-02	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
WFM-ESM-07-03	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
WFM-ESM-07-04	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
Cristal Taquari	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Seleção EMBRAPA
Chorão 2003-229-03	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Seleção EMBRAPA
Farrapos	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Melhoramento EMBRAPA
Bolinha	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Melhoramento EMBRAPA
Casc 1005	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Seleção EMBRAPA
Cons 594	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Seleção EMBRAPA
Maracotão	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Melhoramento EMBRAPA
Tardio-01	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Seleção EMBRAPA
Turquesa	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Melhoramento EMBRAPA
FRM-AGA-08-55	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
GGs-TUR-08-31	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
GGs-TUR-08-30	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
GGs-TUR-08-27	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
COAS-AME-08-25	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
COAS-AME-08-22	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
COAS-AME-08-20	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
COAS-SAA-08-17	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
JCB-PLA-08-16	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
JCB-PLA-08-15	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
JCB-SAA-08-13	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
JCB-SAA-08-11	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
MF-JUB-08-09	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
MF-GRA-08-01	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Mayer et al. (2009)
Rosafior	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Melhoramento EMBRAPA
Nem CPACT	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	EMBRAPA CPACT
Piazito	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	Raseira et al. (1989)
<i>P. persica</i>	<i>P. persica</i>	Brasil/ RS	EMBRAPA CPACT
Porta-enxertos internacionais			
Tsukuba-1	<i>P. persica</i>	Japão	Desconhecida
Tsukuba-2	<i>P. persica</i>	Japão	Desconhecida
Tsukuba-3	<i>P. persica</i>	Japão	Desconhecida
Tsukuba-2CPACT	<i>P. persica</i>	Japão	Desconhecida
Nemaguard	<i>P. persica</i> x <i>P. davidiana</i>	EUA	Layne (1987)
Flordaguard	<i>P. persica</i> x <i>P. davidiana</i>	EUA	Sherman et al.(1991)
Okinawa	<i>P. persica</i>	Okinawa	Desconhecida
De guia	<i>P. persica</i>	México	Desconhecida
Nemared	(<i>P. persica</i> x <i>P. davidiana</i>)x <i>P. persica</i>	EUA	Ramming and Tanner (1983)
Ishtara	(<i>P. ceracifera</i> x <i>P. salicina</i>)x (<i>P. ceracifera</i> x <i>P. persica</i>)	França	Renaud et al. (1988)
GxN9	<i>P. amygdalus</i> x <i>P. persica</i>	Espanha	Felipe et al. (1998)
GF 677	<i>P. dulcis</i> x <i>P. persica</i>	França	Bernhard and Grasselly (1981)
Cadaman	<i>P. persica</i> x <i>P. davidiana</i>	França-Hungria	Edin and Garcin (1994)
Barrier	<i>P. persica</i> x <i>P. davidiana</i>	Itália	De Salvador et al. (1991)
México Fila 2	<i>P. persica</i>	México	Desconhecida

Tabela 1. Continuação...

Porta-enxertos introduzidos	Espécie	Origem	Referência
México Fila 1	<i>P. persica</i>	México	Desconhecida
I-67-52-9	<i>P. persica</i>	Desconhecida	Desconhecida
I-67-52-4	<i>P. persica</i>	Desconhecida	Desconhecida
I-67-55-9	<i>P. persica</i>	Desconhecida	Desconhecida
I-67-54-12	<i>P. persica</i>	Desconhecida	Desconhecida
I-67-53-5	<i>P. persica</i>	Desconhecida	Desconhecida
I-93-27	<i>P. persica</i>	EUA/ Texas	Desconhecida
I-93-21	<i>P. persica</i>	EUA/ Texas	Desconhecida
I-67-57-14	<i>P. persica</i>	Desconhecida	Desconhecida
I-67-55-13	<i>P. persica</i>	Desconhecida	Desconhecida
I-93-38	<i>P. persica</i>	EUA/ Texas	Desconhecida
I-93-37	<i>P. persica</i>	EUA/ Texas	Desconhecida
I-93-30	<i>P. persica</i>	EUA/ New Jersey	Desconhecida
<i>Prunus spp.</i>			
Cereja Livramento	<i>P. sp.</i>	Brasil/ RS	EMBRAPA CPACT
Cereja Tardia	<i>P. sp.</i>	Brasil/ SC	EPAGRI
Cereja Precoce	<i>P. sp.</i>	Brasil/ SC	EPAGRI
Mirabolano 29C	<i>P. cerasifera</i>	EUA	Okie (1987)
Clone 15	<i>P. mume</i>	Brasil/ SP	Desconhecida
Rigitano	<i>P. mume</i>	Brasil/ SP	Desconhecida
<i>P. mume</i> CPACT	<i>P. mume</i>	Brasil/ RS	EMBRAPA CPACT
Marianna	<i>P.cerasifera</i> x <i>P. munsoniana</i>	Desconhecida	Desconhecida
Santa Rosa	<i>P.salicina</i> x <i>P. simonii</i> x <i>P.americana</i>	Desconhecida	Burbank (1907)
Genovesa	<i>P.salicina</i>	Desconhecida	Desconhecida
<i>P. kansuensis</i>	<i>P. kansuensis</i>	Brasil/ RS	EMBRAPA CPACT
<i>P. sellowii</i>	<i>P. sellowii</i>	Brasil/ RS	EMBRAPA CPACT
<i>P. manshurica</i>	<i>P. manshurica</i>	Brasil/ RS	EMBRAPA CPACT

Tabela 2. Características dos 17 pares de oligonucleotídeos (primers) alvos de *loci* SSR empregados para avaliação da coleção de porta-enxertos de *Prunus*.

Locus SSR	Referência	Sequência do primer	Motivo do SSR	Tamanho esperado (bp)	Tamanho observado (bp) / nível de amplificação		
					Porta-enxertos sul-brasileiros	Porta-enxertos internacionais	<i>Prunus</i> spp.
BPPCT002	Dirlewanger et al. (2002)	F- TCGACAGCTTGATCTTGACC R- CAATGCCTACGGAGATAAAAAGAC	(AG) ₂₅	229	229 +	175 +	140 +
BPPCT008	Dirlewanger et al. (2002)	F- ATGGTGTGTATGGACATGATGA R- CCTCAACCTAAGACACCTTCACT	(GA) ₃₆	148	-	-	-
BPPCT024	Dirlewanger et al. (2002)	F- GAGGAATGTGCCTCTTCTGG R- CTCCCGTACGCGTTTACC	(AG) ₁₅	96	116 +	116 +	94 +-
BPPCT026	Dirlewanger et al. (2002)	F- ATACCTTTGCCACTTGCG R- TGAGTTGGAAGAAAACGTAACA	(AG) ₈ GG(AG) ₆	134	134 +	134 +	139 +
BPPCT030	Dirlewanger et al. (2002)	F- AATTGTAAGTGGCAATGCTATGA R- CTGCCTTCTGCTCACACC	(AG) ₂₅	175	204 +	204 +	165 +
BPPCT034	Dirlewanger et al. (2002)	F- CTACCTGAAATAAGCAGAGCCAT R- CAATGGAGAATGGGGTGC	(GA) ₁₉	228	224 +	224 +	184 +
UDP96003	Cipriani et al. (1999)	F- TTGCTCAAAAAGTGTGCGTTGC R- ACACGTAGTGCAACACTGGC	(CT) ₁₁ (CA) ₂₈	143	145 +	143 +	95 +
UDP96005	Cipriani et al. (1999)	F- GTAACGCTCGCTACCACAAA R- CTGCATATTCACCACCCAG	(AC) ₁₆ TG(CT) ₂ CA(CT) ₁₁	155	+	-	-
UDP96008	Cipriani et al. (1999)	F- TTGTACACACCCCTCAGCCTG R- TGCTGAGGTTCAAGTGAGTG	(CA) ₂₃	165	125 +	200 +	123 +
UDP96013	Cipriani et al. (1999)	F- ATTCTTCACTACACGTGCACG R- CCCAGACATACTGTGGCTT	(AG) ₂₂ (TG) ₈ TT(TG) ₁₀	198	187 +	200 +	170 +-
UDP96018	Cipriani et al. (1999)	F- TTCTAATCTGGGCTATGGCG R- GAAGTTCACATTTACGACAGGG	(AC) ₂₁	257	255 +	257 +	240 +
UDP96019	Cipriani et al. (1999)	F- TTGGTCATGAGCTAAGAAAACA R- TAGTGGCACAGAGCAACACC	(TG) ₁₈ (AG) ₇	216	218 +	218 +	218 +-
UDP98025	Testolin et al. (2000)	F- GGGAGTTACTATGCCATGAAG R- CGCAGACATGTAGTAGGACCT	(CA) ₁₉	135	170 +	160 +	120 +
UDP98407	Cipriani et al. (1999)	F- AGCGGCAGGCTAAATATCAA R- AATCGCCGATCAAAGCAAC	(GA) ₂₉	212	212 +	203 +	170 +
UDP98411	Testolin et al. (2000)	F- AAGCCATCCACTCAGCACTC R- CCAAAAACCAAAACCAAAGG	(TC) ₁₆	150	150 +	150 +	148 +-
UDP98412	Testolin et al. (2000)	F- AGGGAAAGTTCTGCTGCAC R- GCTGAAGACGACGATGATGA	(AG) ₂₈	129	129 +	129 +	150 +
UDP98414	Testolin et al. (2000)	F- AAAAGGCACGACGTTGAAGA R- TTCAGATTGGGAATTTGCAG	(TC) ₂₄	150	174 +	120 +	120 +

Nota: (bp) pares de bases, (+) boa amplificação, (+-) boa amplificação em certos acessos e amplificação ruim em outros, e (-) amplificação ruim.

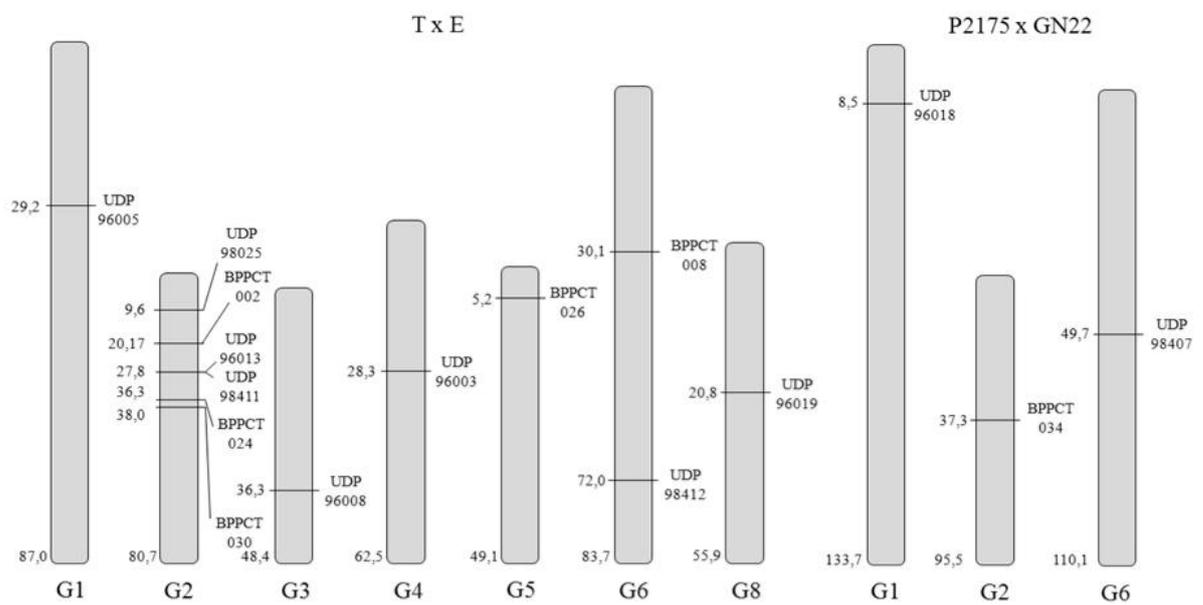


Figura 2. Mapa de ligação de (Texas) T X E (Earlygold) (Joobeur et al., 1998) e (Mirabolano) P2175 X GN22 (Garfi X Nemared) (Dirlewanger et al., 2004) contendo a indicação da localização dos marcadores SSR utilizados neste estudo.

Tabela 3. Sumário dos parâmetros de diversidade genética obtidos pela avaliação de 15 *loci* SSR para toda a coleção de porta-enxertos de *Prunus* e para cada grupo.

<i>Locus</i> SSR	Banco de germoplasma										Porta-enxertos sul-brasileiros									
	Ng	Na	Ne	I	r	He	Ho	F	PIC	PI	Ng	Na	Ne	I	r	He	Ho	F	PIC	PI
BPPCT002	75	18	3,54	1,80	0,14	0,71	0,46	0,34	0,69	0,10	34	4	2,00	0,79	0,04	0,50	0,44	0,12	0,40	0,34
BPPCT024	75	8	2,29	1,04	0,28	0,56	0,12	0,77	0,54	0,27	34	2	1,30	0,38	0,11	0,23	0,09	0,61	0,20	0,62
BPPCT026	75	10	4,01	1,65	0,24	0,75	0,31	0,57	0,77	0,09	34	5	2,16	1,02	0,08	0,54	0,41	0,23	0,46	0,29
BPPCT030	75	7	3,04	1,35	0,26	0,67	0,23	0,64	0,68	0,16	34	3	2,02	0,75	0,20	0,51	0,21	0,59	0,39	0,35
BPPCT034	75	12	2,12	1,28	0,20	0,52	0,21	0,58	0,53	0,24	34	3	1,13	0,26	0,04	0,11	0,06	0,47	0,11	0,80
UDP96003	75	17	6,07	2,13	0,27	0,83	0,32	0,60	0,83	0,04	34	7	3,88	1,49	0,12	0,74	0,53	0,28	0,70	0,11
UDP96008	75	13	2,87	1,44	0,10	0,65	0,47	0,26	0,63	0,17	34	5	2,23	0,93	0,01	0,55	0,53	0,04	0,46	0,29
UDP96013	75	15	4,00	1,82	0,20	0,75	0,39	0,47	0,76	0,08	34	6	3,13	1,40	0,20	0,68	0,35	0,48	0,62	0,16
UDP96018	75	8	4,35	1,66	0,20	0,77	0,40	0,47	0,77	0,08	34	5	3,07	1,23	0,08	0,67	0,53	0,21	0,61	0,16
UDP96019	75	7	1,89	0,92	0,18	0,47	0,20	0,56	0,52	0,31	34	3	1,50	0,55	0,05	0,33	0,26	0,20	0,29	0,49
UDP98025	75	16	5,83	2,14	0,30	0,82	0,26	0,68	0,83	0,04	34	5	1,85	0,76	0,15	0,46	0,24	0,48	0,40	0,35
UDP98407	75	11	5,59	1,91	0,30	0,82	0,26	0,67	0,83	0,05	34	7	3,62	0,94	0,21	0,72	0,35	0,51	0,69	0,11
UDP98411	75	11	2,23	1,33	0,29	0,55	0,09	0,83	0,54	0,21	34	3	1,13	1,53	0,10	0,11	0,00	1,00	0,11	0,79
UDP98412	75	9	3,30	1,47	0,25	0,69	0,23	0,65	0,69	0,13	34	3	2,05	0,26	0,20	0,51	0,21	0,59	0,39	0,35
UDP98414	75	9	5,22	1,80	0,31	0,80	0,24	0,69	0,81	0,06	34	6	3,10	1,43	0,24	0,68	0,26	0,61	0,65	0,13
Média	75	11,3	3,76	1,58	0,23	0,69	0,28	0,58	0,69	0,13	34	4,5	2,28	0,91	0,12	0,49	0,30	0,42	0,43	0,35
Total	75	171	58,1	23,7	-	-	-	-	-	9,5e ⁻¹⁵	34	67	36,4	13,72	-	-	-	-	-	1,19e ⁻⁸

Tabela 3. Continuação...

<i>Locus SSR</i>	Porta-enxertos introduzidos										Outras espécies									
	Ng	Na	Ne	I	r	He	Ho	F	PIC	PI	Ng	Na	Ne	I	r	He	Ho	F	PIC	PI
BPPCT002	28	8	3,10	1,49	0,17	0,68	0,39	0,42	0,65	0,13	13	12	9,38	2,34	0,10	0,89	0,69	0,22	0,69	0,02
BPPCT024	28	3	2,00	0,83	0,33	0,50	0,00	1,00	0,43	0,32	9	7	3,85	1,62	0,04	0,74	0,66	0,10	0,54	0,09
BPPCT026	28	7	4,48	1,65	0,33	0,78	0,18	0,77	0,74	0,08	4	5	4,57	1,55	0,15	0,78	0,50	0,36	0,77	0,08
BPPCT030	28	4	3,23	1,25	0,23	0,69	0,29	0,58	0,63	0,15	6	5	3,78	1,44	0,32	0,73	0,16	0,77	0,68	0,11
BPPCT034	28	7	2,54	1,23	0,20	0,61	0,29	0,52	0,56	0,20	11	9	8,06	2,13	0,17	0,87	0,54	0,37	0,53	0,02
UDP96003	28	9	3,34	1,59	0,34	0,70	0,11	0,84	0,67	0,11	11	8	3,96	1,72	0,27	0,74	0,27	0,63	0,83	0,08
UDP96008	28	5	2,17	1,02	0,11	0,54	0,36	0,33	0,49	0,26	11	10	7,80	2,17	0,12	0,87	0,63	0,27	0,63	0,02
UDP96013	28	10	3,27	1,63	0,24	0,69	0,29	0,58	0,67	0,11	7	9	7,53	2,10	-0,07	0,86	1	-0,15	0,76	0,03
UDP96018	28	8	3,56	1,51	0,28	0,72	0,22	0,69	0,68	0,12	8	6	2,37	1,24	0,04	0,57	0,50	0,13	0,77	0,20
UDP96019	28	7	2,36	1,07	0,25	0,58	0,18	0,69	0,49	0,26	6	1	1	0	0	0	0	1	0,52	1
UDP98025	28	12	5,14	1,96	0,26	0,81	0,32	0,60	0,78	0,06	10	6	4,16	1,56	0,31	0,76	0,20	0,73	0,83	0,09
UDP98407	28	9	5,19	1,83	0,34	0,81	0,18	0,77	0,78	0,06	1	1	1	0	0	0	0	1	0,69	1
UDP98411	28	5	2,38	1,11	0,34	0,58	0,04	0,93	0,53	0,22	13	9	6,14	1,97	0,20	0,83	0,46	0,44	0,83	0,04
UDP98412	28	5	3,27	1,29	0,22	0,69	0,32	0,53	0,64	0,15	9	6	3,6	1,50	0,35	0,72	0,11	0,84	0,54	0,11
UDP98414	28	8	4,57	1,70	0,39	0,78	0,07	0,90	0,75	0,08	8	5	3,65	1,42	-0,01	0,72	0,75	-0,03	0,81	0,11
Média	28	7	3,37	1,41	0,27	0,68	0,21	0,68	0,63	0,15	8,5	6,6	4,72	1,52	0,13	0,67	0,43	0,31	0,69	0,20
Total	28	107	50,6	21,1	-	-	-	-	-	1,35e ⁻¹³	13	99	70,9	22,8	-	-	-	-	-	4,8e ⁻¹⁶

Nota: (Ng) número de genótipos, (Na) número de alelos observados, (Ne) alelos efetivos, (I) índice de Shannon, (r) probabilidade de alelos nulos, (He) heteroziguidade esperada, (Ho) heteroziguidade observada, (F) índice de fixação, (PIC) conteúdo de informação polimórfica e (PI) probabilidade de identidade.

Tabela 4. Sumário de frequência alélica dos 15 loci SSR avaliados na coleção de porta-enxertos de *Prunus*.

Alelo / Locus	BPPCT 002	BPPCT 024	BPPCT 026	BPPCT 030	BPPCT 034	UDP 96003	UDP 96008	UDP 96013	UDP 96018	UDP 96019	UDP 98025	UDP 98407	UDP 98411	UDP 98412	UDP 98414
Alelo A	0,0067*	0,0070*	0,3788	0,0956	0,0137*	0,0753	0,0068*	0,0072*	0,2536	0,0074*	0,0625	0,0476*	0,1067	0,0141*	0,1857
Alelo B	0,0200*	0,0070*	0,0152*	0,4485	0,0205*	0,0068*	0,5000	0,0072*	0,0217*	0,0074*	0,0069*	0,0476*	0,0067*	0,0563	0,1714
Alelo C	0,0067*	0,0141*	0,0303*	0,0441*	0,0068*	0,0137*	0,0137*	0,0145*	0,0870	0,1029	0,0556	0,1032	0,0267*	0,0282*	0,1786
Alelo D	0,0067*	0,0070*	0,1667	0,3382	0,0205*	0,0137*	0,0137*	0,0145*	0,0072*	0,1691	0,0069*	0,0079*	0,6533	0,0141*	0,0643
Alelo E	0,0267*	0,0211*	0,2652	0,0294*	0,0274*	0,0068*	0,0137*	0,0145*	0,1232	0,6985	0,0278*	0,0873	0,0333*	0,0986	0,0714
Alelo F	0,0133*	0,5423	0,0303*	0,0294*	0,0548	0,0137*	0,0685*	0,0072*	0,1232	0,0074*	0,0347*	0,2222	0,0133*	0,4225	0,0071*
Alelo G	0,0200*	0,0282*	0,0303*	0,0147*	0,6712	0,0068*	0,0205*	0,0145*	0,3551	0,0074*	0,1250	0,1825	0,0600	0,0282*	0,0143*
Alelo H	0,0133*	0,3732	0,0076*		0,0205*	0,0205*	0,0137*	0,0365*	0,0290*		0,0069*	0,0159*	0,0067*	0,3310	0,0143*
Alelo I	0,0067*		0,0076*		0,0205*	0,0068*	0,0205*	0,2101			0,0069*	0,2698	0,0267*	0,0070*	0,2929
Alelo J	0,0133*		0,0682*		0,0068*	0,0753	0,0068*	0,0507*			0,1042	0,0079*	0,0467*		
Alelo K	0,0333*				0,1233	0,1438	0,0137*	0,4275			0,3403	0,0079*	0,0200*		
Alelo L	0,0933				0,0137*	0,0822	0,3014	0,0435*			0,0278*				
Alelo M	0,0067*					0,0274*	0,0068*	0,0217*			0,1319				
Alelo N	0,0200*					0,2945		0,1232			0,0208*				
Alelo O	0,4733					0,1918		0,0072*			0,0069*				
Alelo P	0,0133*					0,0068*					0,0347*				
Alelo Q	0,0133*					0,0137*									
Alelo R	0,2133														
Raro Total	0,2200	0,0844	0,1895	0,1176	0,1504	0,1367	0,1984	0,2392	0,0579	0,0296	0,1456	0,1348	0,1801	0,0916	0,0357

Nota: Os asteriscos representam alelos raros ($f \leq 0,05$) e as diferentes cores as diferentes compartimentações alélica: Sul-brasileiros, Introduzidos, Outras espécies, Sul-brasileiros + Internacionais, Sul-brasileiros + Outras espécies, Introduzidos + Outras espécies e Sul-brasileiros + Introduzidos + Outras espécies.

Tabela 5. Lista de *loci* com seus respectivos acessos que apresentaram alelos exclusivos.

<i>Locus</i>	Acesso				
BPPCT002	<i>P. persica</i>				
BPPCT024	<i>P. manshurica</i>	Genovesa	Santa Rosa		
BPPCT026	<i>C. Tardia</i>	GF-677	Chorão		
BPPCT030	<i>P. mume</i>				
BPPCT034	<i>P. manshurica</i>	Flordaguard	Cadaman	Barrier	GF-677
UDP96003	<i>P. kansuensis</i>	Clone 15	<i>C. Tardia</i>	<i>C. Tardia</i>	Barrier
UDP96008	<i>P. sellowii</i>	Genovesa	<i>P. manshurica</i>		
UDP96013	Genovesa	Santa Rosa	Ishtara	<i>P. persica</i>	
UDP96018	<i>C. Precoce</i>	Tsuk 2-CPACT	Flordaguard	GGs-TUR-08-30	
UDP96019	GF-677	GxN9	Cadaman	Barrier	
UDP98025	<i>P. manshurica</i>	Genovesa	Cadaman	Barrier	Ishtara
UDP98407	Barrier	I-93-27	Cadaman	Casc1005	
UDP98411	<i>P. sellowii</i>	<i>P. sellowii</i>	Genovesa	<i>C. Tardia</i>	
UDP98412	<i>P. sellowii</i>	<i>P. mume</i>	Cadaman		
UDP98414	Mexico F2	Mexico F1	I-67-57-14		

Nota: As diferentes cores representam os diferentes grupos: Sul-brasileiros, Introduzidos e Outras espécies.

Tabela 6. Sumário de frequência alélica dos 15 loci SSR avaliados nos diferentes grupos da coleção de porta-enxertos de *Prunus*.

Alelo / Locus	BPPCT 002	BPPCT 024	BPPCT 026	BPPCT 030	BPPCT 034	UDP 96003	UDP 96008	UDP 96013	UDP 96018	UDP 96019	UDP 98025	UDP 98407	UDP 98411	UDP 98412	UDP 98414
Alelo A			0,5882						0,3824		0,0294*	0,0294*	0,0294*		0,1471
Alelo B			0,0294*	0,5588			0,5147		0,0147*						0,1324
Alelo C				0,0147*						0,1912		0,0294*			0,0588
Alelo D			0,0147*	0,4265						0,0147*			0,9412		0,0294*
Alelo E			0,3382						0,1765	0,7941		0,1618			0,1176
Alelo F		0,8676	0,0294*				0,0147*					0,2059		0,5294	
Alelo G					0,9412		0,0147*		0,3824			0,1029	0,0294*	0,0147*	
Alelo H		0,1324			0,0294*	0,0147*	0,0294*		0,0441*			0,0294*		0,4559	
Alelo I								0,3235				0,4412			0,5147
Alelo J						0,0294*		0,0294*			0,0147*				
Alelo K	0,0147*				0,0294*	0,3088		0,4265			0,6912				
Alelo L	0,0147*					0,0882	0,4265								
Alelo M								0,0294*			0,2500				
Alelo N						0,2206		0,1765							
Alelo O	0,6029					0,3235		0,0147*							
Alelo P						0,0147*					0,0147*				
Alelo Q															
Alelo R	0,3676														
Raro Total	0,0294	0	0,0735	0,0147	0,0588	0,0588	0,0588	0,0735	0,0588	0,0147	0,0588	0,0882	0,0588	0,0147	0,0294

Tabela 6. Continuação...

	Alelo / Locus	BPPCT 002	BPPCT 024	BPPCT 026	BPPCT 030	BPPCT 034	UDP 96003	UDP 96008	UDP 96013	UDP 96018	UDP 96019	UDP 98025	UDP 98407	UDP 98411	UDP 98412	UDP 98414
B	Alelo A			0,1786	0,2321		0,0179*		0,0179*	0,1481	0,0179*	0,1250	0,0714	0,2500		0,2500
	Alelo B				0,4107			0,6250		0,0185*	0,0179*		0,1071			0,2500
	Alelo C			0,0357*	0,0714	0,0179*				0,0370*	0,0179*	0,0179*	0,1607			0,2857
	Alelo D			0,3393	0,2857				0,0179*	0,0185*	0,3929		0,0179*	0,5893		0,0893
	Alelo E			0,2143					0,0179*	0,0556	0,5179			0,0893	0,2500	0,0357*
	Alelo F		0,2857			0,1071		0,0714		0,2963	0,0179*		0,2500		0,4107	0,0179*
	Alelo G		0,0714	0,0536		0,5714	0,0179*	0,0357*		0,4074	0,0179*	0,3214	0,2857		0,0536	0,0357*
	Alelo H		0,6429						0,0893	0,0185*		0,0179*			0,2679	0,0357*
	Alelo I			0,0179*		0,0179*	0,0179*		0,0893			0,0179*	0,0714	0,0357*	0,0179*	
	Alelo J	0,0357*		0,1607		0,0179*	0,1607		0,0893			0,2500	0,0179*	0,0357*		
	Alelo K					0,2321			0,5179			0,0357*	0,0179*			
	Alelo L	0,1786				0,0357*	0,1071	0,2500	0,1071			0,0714				
	Alelo M	0,0179*					0,0741	0,0179*	0,0179*			0,0357*				
	Alelo N	0,0536					0,5000		0,0357*			0,0536				
	Alelo O	0,5179					0,0714					0,0179*				
	Alelo P	0,0357*										0,0357*				
	Alelo Q	0,0357*					0,0357*									
	Alelo R	0,1250														
Raro Total	0,1250	0	0,0536	0	0,0894	0,0894	0,0536	0,1173	0,0925	0,0895	0,1787	0,0537	0,0714	0,0179	0,1250	
C	Alelo A	0,0385*	0,0556			0,0909	0,4545	0,0455*		0,0625					0,1111	0,1250
	Alelo B	0,1154	0,0556			0,1364	0,0455*	0,1364	0,0714	0,0625		0,0500*		0,0385*	0,4444	0,0625
	Alelo C	0,0385*	0,1111	0,2500	0,0833		0,0909	0,0909	0,1429	0,6250		0,3500	1,000	0,1538	0,2222	0,3125
	Alelo D	0,0385*	0,0556	0,2500	0,0833	0,1364	0,0909	0,0909	0,0714			0,0500*		0,0385*	0,1111	0,1250
	Alelo E	0,1538	0,1667		0,3333	0,1818	0,0455*	0,0909	0,0714	0,1250	1,0000	0,2000				
	Alelo F	0,0769	0,1111	0,2500	0,3333	0,0909	0,0909	0,2273	0,0714	0,0625		0,2500		0,0769	0,0556	
	Alelo G	0,1154		0,1250	0,1667	0,0909			0,1429	0,0625				0,2692		
	Alelo H	0,0769*	0,4444	0,1250		0,0455*	0,0909							0,0385*	0,0556	
	Alelo I	0,0385*				0,0909			0,1364	0,1429				0,0769		0,3750
	Alelo J							0,1364	0,0455*					0,1923		
	Alelo K	0,1538				0,1364			0,0909	0,0714				0,1154		
	Alelo L	0,1154							0,0455*							
	Alelo M															
	Alelo N									0,2143						
	Alelo O	0,0385*					0,0909									
	Alelo P											0,1000				
	Alelo Q															
	Alelo R															
Raro Total	0,2694	0	0	0	0,0455	0,0890	0,1365	0	0	0	0,1000	0	0,1155	0	0	

Nota: (A) porta-enxertos sul-brasileiros, (B) porta-enxertos introduzidos, (C) porta-enxertos de outras espécies e (*) alelos raros ($f \leq 0,05$).

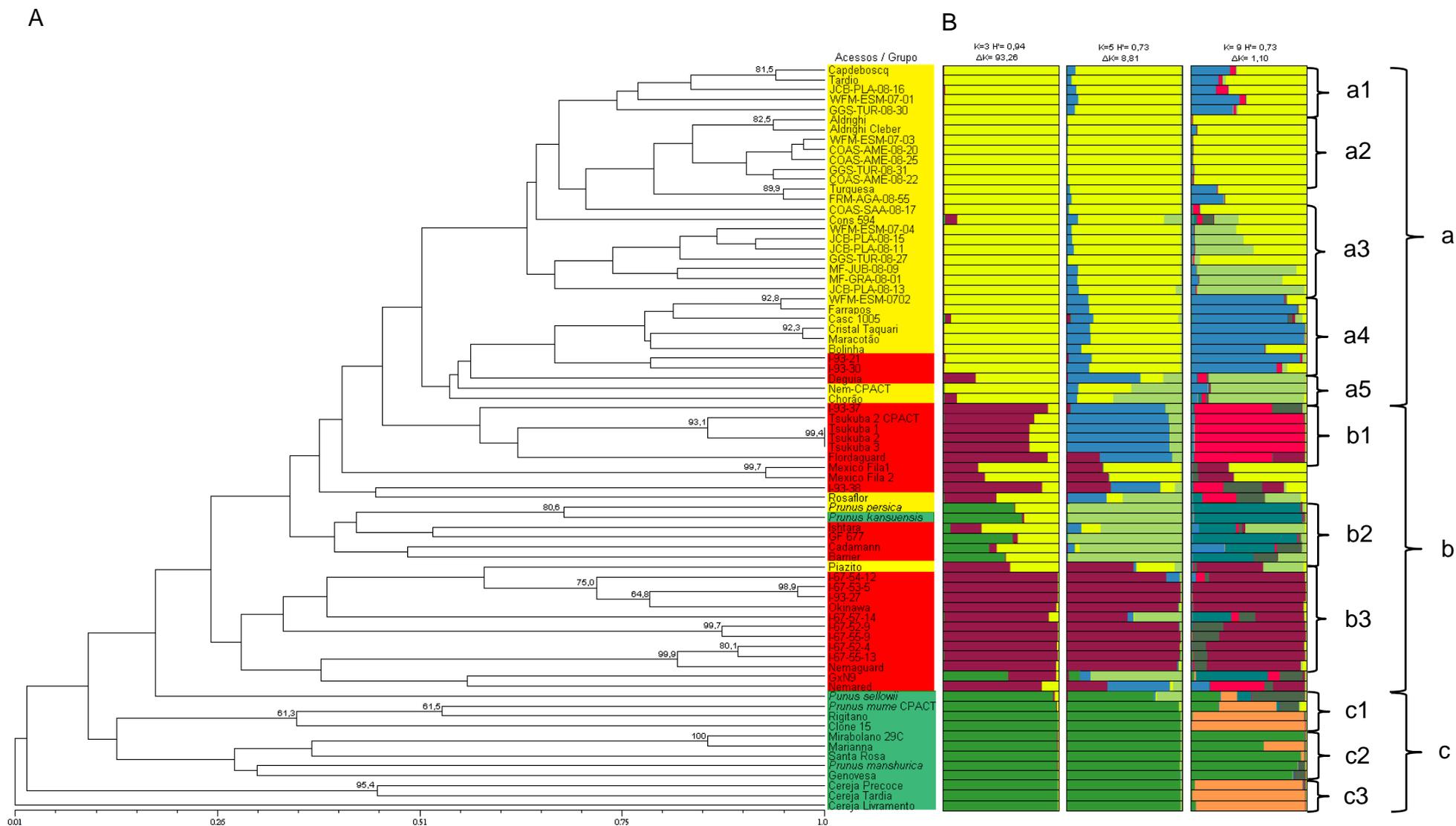


Figura 3. Agrupamento dos 75 acessos da coleção de porta-enxertos de *Prunus*. (A) Dendograma obtido através da análise de agrupamento UPGMA usando-se a matriz de distância genética gerada pelo coeficiente Nei & Li (1979) baseada na amplificação de 15 primers SSR via PCR. Os acessos estão identificados por grupo de acordo com cores: amarelo- sul-brasileiro, vermelho- introduzidos e verde- outras espécies. (B) Plot de estimativa da estrutura genética por diferentes valores de K , valores de similaridade média de pares permutados (H') e valores de delta K (ΔK).

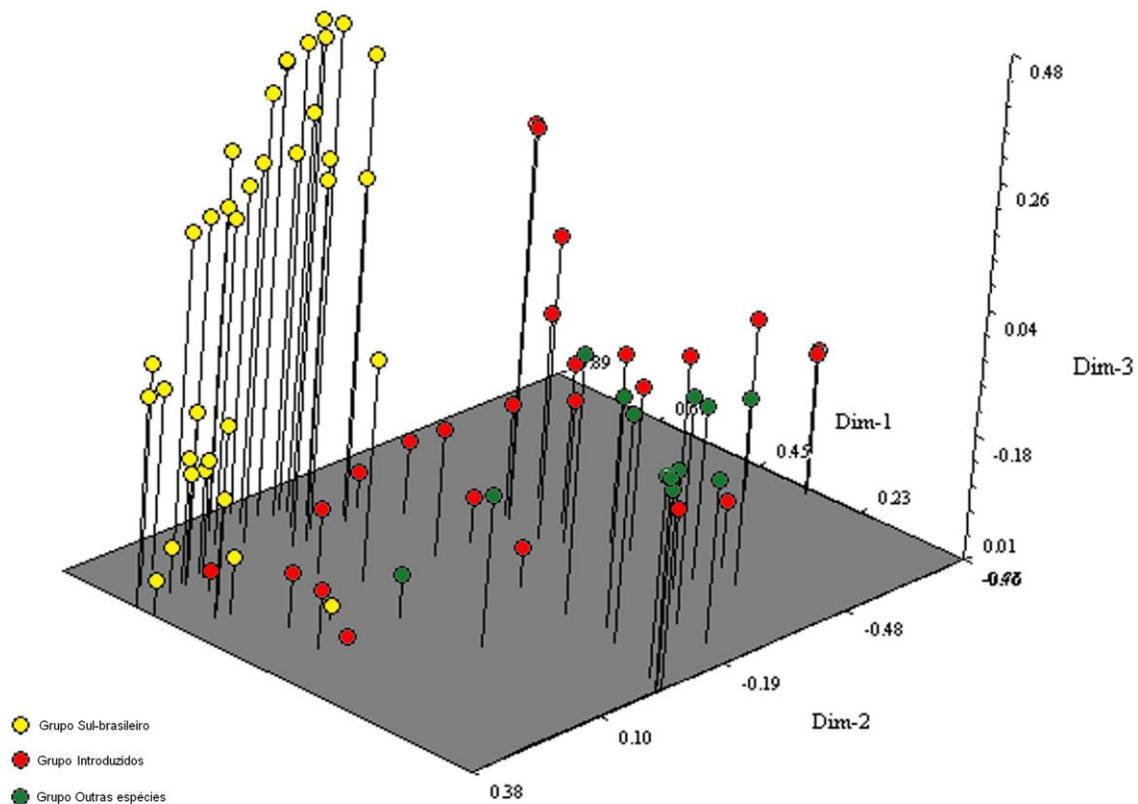


Figura 4. Dispersão tridimensional dos acessos da coleção de porta-enxertos de *Prunus*, baseada na Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Os valores das coordenadas principais são PCo1= 37,98%, PCo2= 7,31% e PCo3= 6,2%, obtidos pela análise Eigen através da matriz de distância genética Nei & Li (1979). Os grupos que compõem a coleção estão representados por diferentes círculos coloridos.

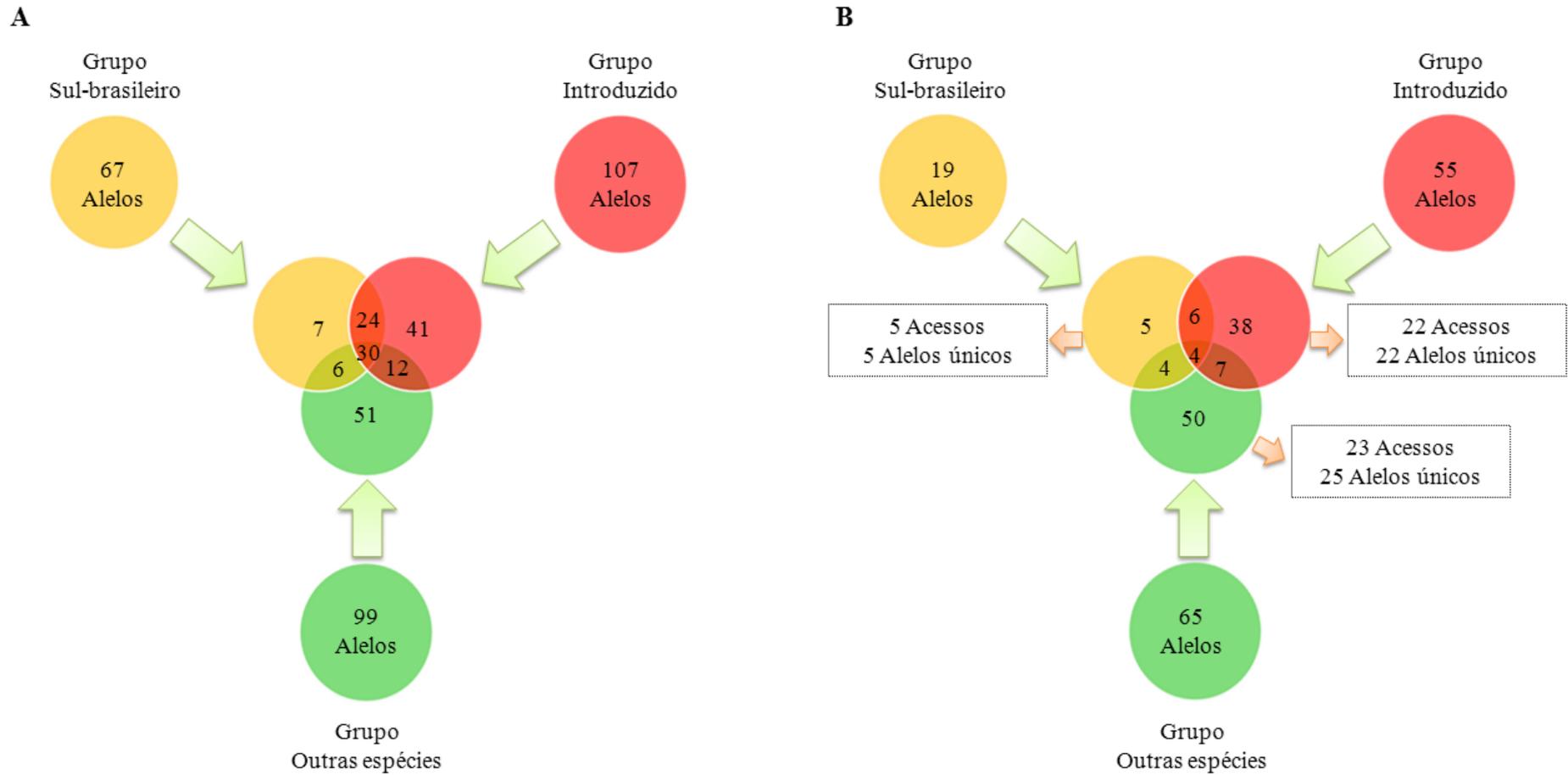


Figura 5. Representação gráfica descritiva da compartimentalização de alelos normais (A) e alelos de baixa frequência ($f \leq 0,05$) (B) dentro e entre os grupos que constituem a coleção de porta-enxertos de *Prunus*.

Tabela 7. Distância genética (diagonal abaixo) e identidade genética (diagonal acima) (Nei, 1978) entre os grupos de acessos que compõem a coleção de porta-enxertos de *Prunus*.

Grupos	Sul-brasileiros	Introduzidos	Prunus spp.
Sul-brasileiros	*****	0,7335	0,3055
Introduzidos	0,3100	*****	0,3783
Prunus spp.	1,1858	0,9720	*****

Tabela 8. Sumário da análise de particionamento de variância molecular entre grupos, entre acessos dentro de grupos e entre acessos da coleção de porta-enxerto de *Prunus*, com o teste de probabilidade de 1023 permutações (AMOVA) (Excoffier et al., 1992).

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Componentes de variância	Porcentagem (%)
Entre grupos	2	50,545	0,48	22,41
Entre acessos dentro de grupos	72	177,288	0,77	35,83
Dentre de acessos	75	68,00	0,90	41,76
Total	149	295,833	2,17	100

Nota: Nível de probabilidade de 0%.

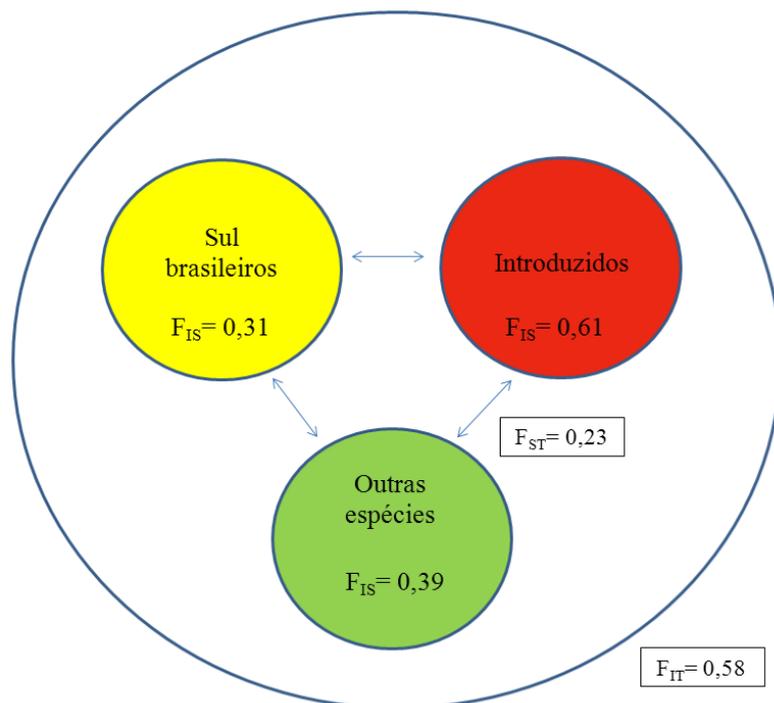


Figura 6. Estatísticas F obtidas pela análise de particionamento da variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) dos diferentes grupos de acessos que constituem a coleção de porta-enxerto de *Prunus*. F_{IS} - coeficiente de endogamia, F_{ST} - índice de fixação e F_{IT} - coeficiente de endogamia total. *Variações totais.



Figura 7. Diferenciação dos grupos de acessos de porta-enxertos de *Prunus* da coleção pelo coeficiente de endogamia (F_{IS}), obtido através da análise de particionamento da variância molecular (AMOVA) com teste de probabilidade de 1023 permutações.

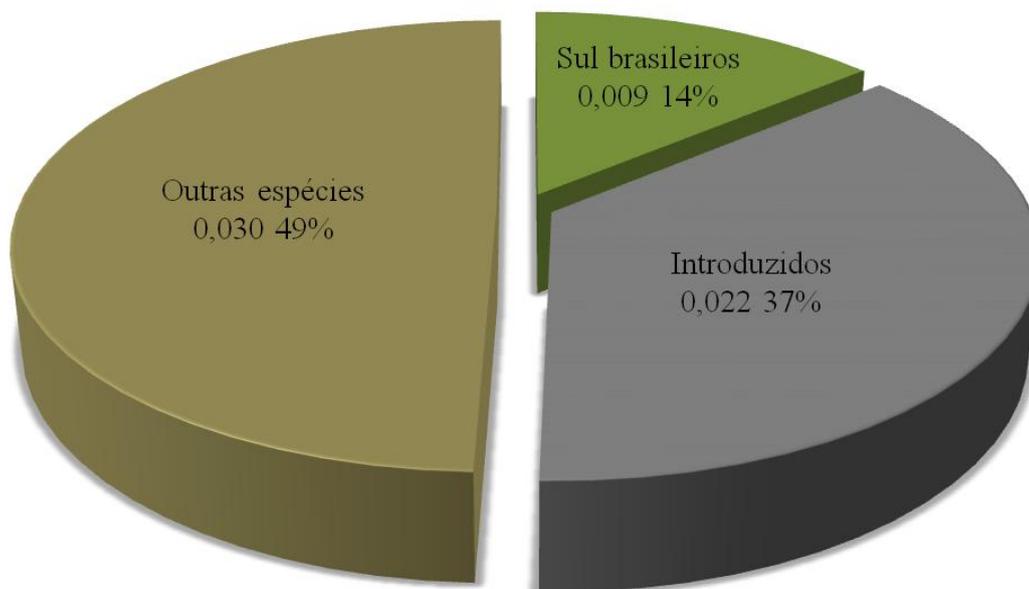


Figura 8. Coeficiente de endogamia médio (MF_{IS}) por acesso dentro dos diferentes grupos de porta-enxertos de *Prunus*, obtido através da análise de particionamento da variância molecular (AMOVA) com teste de probabilidade de 1023 permutações.

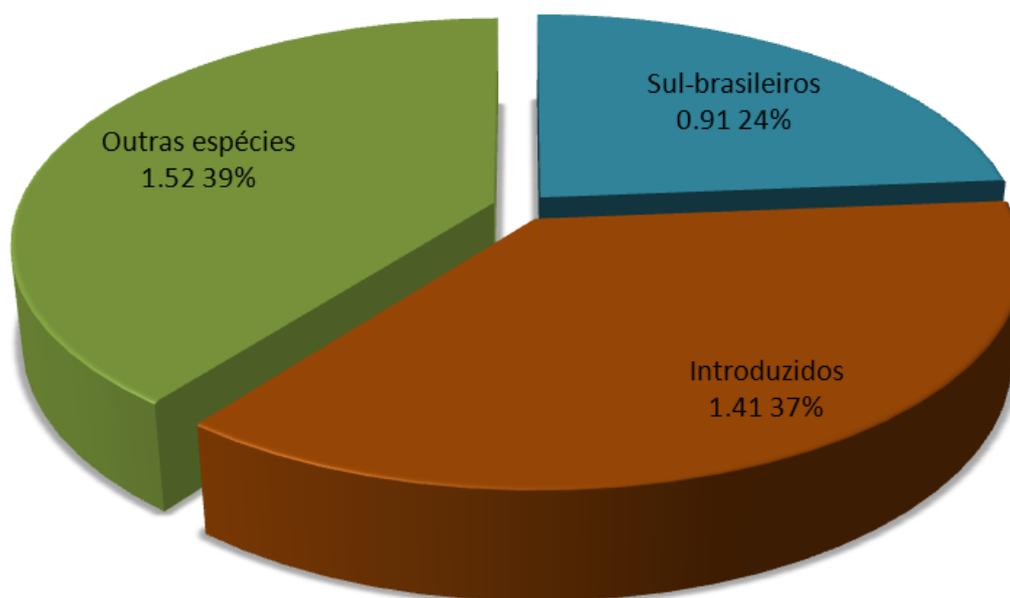


Figura 9. Distribuição de valores médios por *locus* do índice de informação de diversidade genética de Shannon (I) nos diferentes grupos de acessos de porta-enxertos de *Prunus* da coleção.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo através das avaliações fenotípicas e moleculares são complementares uns aos outros, pois a caracterização fenotípica apesar de ser onerosa, em função do tempo necessário para realização das análises, é considerada como indispensável aos programas de melhoramento e em estudos que objetivam estudar características intrínsecas a determinados caracteres morfológicos, não podendo desta forma ser substituída por nenhum outro tipo de caracterização.

Assim, a caracterização molecular é complementar a caracterização morfológica ou fenotípica, no entanto, esta não sofre influência de fatores ambientais, o que gera resultados satisfatórios. Os agrupamentos detectados pela abordagem hierárquica e pela Bayesiana através dos dados fenotípicos e moleculares geraram bons resultados, as quais identificaram diferentes pools constituídos em grande parte por acessos de grupos específicos, ou seja, acessos do grupo sul-brasileiro, introduzidos e de outras espécies. Além disso, foi possível verificar a relação existente entre os diferentes grupos.

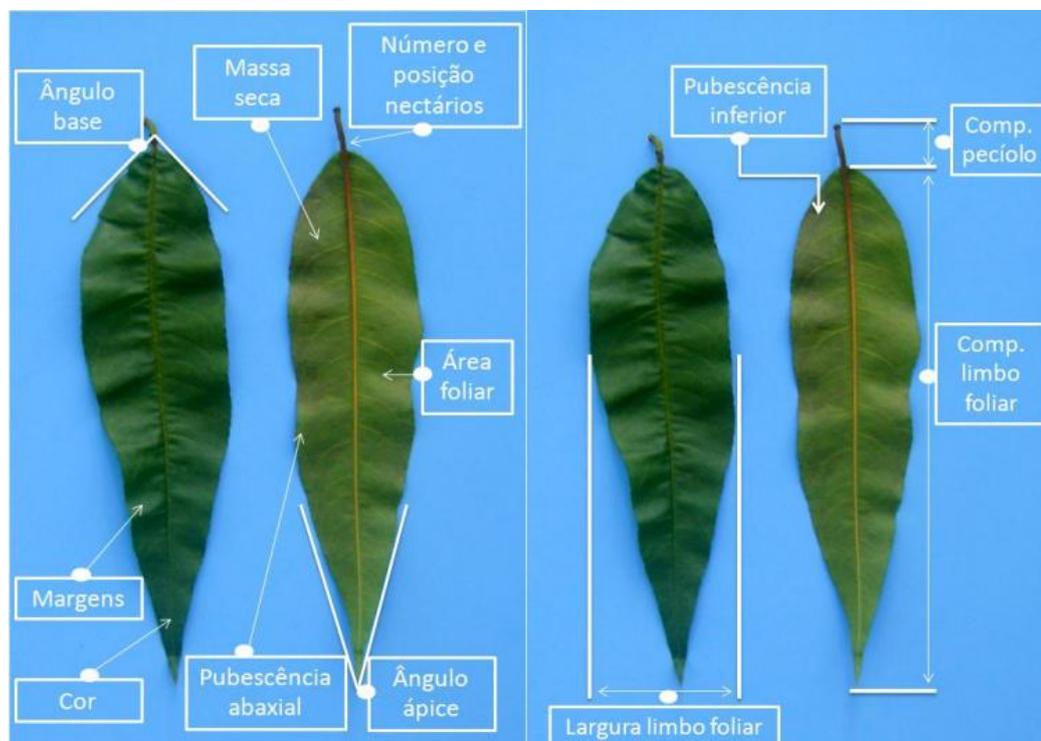
Nesta mesma linha de trabalho irá ser elaborado um terceiro artigo, pela sumarização dos resultados das avaliações fenotípicas e moleculares, o qual será possível selecionar com maior precisão acessos com características de interesse agrônomo, o que poderá ser usado para condução de cruzamentos controlados.

Desta maneira, este estudo servirá como base para futuros trabalhos de pesquisa na área de fisiologia vegetal e melhoramento genético de plantas.

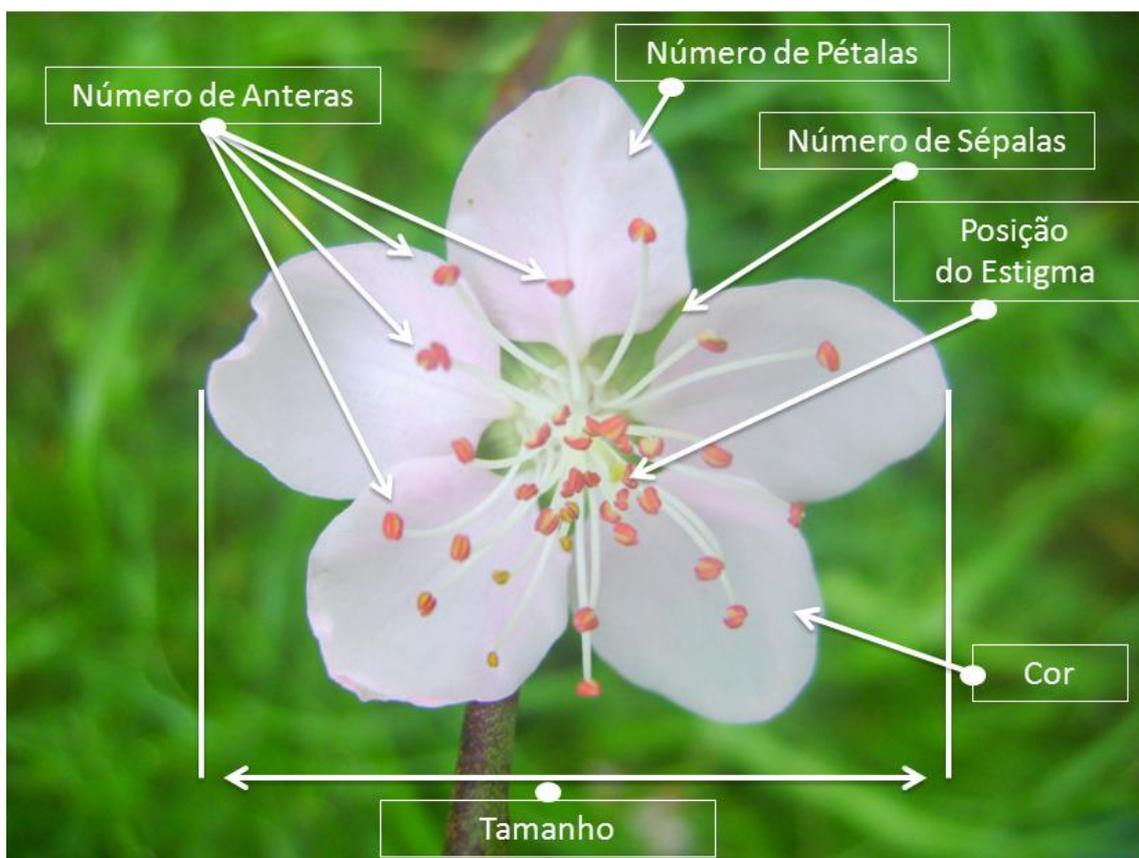
APÊNDICE



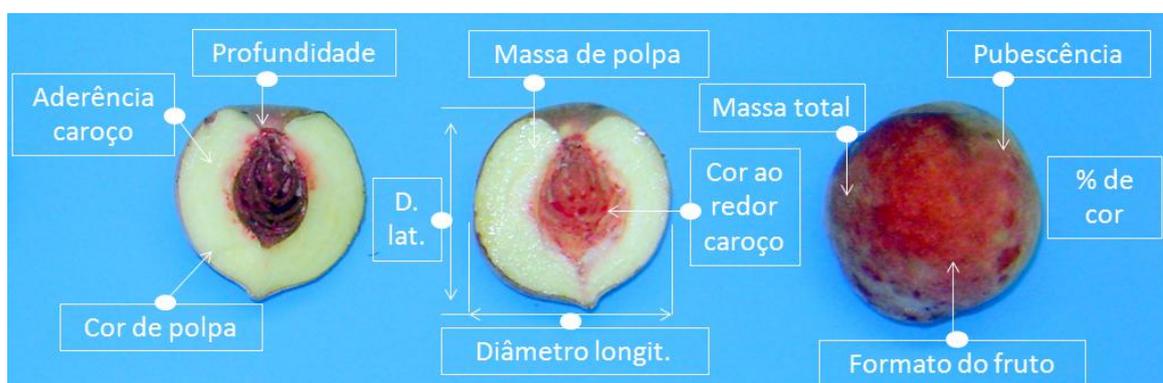
Apêndice 1. Acessos avaliados em estágio de desenvolvimento floral (reprodutivo) da coleção de porta-enxerto de *Prunus* avaliados neste estudo.



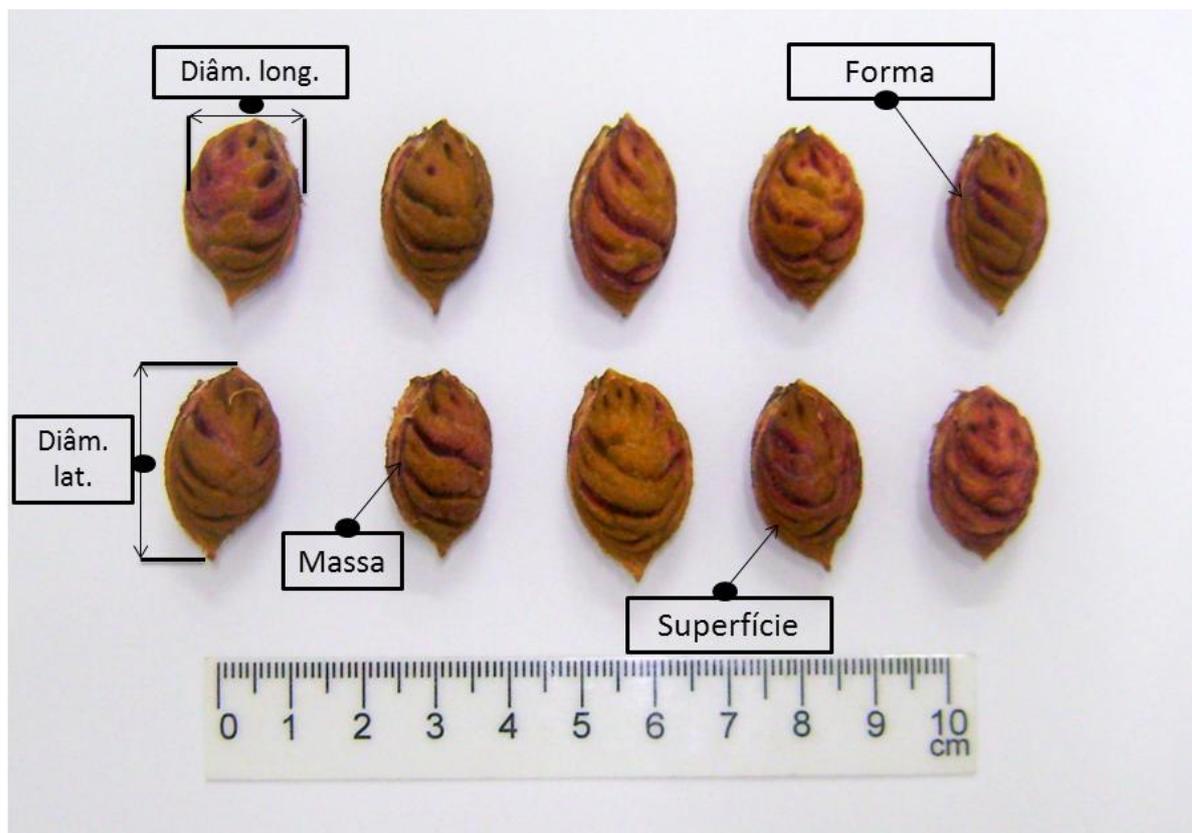
Apêndice 2a. Caracteres morfológicos avaliados no órgão folha dos acessos da coleção de porta-enxerto de *Prunus* avaliados neste estudo.



Apêndice 2b. Caracteres morfológicos avaliados no órgão flor dos acessos da coleção de porta-enxerto de *Prunus* avaliados neste estudo.



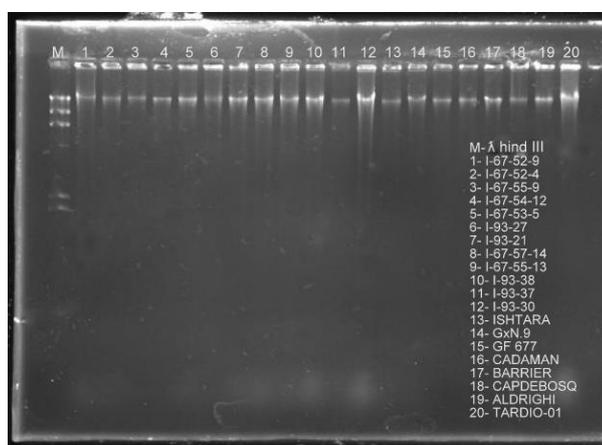
Apêndice 2c. Caracteres morfológicos avaliados no órgão fruto dos acessos da coleção de porta-enxerto de *Prunus* avaliados neste estudo.



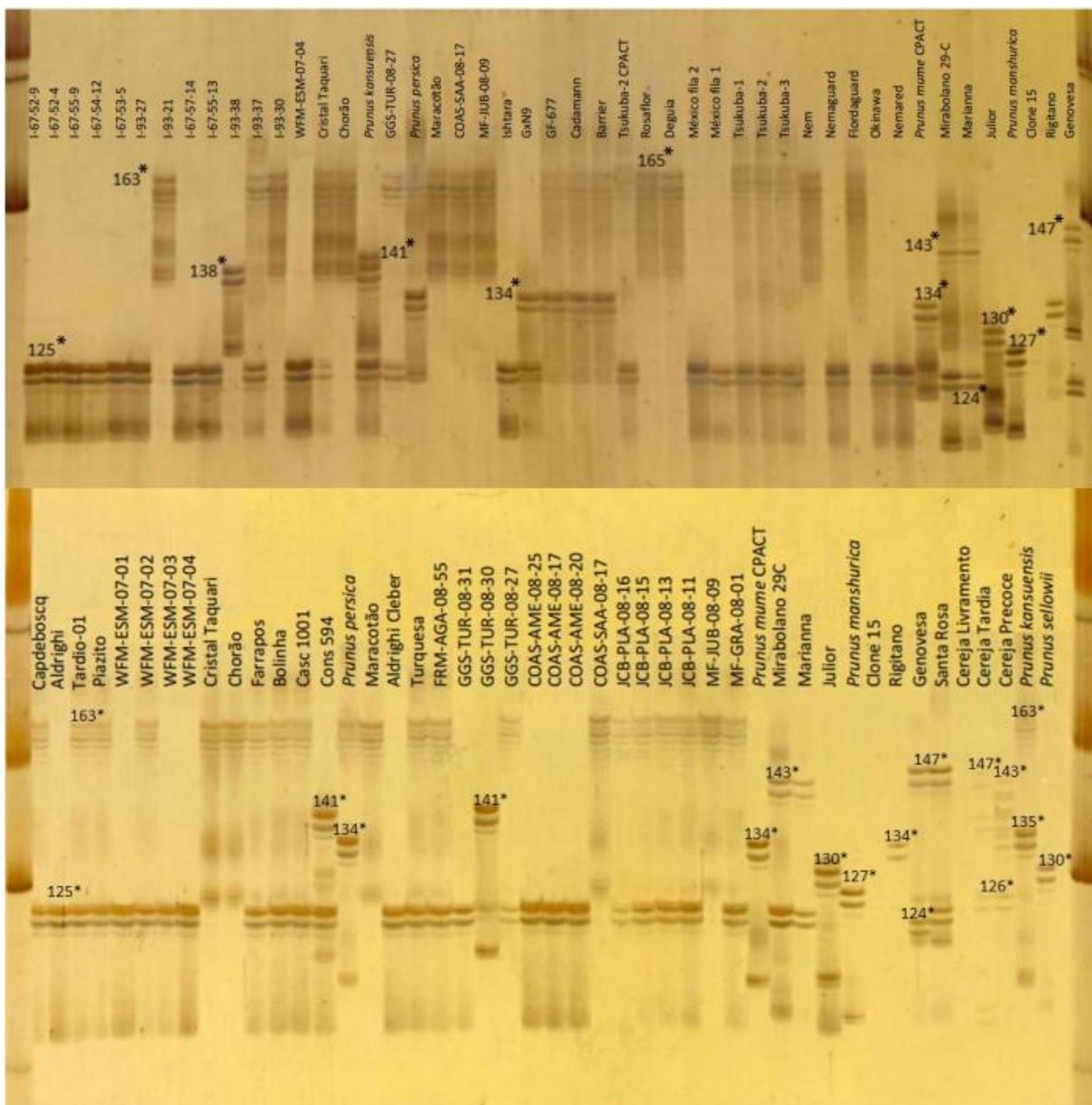
Apêndice 2d. Caracteres morfológicos avaliados no órgão caroço dos acessos da coleção de porta-enxerto de *Prunus* avaliados neste estudo.



Apêndice 3. Ilustração da metodologia de análise molecular dos acessos que constituem a coleção de porta-enxerto de *Prunus* avaliados neste estudo.



Apêndice 4. Gel de agarose utilizado para a quantificação de DNA dos acessos da coleção de *Prunus* avaliados neste estudo.



Apêndice 5. Perfil eletroforético obtido pela avaliação do *locus* UDP96008 nos acessos da coleção de porta-enxerto de *Prunus* avaliados neste estudo. * Tamanho do alelo em pares de bases (pb).