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

Espaço dedicado aos dados de catalogação

Banca examinadora:

Prof. Dr. Valmor João Bianchi (Presidente)

Prof. Dr. Willian Silva Barros

Dr[a]. Caroline Marques Castro

Dr. Sandro Bonow (Suplente)

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 Letícia 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. Nº de pag. 103. 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 ao nível morfológico e molecular de 75 acessos de porta-enxertos de Prunus spp. do banco de germoplasma da EMBRAPA Clima Temperado. As análises morfológicas 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 e de relação genética. Os dados moleculares foram convertidos primeiramente para diferentes formatos e submetidos às diferentes análises estatísticas. O dendograma UPGMA obtido através da matriz de similaridade genética de Nei & Li, utilizando os dados dos loci SSR avaliados, não foi capaz de distinguir os acessos Tsukuba-1, Tsukuba-2 e Tsukuba-3, no entanto, os dados morfológicos mostraram-se eficazes para distingui-los. Os dendogramas de ambas as análises juntamente com os resultados das abordagens Bayesianas possibilitaram a identificação de três pools genéticos com alta relação genética com os diferentes grupos que compõem o banco de germoplasma. Verificou-se que análise de componentes principais, baseada em dados morfológicos, mostrou-se mais eficaz para a detecção dos três pools genéticos detectados com o dendograma e com a abordagem Bayesiana. Com os dados moleculares, a análise de componentes principais corroborou os resultados obtidos pelo dendograma de similaridade e pela abordagem 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 alta similaridade genética, acima de 0,49 por ambas as análises, com os acessos Aldrighi e Capdeboscq, e outro acessos conhecidos. Estes acessos foram tradicionalmente usados no passado como porta-enxertos no estado do Rio Grande do Sul. Por

ambas as análises morfológicas e moleculares, o grupo de acessos de outras espécies foi proporcionalmente quem mais contribuiu para a diversidade genética, como já era esperado, pois são espécies diferentes e com baixa similaridade das características. A caracterização genética por ambas as técnicas de análise mostrou-se efetiva para a elucidação da diversidade, estrutura e relação genética do banco de germoplasma.

Palavras-chave: *Prunus spp.*, SSR, diversidade morfológica e genética, relação genética, estrutura genética, categorização de dados, 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. 103. Master's thesis – Graduate Program of Plant Physiology. Federal University of Pelotas, Pelotas- Brazil.

Abstract: This study aimed to assess the diversity, structure and genetic relationship to the morphological and molecular level of 75 accessions of rootstocks of *Prunus* spp. germplasm bank of EMBRAPA Temperate Climate. The morphological analyzes were conducted for the evaluation of 21 qualitative and 26 quantitative characters of different plant organs, and molecular analyzes were based on an evaluation of 17 SSR *loci*. The data of quantitative traits were categorized by the method of grouping Scott & Knott and submitted along with the qualitative data to statistical analysis and clustering of genetic relationship. Molecular data were first converted to different formats and subjected to various statistical analyzes. The UPGMA dendogram obtained by genetic similarity matrix Li & Nei, using the data of SSR *loci* evaluated was not able to distinguish between accesses Tsukuba-1, Tsukuba-2 and Tsukuba-3, however, showed morphological is effective to distinguish them. The dendograms of both analyzes together with the results of Bayesian approaches allowed the identification of three gene pools with high genetic relation with the different groups that make up the germplasm bank. It was found that principal component analysis based on morphological data, proved most effective for the detection of three gene pools detected with the dendogram and the Bayesian approach. With the molecular data, the principal components analysis corroborated the results obtained by the dendogram of similarity and the Bayesian approach. The access group originating from South Brazilian samples collected in orchards in the region of Pelotas, which have no known pedigree, had largely high genetic similarity, up 0.49 per both analyzes, with access Aldrighi and Capdeboscq, and other known accessions. These accessions were traditionally used in the past as rootstocks in the state of Rio Grande do Sul By both morphological and molecular analyzes, the group access of other species was proportionately more who contributed to genetic diversity, as expected, because are different species and with low similarity of features. Genetic

characterization by both analysis techniques proved effective for elucidating the diversity, structure and genetic relatedness of the germplasm bank.

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

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL 15
Referências bibliográficas 18
ARTIGO 1
Caracterização morfológica de porta-enxertos de *Prunus* com base em análise multivariada, Bayesiana, diversidade e relação genética pelo uso de dados categorizados 20
Introdução 24
Material e métodos 25
Material Vegetal 25
Descritores morfológicos 26
Análise de dados 26
Categorização de dados 26
Análise multivariada 26
Parâmetros de diversidade genética 27
Agrupamento dos acessos baseado em abordagem Bayesiana 27
Relação genética dentro e entre os grupos 28
Resultados 28
Diversidade genética 28
Identificação de diferentes acessos 28
Relação genética entre acessos e estrutura genética 29
Relação genética entre grupos 30
Discussão 30
Categorização de dados 30
Diversidade genética 31
Relação genética entre acessos e estrutura genética 31
Relação genética entre grupos 33
Conclusões 34
Agradecimentos 34
Referências bibliográficas 35

ARTIGO 2

Estimativa da diversidade, estrutura e relação genética de porta-enxertos de *Prunus* baseadas na avaliação de *loci* SSR 53
Introdução 57
Material e métodos 59
Material vegetal 59
Extração de DNA 59
Amplificação de DNA 60
Análise dos dados 60
Análise de géis e conversão de arquivos 60
Parâmetros de diversidade genética 61
Agrupamento dos acessos 61
Agrupamento dos acessos baseado em abordagem Bayesiana 62
Relação genética dentro e entre os grupos 62
Resultados 62
Análise conjunta da diversidade genética 62
Variabilidade genética entre acessos coletados na região sul do Brasil 63
Variabilidade genética entre acessos introduzidos no Brasil 64
Diversidade genética entre acessos do grupo de outras espécies 65
Identificação de diferentes acessos 66
Relação genética entre acessos e estrutura genética 66
Relação genética entre grupos 67
Análise descritiva 67
Parâmetros de relação genética de Nei e análise de variância molecular 68
Discussão 68
Polimorfismo de *loci* SSR 68
Agrupamento e estrutura genética 70
Relação genética entre grupos de acessos 73
Análise descritiva 73
Parâmetros de relação genética de Nei e análise de variância molecular 74
Conclusões 74
Agradecimentos 75
Referências bibliográficas 76

CONSIDERAÇÕES FINAIS 98
APÊNDICE.....99

INTRODUÇÃO GERAL

A produção mundial de frutas no ano de 2010 foi de 609,36 milhões de toneladas. 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 pêssego, 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 brasileira.

O Rio Grande do Sul, maior produtor brasileiro, 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 consequentemente 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 coroços 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 agronômico 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 consequentemente 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 bancos 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.

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 agronômicas das plantas. Essa variabilidade se deve a mistura varietal dos caroços, normalmente

derivada de cultivares-copa de ciclo tardio, que apresentam grande heterozigozidade.

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 agronômicas 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, consequentemente, 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 um banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus* pertencente a EMBRAPA Clima Temperado, intitulado “Coleção porta-enxerto de Prunus”, bem como estimar a relação genética existente entre os acessos e o grupo de acessos que compõem o banco de germoplasma, 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 genética do banco de germoplasma, e elucidação da relação genética existente entre acessos e entre os grupos que constituem o banco, com base na avaliação de caracteres morfológicos; 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

Caracterização morfológica de porta-enxertos de *Prunus* com base em análise multivariada, Bayesiana, diversidade e relação genética pelo uso de dados categorizados

(Artigo a ser submetido à revista Genetics Resources and Crop Evolution)

Caracterização morfológica de porta-enxertos de *Prunus* com base em análise multivariada, Bayesiana, diversidade e relação genética 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: l.willianpacheco@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, consequentemente, 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 um banco de germoplasma da EMBRAPA Clima Temperado. O objetivo foi elucidar a estrutura e a diversidade genética, bem como a relação genética existente entre os acessos e entre os grupos de acessos que compõem o banco de germoplasma, baseada na análise de caracteres morfológicos. As análises morfológicas 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 genética. O dendograma UPGMA obtido através da matriz de similaridade genética de Jaccard, não mostrou perfis genéticos idênticos, e esta análise de agrupamento juntamente com a abordagem Bayesiana do software STRUCTURE possibilitou a identificação de três grandes pools genéticos com alta relação com os diferentes grupos que compõem o banco de germoplasma. Entretanto, a análise de componentes principais mostrou-se mais eficaz para a identificação dos três pools genéticos 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 genética mínima de 0,49 com os acessos Aldrighi e Capdeboscq, e máxima de 0,64 de 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 genéticas globais existentes entre os três grupos foi baixa (17,46%), com contribuição similar de ambos os grupos para a diversidade genética. 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 genética possibilitaram elucidar eficientemente a diversidade genética existente no banco de germoplasma.

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

Abstract: The introduction of peach orchards in Brazil occurred by the current state of São Paulo, for 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 agribusiness, 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 fitness and health, susceptible to pests and diseases, and low tolerance to environmental stresses. This study focused on the characterization of morphological diversity of a germplasm bank of Embrapa Clima Temperado. The aim was to elucidate the structure and genetic diversity, and genetic relationships among the accessions and between groups of accessions comprising the germplasm bank, based on analysis of morphological characters. The morphological analyzes were conducted by review of 21 qualitative and 26 quantitative characters of different plant organs. The data of quantitative traits were categorized by the method of grouping Scott & Knott, and submitted along with the qualitative data to cluster analysis, diversity and genetic relationship. The UPGMA dendrogram obtained by genetic similarity matrix of Jaccard, showed no identical genetic profiles, and this cluster analysis with the software STRUCTURE Bayesian approach allowed the identification of three large pools with high genetic relation with the different groups that make up the genebank. However, the principal component analysis proved more effective for the identification of three gene pools detected with the dendogram and the Bayesian approach. The access group originating from South Brazilian collections in orchards south of the Rio Grande, have no known pedigree, but 33.3% showed genetic similarity of 0.49 with the minimum access and Aldrighi Capdeboscq, and the maximum of 0.64 Cons 594. Of these known hits, the first two were traditionally used in the past as rootstocks in the state of Rio Grande do Sul. Genetic differences overall between the three groups was low (17.46%), with similar contribution of both groups to genetic 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 efficiently elucidate possible genetic relationship to genetic diversity in germplasm bank.

Keywords: *Prunus* spp. · morphologic diversity · genetic relationship · genetic structure · data categorization · 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 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 consequentemente 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 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 agronômicas 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 consequentemente 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 a *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 CPACT (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Centro de Pesquisa Agropecuária em 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 bancos de germoplasmas 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 caracterização de acessos (Bianchi et al., 2004a; Bianchi et al., 2004b), a identificação e seleção de genótipos resistentes ao ataque de nematóides das galhas (*Meloidogyne incognita*) (Paula et al., 2011) e a morte precoce do pessegueiro, tolerantes ao estresse hídrico (Martinazzo et a., 2011), além da busca de genótipos que melhorem a produção e a qualidade dos frutos (Picolotto et al., 2012; Picolotto et al., 2010; Picolotto et al., 2009).

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 agronômico.

No contexto de bancos de germoplasma, a caracterização da variabilidade e da diversidade genética dos acessos é de suma importância para a condução de cruzamentos controlados específicos. A tradicional metodologia de caracterização genética 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).

Frente ao exposto, o presente estudo objetivou caracterizar a diversidade genética e elucidar a estrutura genética de um banco de germoplasma porta-enxertos de *Prunus* da EMBRAPA Clima Temperado, o qual é intitulado "Coleção porta-enxerto de *Prunus'*, e analisar a relação genética existente entre os acessos e entre os grupos de acessos que compõem o banco, com base na avaliação de caracteres morfológicos.

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) pertencente à Sede da Embrapa Clima Temperado (Figura 1 e Apêndice 1), sendo constituídos por 35 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; 27 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 análises dos caracteres morfológicos foram realizadas para caracterizar a diversidade genética dos acessos do banco de germoplasma. A lista dos materiais vegetais utilizados neste estudo está descrita na tabela 1.

Descritores morfológicos

As análises foram conduzidas pela avaliação de 47 caracteres morfológicos, de acordo com os descritores do MAPA (MAPA, 2008), sendo 21 qualitativos e 26 quantitativos, relacionados à folha (Figura 1), flor (Figura 2) e fruto (Figura 3), e o número de repetições para cada tipo de órgão variou de 10 a 20. As mensurações foram realizadas com o auxílio de paquímetro digital para medir comprimentos, larguras e diâmetros; e balança analítica de precisão para massa fresca e seca. 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 dos caracteres morfológicos quantitativos foram submetidos à análise de variância e posteriormente a análise de agrupamento pelo método de máxima verossimilhança Scott & Knott (1974). Ambas as análise foram realizadas sob o software GENES Ver. 7.0 (Cruz, 2006). Os resultados obtidos pela análise de agrupamento foram convertidos para dados qualitativos e subsequentemente para diferentes formatos 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 foram submetidas à análise de similaridade 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 dos autovalores de componentes principais (PCA). Os resultados desta análise foram representados em gráfico tridimensional. Ambas as análises e a representação gráfica foram também realizadas no 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 (Na) e efetivos (*Ne= 1/1-He*) (Hartl and Clark, 1989), e índice de informação de Shannon ($D = -\sum pi \ln pi$) (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 genética dos caracteres morfológicos.

Agrupamento dos acessos baseado em abordagem Bayesiana

A estrutura genética do banco de germoplasma 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 empregada para a obtenção do dendograma, componentes principais e para a análise dos parâmetros de diversidade genética. 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) 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 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 dentro e entre os grupos

A análise de variância foi calculada para verificar a relação genética existente entre grupos e de acessos dentro de grupos do banco de germoplasma. Esta análise foi computada com os dados da matriz binária utilizando a metodologia descrita por Excoffier et al. (1992) para dados qualitativos. O teste de significância da análise de 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 morfológicos compreendendo caracteres qualitativos e quantitativos. Os 21 caracteres qualitativos avaliados geraram 62 formas alternativas variando de duas (coloração da folha em estádio maturo, pubescência foliar na face abaxial, coloração das flores, etc.) a cinco (coloração do fruto em estádio 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 a abundância da diversidade genética 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.

Os resultados dos parâmetros de diversidade genética estão sumarizados na tabela 3, identificados de acordo com sua classificação, qualitativo ou quantitativo.

Identificação de diferentes acessos

Os resultados provenientes das avaliações dos caracteres qualitativos e quantitativos foram utilizados para discriminar os acessos do banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus*. A

combinação dos resultados distinguiram os 75 acessos do banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus*.

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 5), o qual foi obtido pelo algoritmo UPGMA, a partir da matriz de similaridade genética calculada pelo coeficiente de Jaccard pela avaliação de 47 caracteres morfológicos qualitativos e quantitativos. O teste de Mantel foi empregado para verificar o grau de confiabilidade entre a matriz de similaridade 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 genética existente dentro do banco de germoplasma, a qual variou de 0,15 a 1,00, mostrando uma variação de até 85,0% entre os acessos.

A abordagem Bayesiana foi empregada neste estudo para auxiliar a identificação de pools genéticos juntamente com a análise de agrupamento clássico, 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 Δ*K* de 5,3 e o *K*=9 o valor de 6,20. Entretanto, o melhor valor de Δ*K* 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 genéticos, identificados na Figura 5B como: ‘a’ abrangendo 88,88% dos acessos sul-brasileiros e 24% de introduzidos; ‘b’ abrangendo 56% dos acessos introduzidos, 12 dos sul-brasileiros e 7,15% dos acessos de outras espécies de *Prunus*. 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 clássica de agrupamento baseada em dendograma (UPGMA).

A análise de componentes principais (PCA) possibilitou representar e verificar o grau de diversidade genética 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 PCA apresentou autovalores de: PC1= 31,51%, PC2= 4,72% e PC3= 4,03%. O somatório dos componentes principais representam 40,26%, sendo o PC1 o componente que mais representa a diversidade genética do banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus*.

Relação genética entre grupos

A análise de particionamento da variância da diversidade morfológica 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 morfológicos 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 morfológica estão descritos de forma mais detalhada na tabela 5. A contribuição de cada grupo para a diversidade morfológica do banco de germoplasma variou muito pouco entre os grupos. O grupo de acessos de porta-enxertos sul-brasileiros contribuiu com 35% da diversidade morfológica, com índice de F_{ST} de 0,18. O grupo de acessos de porta-enxertos introduzidos contribuiu com 34% da diversidade morfológica 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 do banco de germoplasma. 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 genética, 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 genéticos, pois as análises de diversidade e relação genética são mais abundantes para dados genético-moleculares, sendo restrito para dados de caracteres morfológicos quantitativos. A categorização de dados quantitativos possibilita sua conversão para qualitativos e subsequentemente a análise em diferentes softwares genético-moleculares. O método estatístico de máxima verossimilhança Scott & Knott (1974) foi empregado neste estudo devido aos seus resultados serem expressos em uma única letra, ao contrário dos métodos clássicos que utilizam comparação de médias, a exemplo dos testes de Tukey (1960) e Duncan (1955). Esta metodologia foi eficaz para a computação de diferentes análises genéticas. Neste contexto, Jaradat et al. (2004) empregaram metodologia alternativa através da categorização de dados quantitativos para a computação de diversos parâmetros em software de dados genético-moleculares, as quais possibilitaram elucidar a diversidade genética.

Diversidade genética

Os resultados de diversidade genética obtidos neste estudo foram através da categorização dos dados morfológicos. 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 clássicas. Neste contexto, a categorização de dados morfológicos para elucidação da diversidade mostrou-se uma eficiente técnica.

Relação genética entre acessos e estrutura genética

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 (Thornsberry 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., 2003). Em espécies do gênero *Prunus* esta abordagem também tem sido 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 genética do banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus* pela abordagem Bayesiana e para a elucidação da relação genética entre os acessos pela abordagem clássica de agrupamento, a de dendograma.

A abordagem Bayesiana corrobora em grande parte com os agrupamentos gerados pelo dendograma UPGMA. 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 clássica de agrupamento, dendograma, as quais possibilitaram a detecção de três pools genéticos, ‘a’, ‘b’ e ‘c’.

O pool genético ‘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, consequentemente, 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 pela abordagem Bayesiana e pela clássica (dendograma) para os diferentes acessos coletados em produtores rurais e para as cultivares copas de pessegueiros.

O grupo de acessos sul brasileiro com genealogia desconhecida, apenas 33,3% dos acessos apresentaram relação genética com acessos conhecidos, ou seja, similaridade genética observada 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). O banco de germoplasma avaliado é constituído por dois acessos de Aldrighi, sendo que estes acessos não se agruparam lado-a-lado com alta similaridade genética, fato este que é justificado pela existência de inúmeras variedades deste genótipo na região sul do Brasil (comunicação pessoal, 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 estes serem adaptados 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 gênico ‘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, que mostraram-se idênticos pela análise molecular de *loci* SSR (Artigo 2 da dissertação), porém baseado na análise de caracteres morfológicos deste estudo detectou-se dissimilaridade entre estes acessos, sendo Tsukuba-1 o mais dissimilar entre os Tsukubas. A relação genética entre Flordaguard e Tsukuba-1 com os acessos Tsukuba-2, Tsukuba-3 e Tsukuba-2 CPACT foi maior para Flordaguard. Os acessos Tsukubas provavelmente sejam originários de uma mesma população, sendo que os caracteres qualitativos avaliados não foram capazes de discrimina-los, devendo essa maior relação do acesso Flordaguard com Tsukuba-2, Tsukuba-3 e Tsukuba-2 CPACT aos caracteres quantitativos avaliados. O acesso GxN9 é um cruzamento entre Garfi e Nemared (genealogia na Tabela 1), porém neste estudo estes acessos se apresentaram com baixa similaridade genética, apesar de agruparem-se lado-a-lado. GxN9 apresentou maior similaridade com o acesso GF-677 (genealogia na Tabela 1), devendo essa relação ao fato de GF677 ter em sua genealogia uma cultivar de damasqueiro, da mesma forma que GxN9, ou seja, tem como ancestral o damasqueiro cv. Garfi.

Na análise molecular baseada em *loci* SSR (Artigo 2 da dissertação), Nemared e GxN9 agrupando-se lado-a-lado com similaridade genética de 0,56. Desta forma, os resultados obtidos pela avaliação dos caracteres morfológicos não corroboram com os resultados obtidos pela analise 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. Estes acessos são originários de outros países e por isso não pode-se inferir relação genética com os acessos sul-brasileiros.

O pool genético ‘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

morfologicamente 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 genética 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 frutos. 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 componentes principais (PCA) pelas três primeiras dimensões embora sejam inferiores a 60% (40,26%), esta análise foi mais eficientes para a identificação dos mesmos três pools genéticos detectados através do dendograma e da abordagem Bayesiana. A explicação de 60% da diversidade genética existente no banco de germoplasma de porta-enxerto de *Prunus* somente ocorre com a sumarização dos 13 primeiros componentes principais.

Relação genética entre grupos

A análise de particionamento da variância teve como finalidade verificar a relação genética existente entre os grupos de acessos de porta-enxertos de *Prunus* do banco de germoplasma. A diferença existente entre os grupos foi baixa (17%), resultado este que é justificado ao fato de haver uma alta porcentagem de características similares existente entre os grupos, como pode ser observado pela análise de agrupamento em 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 genética do banco de germoplasma, pois este é o grupo que possui maior homogeneidade de características morfológicas entre os acessos. Proporcionalmente, o grupo de acessos de outras espécies foi o de maior contribuição para a diversidade genética, como já era esperado, pois a maior diversidade de características morfológicas 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 é de suma importância aos programas de melhoramento genético vegetal, pois possibilita a identificação de genótipos que são capazes de conduzir-se cruzamentos, ou seja, férteis, com características de interesse agronômico, 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 deste mesmo banco de germoplasma 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 agronômico para cruzamentos posteriores.

Conclusões

O método de categorização dos dados obtidos a partir da avaliação de caracteres quantitativos possibilita, juntamente com os dados qualitativos, a realização de uma única análise de agrupamento, o emprego destes mesmos dados para diferentes análises de diversidade genética, particionamento da variância, e para elucidar a estrutura genética de bancos de germoplasma e populações pelo uso de abordagens Bayesianas.

Neste estudo, foi possível verificar a relação genética existente entre os acessos sul-brasileiros que não possuem genealogia elucidada, com acessos conhecidos, através da abordagem de agrupamento UPGMA e da Bayesiana. Além disso, a relação genética entre grupos e a estrutura do banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus* foram elucidadas com sucesso através dos caracteres morfológicos avaliados, sendo estes eficazes para a caracterização genética de espécies do gênero *Prunus*.

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.

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 dupê 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.

Excofier, 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 frequence. 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. 2010. 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, AV; 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 rescherches 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; Etminani, 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, populationgenetics 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 distingüibilidade, 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 distingüibilidade, 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. Yeld and fruit quality of peach scion by using rootstoks 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; Schimitz, JD; Pasa, MS; Bianchi, VJ; Fachinello, JC. 2012. Desenvolvimento vegetativo e produtivo da cultivar 'Maciel' em diferentes porta-enxertos. Ciência Rural (UFSM. 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.

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.

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. 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.

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

Tabela 1. Continuação...

Porta-enxertos introduzidos	Espécie	Origem	Referência
I-67-52-9	*P. persica* (Okinawa/SuATon)	Desconhecida	Desconhecida
I-67-52-4	*P. persica* (Okinawa/SuATon)	Desconhecida	Desconhecida
I-67-55-9	*P. persica* (Nemaguard PA)	Desconhecida	Desconhecida
I-67-54-12	*P. persica* (Okinawa PA)	Desconhecida	Desconhecida
I-67-53-5	*P. persica* (Okinawa)	Desconhecida	Desconhecida
I-93-27	*P. persica* (Okinawa PA)	EUA	Desconhecida
I-93-21	*P. persica* (S82 Seleção)	EUA	Desconhecida
I-67-57-14	*P. persica* (Okinawa/ S37)	Desconhecida	Desconhecida
I-67-55-13	*P. persica* (Nemaguard PA)	Desconhecida	Desconhecida
I-93-38	*P. persica* (Live Oak)	EUA	Desconhecida
I-93-37	*P. persica* (PI 106062 PA)	EUA	Desconhecida
I-93-30	*P. persica* (Introduzido PA)	EUA	Desconhecida
Outras espécies (*Prunus* spp.)			
Cereja Livramento	*P.* sp.	Brasil	EMBRAPA CPACT
Cereja Tardia	*P.* sp.	Brasil	EPAGRI
Cereja Precoce	*P.* sp.	Brasil	EPAGRI
Mirabolano 29C	*P. cerasifera*	EUA	Okie (1987)
Clone 15	*P. mume*	Brasil	Desconhecida
Rigitano	*P. mume*	Brasil	Desconhecida
P. mume CPACT	*P. mume*	Brasil	Desconhecida
Marianna	*P. cerasifera* x *P. munsoniana*	Desconhecida	Desconhecida
Santa Rosa	*P. salicina* x *P. simonii* x *P. americana*	Desconhecida	Burbank (1907)
Genovesa	*P. salicina*	Desconhecida	Desconhecida
Julior	*P. insititia* x *P. domestica*	Desconhecida	Desconhecida
P. kansuensis	*P. kansuensis*	Brasil	EMBRAPA CPACT
P. sellowii	*P. sellowii*	Brasil	EMBRAPA CPACT
P. manshurica	*P. manshurica*	Brasil	EMBRAPA CPACT

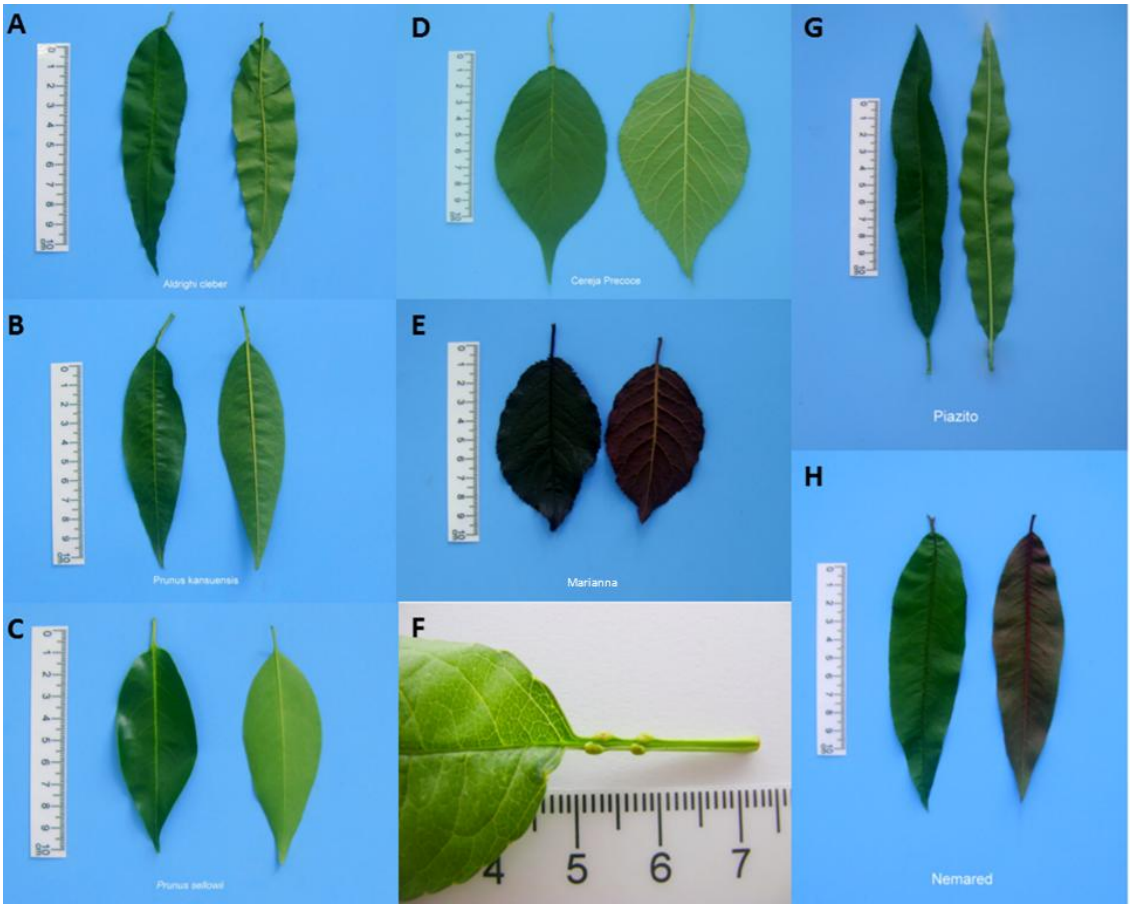


Figura 1. Ilustração da diversidade de características foliares de alguns dos acessos que compõem o banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus*. (A) Folhas de Aldrighi Cléber, (B) *Prunus kansuensis*, (C) *Prunus sellowii*, (D) Cerejeira Precoce, (E) Marianna, (F) detalhes de limbo foliar, pecíolo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

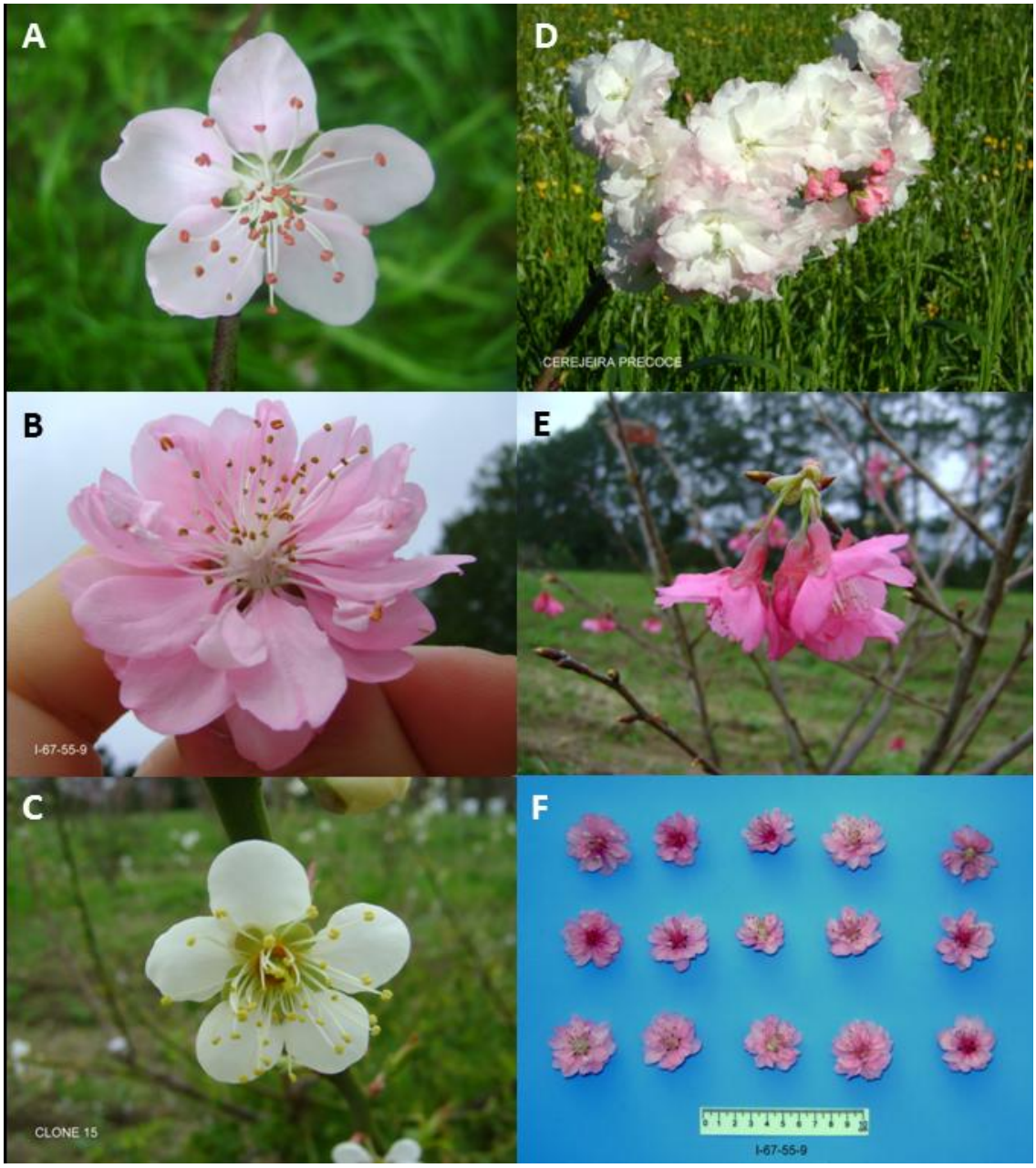


Figura 2. Ilustração da diversidade de características florais de alguns dos acessos que compõem o banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus*. (A) Aldrighi, (B) I-67-55-9, (C) Clone 15, (D) Cerejeira Precoce, (E) Cerejeira Tardia e (F) I-67-55-9.

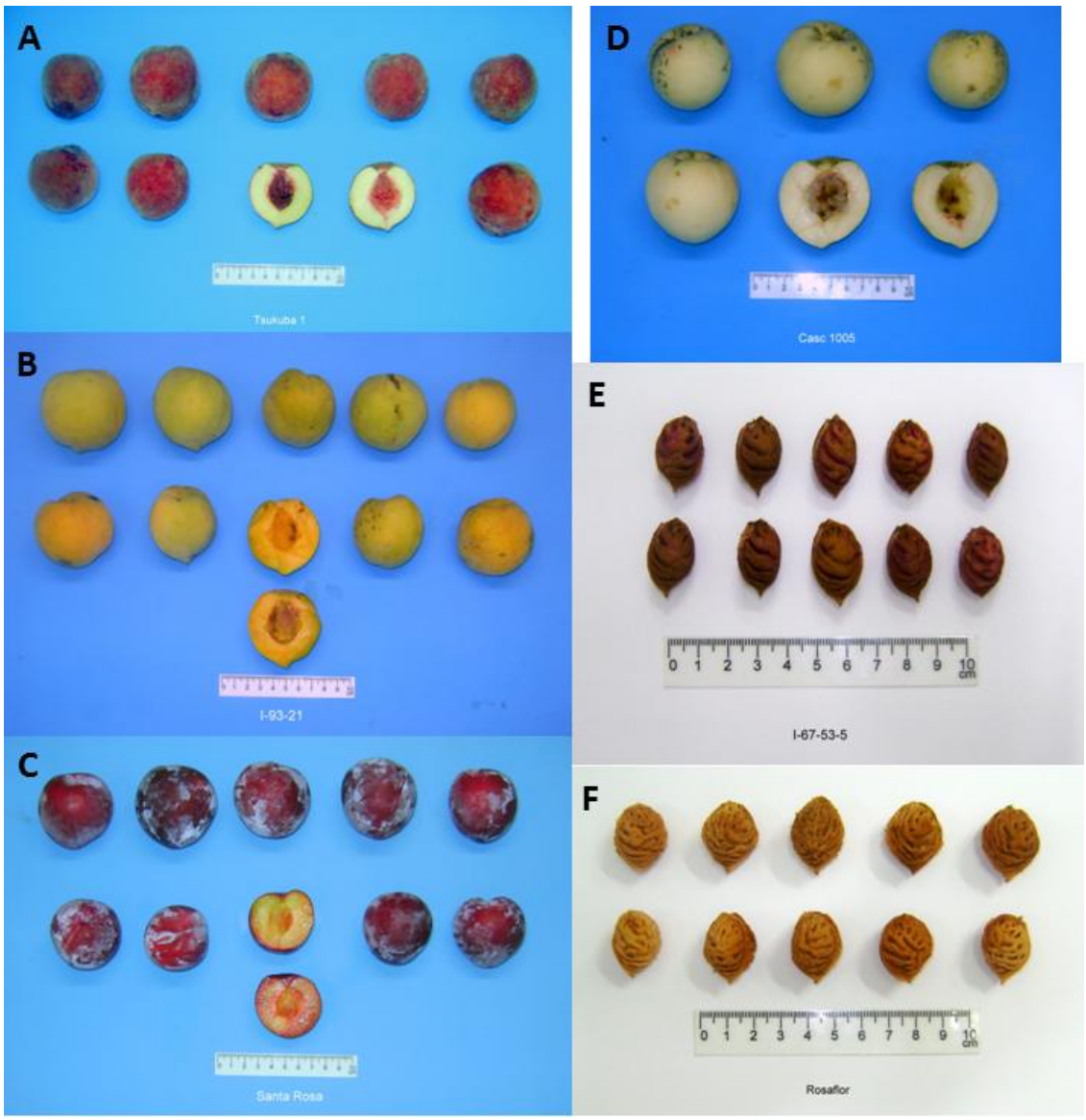


Figura 3. Ilustração da diversidade de características de frutos e caroços de alguns dos acessos que compõem o banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus*. (A) Frutos do acesso Tsukuba-1, (B) I-93-21, (C) Santa Rosa e (D) Casc 1005, (E) caroços do acesso I-67-53-5 e (F) Rosaflor.

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

Tabela 2. Caracteres qualitativos e quantitativos avaliados nos acessos do banco de germoplasma 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	FLÂA	Grau (°)				
2	Folha- ângulo base	FLÂB	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	N°				
11	Flor- número de sépalas	FLNS	N°				
12	Flor- número de anteras	FLNA	N°				
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 no banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus*.

Caracteres qualitativos					Caracteres quantitativos				
Caractere	Na	Ne	I	PD	Caractere	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.

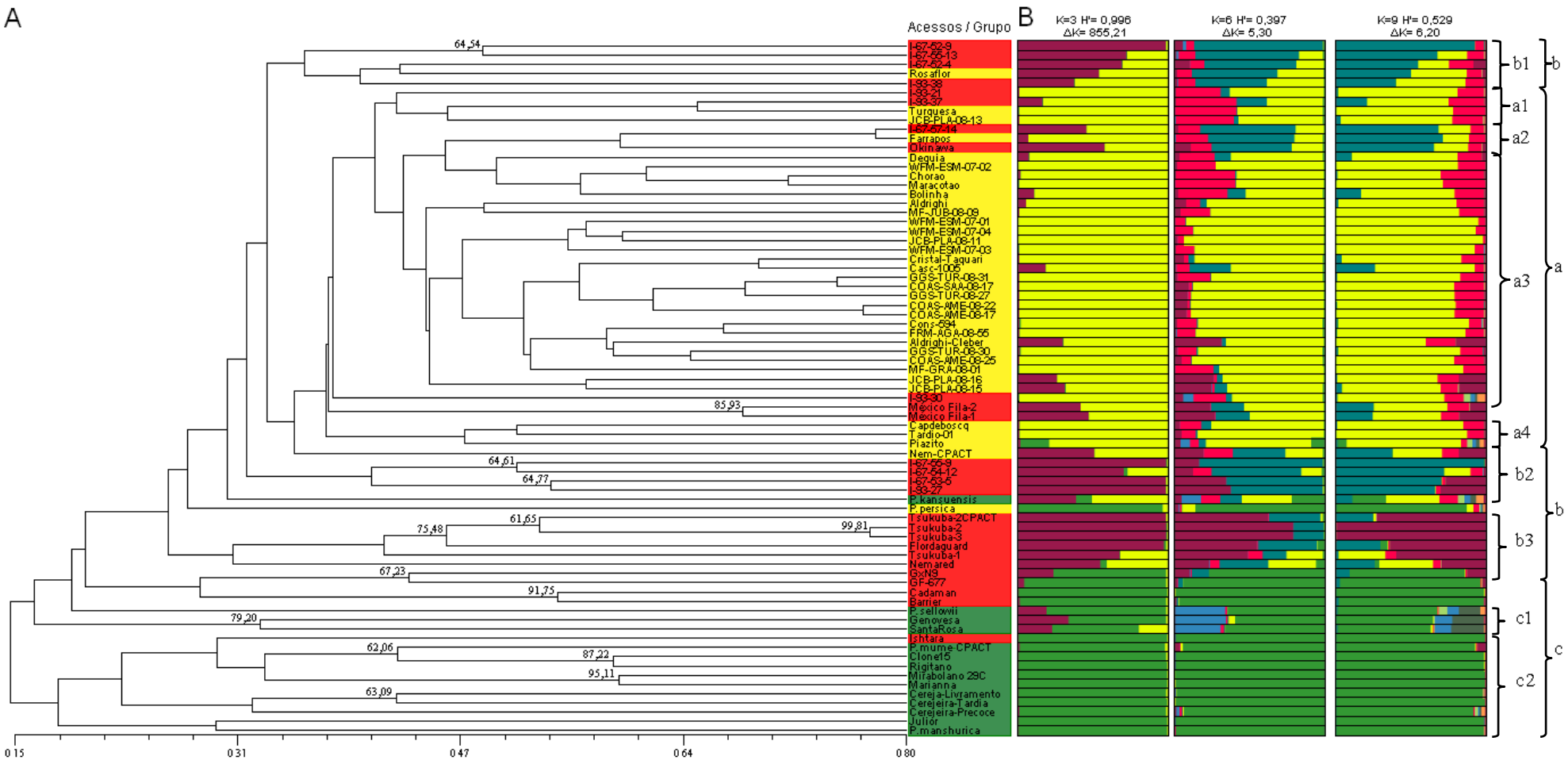


Figura 5. Agrupamento dos 75 acessos do banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus*. O dendograma foi obtido através da análise de agrupamento UPGMA usando-se a matriz de similaridade genética gerada pelo coeficiente Jaccard (1908), baseada na avaliação de 47 caracteres morfológicos. Os acessos 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* (Δ*K*).

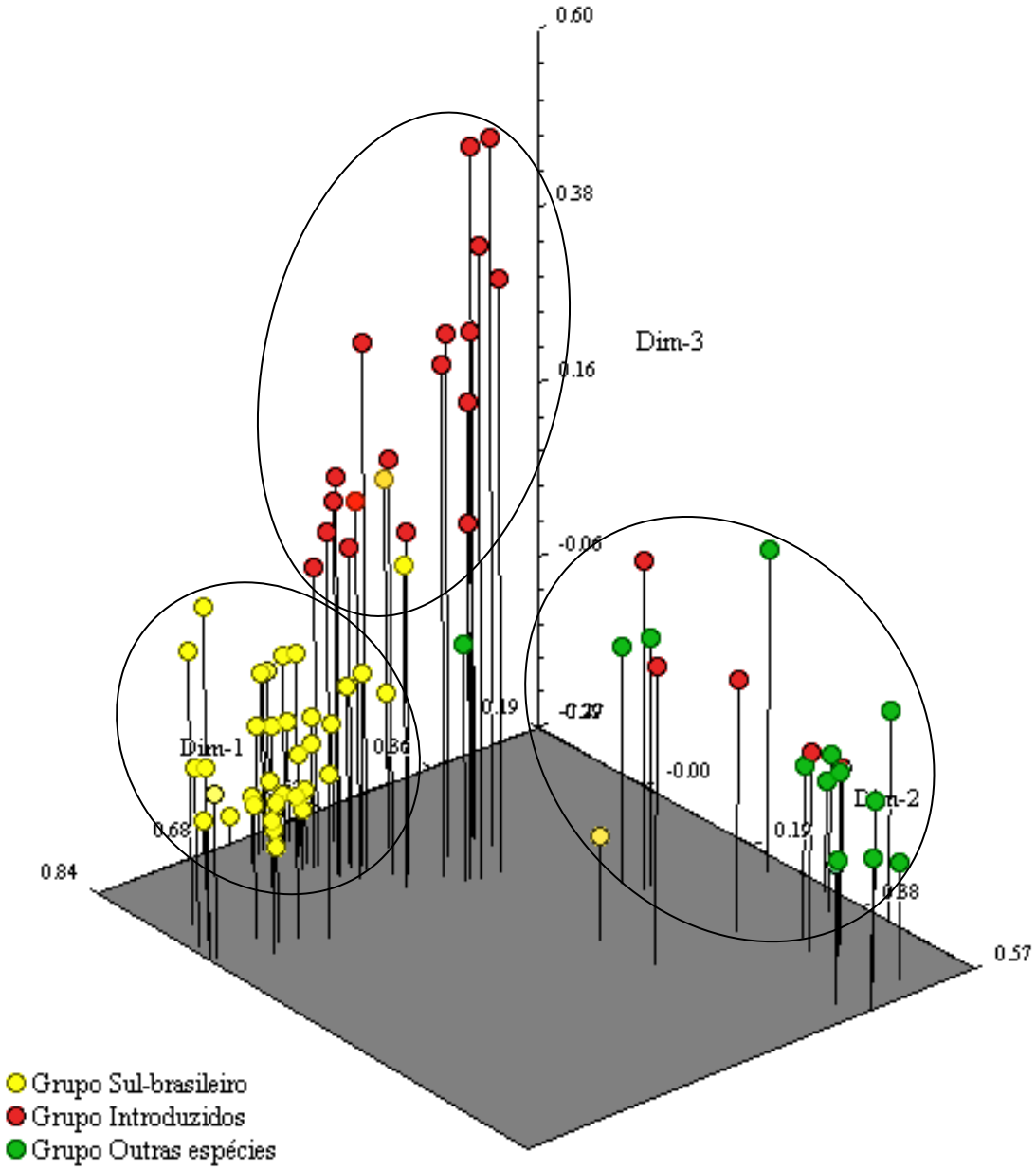


Figura 6. Dispersão tridimensional dos acessos do banco de germoplasma de porta-enxerto de *Prunus*, baseada na análise de Componentes Principais (PCA). Os valores dos componentes principais são PC1= 31,51%, PC2= 4,72% e PC3= 4,03%, obtidos pela análise Eigen através da matriz de similaridade genética Jaccard (1908). Os grupos que compõem o banco de germoplasma estão representados por diferentes círculos coloridos.

Tabela 4. Eigen Vectors, Eigen Values, porcentagem de variância e variância acumulada de três componentes principais dos 75 acessos de porta-enxertos de *Prunus* para os 47 caracteres morfológicos avaliados.

	Acessos	Eigen Vectors		
		PC 1	PC 2	PC 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
	Deguia	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
	Prunus persica	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
	I-93-38	0.582	-0.063	0.119
B	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
C	*Prunus mume* 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
	Clone15	0.367	0.536	-0.105
	Prunus manshurica	0.195	0.426	-0.019
	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
	Prunus sellowii	0.347	0.189	0.030
	Prunus kansuensis	0.502	0.044	0.013
	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 gurpos, e dentro de grupos que constituem o banco de germoplasma 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				

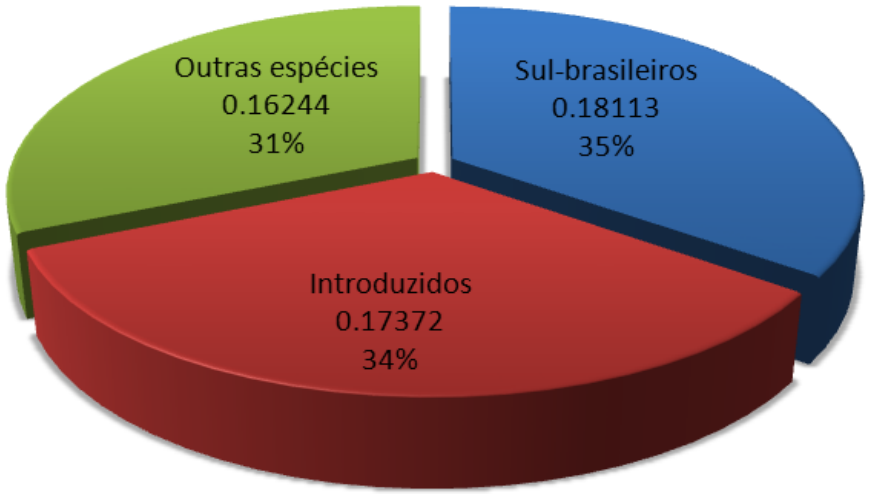


Figura 7. Diferenciação dos grupos de acessos do banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus* pelo índice de fixação (F_{ST}) obtido através do teste de probabilidade com 1023 permutações (Excoffier et al., 1992).

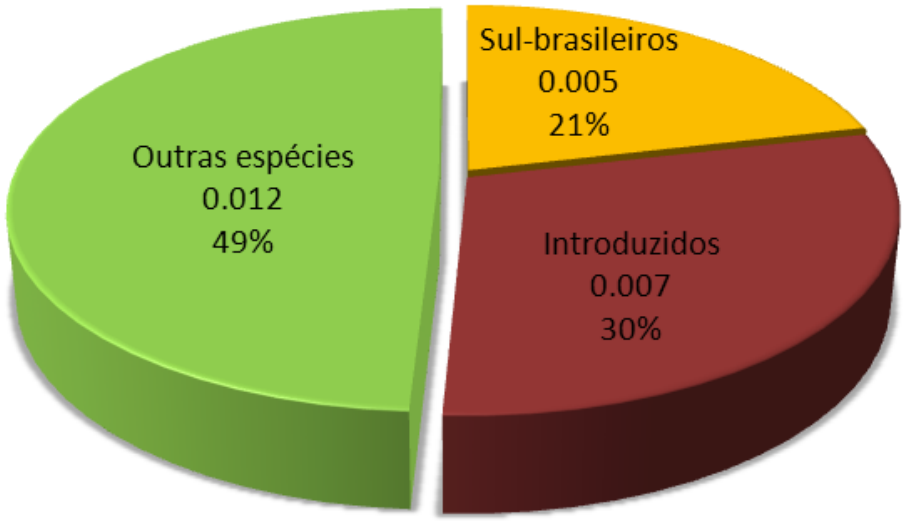


Figura 8. Índice de fixação (F_{ST}) médio por acesso de cada grupo de porta-enxertos de *Prunus* do banco de germoplasma, obtido através da análise de particionamento da variância pelo teste de probabilidade de 1023 permutações (Excoffier et al., 1992).

ARTIGO 2

Estimativa da diversidade, estrutura e relação genética de porta-enxertos de *Prunus* baseadas 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* baseadas 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: l.willianpacheco@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 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Clima Temperado tem dado maior importância às pesquisas voltadas ao melhoramento genético de porta-enxertos de *Prunus*. Ambos os órgãos possuem banco de germoplasma, e a caracterização genética destes faz-se necessária. Neste contexto, o presente estudo deu-se enfoque na caracterização da diversidade genética de um banco de germoplasma de *Prunus* da EMBRAPA Clima Temperado, o qual é constituído por 75 acessos. O objetivo foi elucidar a relação genética existente entre os acessos e entre os grupos de acessos, e a estrutura genética do banco de germoplasma, por meio de avaliações moleculares baseadas na análise de 17 *loci* SSR. O dendograma UPGMA obtido a partir da matriz de similaridade genética de Nei & Li, não foi capaz de distinguir todos os acessos do banco de germoplasma 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 do banco de germoplasma. 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 PCA mostrou-se menos efetiva para a formação de grupos quando comparada com os agrupamentos UPGMA e Bayesianos. O grupo de acessos introduzidos globalmente 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. Em conclusão, a abordagem Bayesiana juntamente com a clássica foram eficientes para detectar três pools alélicos, os quais tem alta relação com os grupos que compõem o banco de germoplasma, sendo que dois destes são integrantes da subfamília *Amygdalus* e o terceiro da *Prunophora*. Além disso, possibilitou avaliar-se a diversidade genética do banco.

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

Abstract: The breeding programs of prunáceas in Brazil for many years been directed to obtain new cultivars-tops, leaving aside the rootstocks. However, in recent years this view has changed because agencies like the Federal University of Pelotas and the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) Temperate Climate has given greater importance to research aimed at breeding rootstocks Prunus. Both bodies have genebank, and genetic characterization of these is necessary. In this context, the present study took place focus on the characterization of the genetic diversity of a germplasm bank of Prunus EMBRAPA Temperate Climate, which consists of 75 hits. The aim was to elucidate the genetic relationships among the accessions and between groups of accessions, and genetic structure of germplasm bank, through evaluations based on molecular analysis of 17 SSR *loci*. The UPGMA dendogram obtained from the genetic similarity matrix of Nei & Li, was not able to distinguish all accessions of the germplasm bank by SSR *loci* evaluated. The hits that were not distinguished Tsukuba-1, Tsukuba-2 and Tsukuba-3, which probably were selected from a population of seedlings with common origin. The UPGMA dendogram with the Bayesian approach allowed the identification of three allelic pools, which consist largely of accesses of a single group of germplasm bank. The access group originating from South Brazilian collections, have no known pedigree, and they showed in part (32.35%) close genetic relationship with the access Aldrighi and Capdeboscq, traditionally in Rio Grande do Sul were the main rootstocks used in the production of seedlings. The PCA analysis was less effective for forming groups compared to groups Bayesian and UPGMA. The group of accessions 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 classic three were effective to detect allelic pools, which is high compared with the groups that make up the germplasm bank, and two of these are members of the subfamily of *Amygdalus* and third *Prunophora*. Furthermore, allowed to assess the genetic diversity of the bank.

Keywords: *Prunus* spp. · SSR · genetic diversity · genetic relationship · genetic structure · 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 amendoeira). Dentre as inúmeras espécies do gênero *Prunus*, as de maior importância agronômica 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 no Brasil 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 consequentemente afeta os investimentos em tecnologia e no manejo de produção. Além disso, há problemas de ordem climática e fitossanitária, que juntamente com o tipo de porta-enxerto utilizado nos pomares do RS influenciam negativamente a produção de frutas de caroço. Outro fator que limita a produção é o tipo de porta-enxerto utilizado, os quais 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 consequentemente na perda de características agronômicas 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).

Assim, 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 bancos 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 estado 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 se fazem necessários, com o intuito de auxiliar a conservação de genótipos de interesse e de aumentar a eficiência de seleção dos 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 (Ramdom 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 carater 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 o banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus* pertencente a EMBRAPA Clima Temperado, intitulado "Coleção porta-enxerto de *Prunus*", elucidar a estrutura genética do banco de germoplasma e analisar a relação genética existente entre os acessos e entre os grupos de acessos que compõem o banco, baseado 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) pertencente à Sede da Embrapa Clima Temperado (Apêndice 1), sendo constituídos por 35 acessos de cultivares-copa, obtidas por seleção e coletas realizadas em propriedades rurais nos distritos de Pelotas e Morro Redondo, região sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil; 27 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*. O estudo da diversidade genética dos acessos foi conduzido de forma conjunta e em forma de grupos (de acordo com sua origem e classificação) para determinar a contribuição dos acessos e de cada grupo para a diversidade genética do banco de germoplasma. 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 nucléicos. Seguido 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 subseqüente 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 sequencias e características estão descritas na tabela 2.

A reação de PCR foi realizada com o volume final de 25 µl, contento 2,5 µL de tampão 10X; 2 mM de $MgCl_2$; 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 60ºC 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 arquivos

Os perfis eletroforéticos dos géis de acrilamida foram fotografados e analisados de forma manual. A presença e a ausência de bandas de cada acesso foram registradas na forma de dados binários, ou seja, "1" para presença do alelo e "0" para ausência, gerando uma matriz binária. Alelos nulos foram atribuídos aos acessos com produtos de amplificação não confirmados sob as condições normais de amplificação por PCR.

A relação genética entre acessos foi calculada utilizando-se a matriz binária. A partir desta matriz converteu-se os dados para tamanho estimado dos alelos, salvando o arquivo no formato padrão do software CONVERT Ver. 1.31 (Glaubitz, 2004). Os dados foram posteriormente convertidos pelo mesmo software para diferentes formatos de arquivos para uso nas análises de parâmetros genéticos e agrupamento baseado na abordagem Bayesiana. Os arquivos para as análises de variância molecular (AMOVA), probabilidade de identidade e alelos nulos foram construído de forma manual.

As análises estatísticas foram conduzidas de forma conjunta e separadas na forma de grupos, de acordo com a classificação dos acessos que constituem o banco de germoplasma de porta-enxertos de Prunus da Embrapa CPACT (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 ($He = 1 - \Sigma P_{ij}^2$, 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 poder de discriminação (PD), o qual determina a habilidade de um marcador discriminar dois acessos aleatoriamente foi estimado para cada *locus* de acordo com a fórmula $PD = 1 - \sum g_{ij}^2$, onde g_{ij} é a frequência do genótipo *j* para o *locus i* avaliando-se todos os alelos para este *locus* (Kloosterman et al., 1993). 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 [$Pi = 1 - \sum pi^4 + \sum(2pipj)^2$]. 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 agrupamento dos acessos foi conduzida com base na matriz de similaridade genética obtida pelo coeficiente Nei & Li (1979), posteriormente realizou-se a análise de agrupamento utilizando o método de médias aritméticas UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sneath & Sokali, 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 dos componentes principais (PCA). Os resultados da análise de componentes principais da diversidade genética do banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus* foram representados em gráfico tridimensional. Ambas 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 do banco de germoplasma 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, 1972), identidade genética (Nei, 1972) 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 variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) foi calculada para verificar a relação genética existente entre grupos, entre acessos dentro de grupos e entre acessos do banco de germoplasma. 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 do banco de germoplasma 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 *locus* 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 heterozigosidade, apresentou-se com valores positivos e média de 0,58 por *locus*, indicando certo grau de deficiência de heterozigosidade. O máximo valor de poder de discriminação detectado foi de 0,91 (UDP98407), o mínimo de 0,57 (UDP98411) e média de 0,80. A máxima probabilidade de identidade (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 raros foi de 113, sendo que a frequência desses alelos raros ($f \leq 0{,}05$) 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 1, demonstrando o número de alelos por grupos, compartilhados entre grupos e únicos.

O segundo e terceiro maiores valores detectados nos parâmetros de heterozigosidade 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 numero 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 do banco de germoplasma.

Variabilidade genética entre acessos coletados na região sul do Brasil

O primeiro grupo de acessos de porta-enxertos de *Prunus* do banco de germoplasma é constituído por 35 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, UDP96013, UDP98411), com média de 4,6 alelos por *locus*. A média de alelos efetivos detectada foi de 2,31, com o mínimo de 1,12 (BPPCT034) e máximo de 3,82 (UDP96003). O índice de informação de Shannon dos *loci* variou de 0,26 (BPPCT034) a 1,53 (UDP98411), com média de 0,91 e total de 13,72. A probabilidade de alelos nulos apresentou valores variando entre 0,02 (UDP96008) a 0,25 (UDP98414), e média de 0,13 alelos nulos por *locus*.

A heterozigosidade esperada apresentou média de 0,49, enquanto que a heterozigosidade observada com média de 0,29. 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 heterozigosidade, e média de 0,44.

O poder discriminatório dos *loci* apresentaram máximo de 0,89 (UDP98411), mínimo de 0,16 (BPPCT034) e média de 0,66. A máxima probabilidade de identidade (0,79) foi identificada para os *loci* BPPCT034 e UDP98411, e a mínima de 0,11 para UDP96003 e UDP98407, parâmetro o qual não está relacionado diretamente com o número de alelos observados. A probabilidade de identidade total dos *loci* avaliados neste grupo foi de $9{,}1e^{-9}$.

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 frequência de alelos raros detectados dentro deste grupo foi de 0,46, com valores de frequência alélica destes alelos variando de zero (BPPCT024) a 0,10 (BPPCT026 e UDP96013), com média de 0,04 (Tabela 5 A).

Variabilidade genética entre acessos introduzidos no Brasil

O segundo grupo foi representado por 27 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 7,13 alelos por *locus*, variando de 3 (BPPCT024) a 12 (UDP98407). O *locus* BPPCT024 foi o menos informativo para os seguintes parâmetros: número de alelos efetivos (3), índice de informação de Shannon (0,81), heterozigosidade esperada (0,48) e observada (0) e poder de discriminação (0,48), quando comparado aos outros *loci* avaliados. O número de alelos efetivos apresentou seu melhor valor com 4,84 alelos (UDP98407), apresentando média de 3,36 e total de 50,46 alelos efetivos neste grupo.

Com relação ao índice de informação de Shannon, os resultados variaram desde 0,81 observado no *locus* BPPCT024 a 1,91 observado em UDP98407. O índice de fixação de Wright apresentou valores variando de 0,29 (UDP96008) a 1 (BPPCT024), com média de 0,67. 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 zero (BPPCT024) a 0,40 (UDP98414) apresentando média de 0,24.

O valor médio da heterozigosidade esperada foi de 0,68, enquanto que a média da heterozigosidade observada foi de 0,22, com variação desde zero (BPPCT024) a 0,41 (BPPCT002). Os *loci* UDP98025 e UDP98407 apresentaram os melhores valores para os parâmetros de poder de discriminação (0,85) e probabilidade de identidade (0,06) respectivamente, sendo que a probabilidade de identidade total foi de $1,43e^{-13}$.

Os maiores valores detectados no *locus* UDP98407 para os parâmetros de heterozigosidade esperada (0,79) e índice de informação de Shannon (1,91), juntamente com o menor valor observado para a probabilidade de identidade (0,06) estão relacionados com o maior número de alelos observados (12) neste grupo de acessos, em relação aos demais avaliados.

A porcentagem de alelos raros detectados dentro deste grupo foi de 45,79%, com valores de frequência alélica variando de zero (BPPCT024 e BPPCT030) a 0,2035 (UDP98025), com média de 0,08 (Tabela 5 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); poder de discriminação (0,88); 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.

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 raros detectados 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 do banco de germoplasma 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 1A), o qual foi obtido pelo algoritmo UPGMA a partir da matriz de similaridade 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 similaridade 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 do banco de germoplasma, a qual variou de 0,01 a 1,00, mostrando uma 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 1B). 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 ΔK=1,82 e *K*=9 ΔK=1,10. O agrupamento de *K*=3 apresentou valor de ΔK=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 1B 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 1B como: 'a' abrangendo em sua maioria (acima de 90%) os acessos de porta-

enxertos sul-brasileiros; ‘b’ abrangendo a maioria (acima de 90%) 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 1B). 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 componentes principais (PCA) possibilitou verificar o grau de diversidade genética em dimensões. Os resultados obtidos pela análise de componentes principais revelou que a contribuição do PC1 foi de 37,98%, PC2= 7,31% e PC3= 6,2%, e que o somatório dos componentes principais representam 51,5%, sendo PC1 o componente que mais representa a diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus*, conforme pode ser verificado na representação gráfica dos resultados na figura 2.

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 3A).

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 3B). O grupo sul-brasileiro apresentou 21 alelos raros, sendo que cinco foram únicos e exclusivos para este grupo. Os porta-enxertos introduzidos apresentaram 55 alelos raros 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 raros, destes 50 foram exclusivos, 25 únicos distribuídos por 23 acessos, e quatro compartilhados com o grupo sul-brasileiro. Quatro alelos raros foram comuns aos três grupos. O grupo de outras espécies apresentou o maior número de alelos raros 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 (Tabela 9). Alta variação molecular (41,63%) foi detectada entre o conjunto total de acessos do banco de germoplasma. A variação molecular remanescente foi distribuída entre acessos dentro de grupos (35,34%) e entre os grupos (23,02%), conforme detalhado na tabela 8.

A diferenciação dos grupos pelo coeficiente de endogamia (Figura 4) 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 calculou-se o coeficiente de endogamia médio por acesso dos três diferentes grupos (Figura 5). 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= 0,023, 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 do banco de germoplasma. Neste mesmo contexto, porém agora para o parâmetro do índice de informação de diversidade genética de Shannon médio por *locus* (Figura 6), 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 do banco de germoplasma.

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 do banco de germoplasma de porta enxertos de *Prunus* da EMBRAPA CPACT. Essa taxa de diversidade pode ser considerada ótima, pois quanto maior a diversidade e a variabilidade genética do banco de germoplasma, 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 4,6 alelos por *locus*, sendo este grupo considerado como de baixa variabilidade genética quando comparado com a média de alelos por *locus* dos outros grupos ou ainda com a similaridade 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 (0,07), 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 24 perfis genéticos únicos de um total de 27 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 7,13 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 genética 39% 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* em 74 cultivares analisadas e considerou 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 amplificações 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 transferabilidade 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 de dendograma e a 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). Este modelo leva em consideração o equilíbrio de Hardy-Weinberg para inferir a estrutura genética e classificar os acessos em grupos. O modelo Bayesiano foi empregado juntamente com a análise UPGMA 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 (acima de 90%) com os diferentes grupos que compõem o banco de germoplasma. Destes três grupos, dois são (“a” e “b”) são de acessos constituintes da subfamília *Amygdalus* e o terceiro da *Prunophora*. Assim, a abordagem Bayesiana juntamente com a clássica 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 hierárquico UPGMA, abrangeu 94,11% 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 e I-93-20. Estes acessos provenientes de coletas constituem 53% 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 persicultures 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 por meados da década de 1950 constituíram o material genético básico para o inicio 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 são raros 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 92,85% dos porta-enxertos internacionais, com exceção dos acessos Rosaflor (grupo sul-brasileiro), *Prunus persica* (grupo sul-brasileiro), *Prunus kansuensis* (grupo outras espécies) e Piazito (grupo sul-brasileiro). Os porta-enxertos de folhas avermelhadas agruparam-se em dois subgrupos diferentes. Isto pode estar relacionado à maior diversidade genética existente dentro do banco de germoplasma. O acesso Tsukuba-2 CPACT distinguiu-se dos demais acessos de Tsukubas, os quais não se distinguiram pelos *loci* avaliados neste estudo. A diversidade genética que o acesso Tsukuba-2 CPACT apresentou em relação aos demais Tsukubas pode estar relacionado ao Tsukuba-2 CPACT ter sido obtido de um seedling de 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 caracterizada. 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 disto, 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 subagrupamentos neste estudo, com similaridade genética mínima de 0,32 e máxima de 0,29. Resultado similar de similaridade genética de ameixeiras foi encontrado por Bianchi et al. (2003) em estudo o qual utilizou marcadores RAPD e obtive similaridade genética de 0,31 entre os acessos Santa Rosa e Mirabolano 29C, valor este que é próximo ao detectado em nosso 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 análise bayesiana, a análise de componentes principais também suportam os resultados obtidos pelo dendograma UPGMA, juntamente com a inferência dos diferentes pools alélicos detectados. Os resultados da análise de componentes principais mostram que 51,5% dos acessos são os que melhor representam a diversidade genética do banco de germoplasma de porta-enxerto de *Prunus* em estudo. Desta maneira, 48,5% dos acessos do banco de germoplasma apresentam alta relação genética entre si, ou seja, a similaridade observada entre os acessos foi alta. Estes acessos podem ser representados por poucos componentes do banco de germoplasma e são comumente denominados de componentes principais. A manutenção destes 51,5% é de suma importância para manter a alta diversidade genética existente dentro do banco de germoplasma, havendo a necessidade do emprego

de estratégias que melhor mantenham estes componentes que representam as principais fontes de diversidade genética do banco de germoplasma.

Relação genética entre grupos de acessos

Análise descritiva

A relação genética detectada entre os grupos foi de 60,81% do total de alelos observados. 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 significante taxa de transfereabilidade de marcadores moleculares SSR através das espécies analisadas neste estudo.

Os alelos raros e exclusivos detectados apresentam uma grande importância relativa, pois estes podem ser fontes de resistência a pragas e doenças, ou mesmo estar relacionada à tolerância a diferentes estresses ambientais. A porcentagem de alelos raros detectados foi de 66,08%, sendo este valor considerado alto, pois é responsável por mais da metade dos alelos detectados. O grupo que mais contribuiu neste parâmetro foi o de acessos de outras espécies, com 50 alelos raros exclusivos, o qual está relacionado diretamente com o maior número de diferentes alelos por acesso (7,61 alelos) detectados, abrangendo todo o conjunto de *loci* avaliados, sendo este valor o dobro do encontrado para o grupo de acessos introduzidos (3,96) e quatro vezes maior que o sul-brasileiro (1,97). Assim, este grupo apresenta grande número de alelos raros, os quais são de fundamental importância para o melhoramento genético de porta-enxertos de *Prunus*. A associação destes alelos raros e alelos normais a características de interesse agronômico será realizada em estudo posterior visando auxiliar na seleção assistida por meio de marcadores moleculares.

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, devendo estas relações estarem relacionadas à genealogia de ambos os grupos como mencionada 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 do banco de germoplasma 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 do banco de germoplasma deste estudo.

A caracterização genética pelo uso de marcadores moleculares tem como vantagem ser altamente eficiente, rápida e de baixo custo. 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 do banco de germoplasma deste estudo. O artigo posterior a este possibilitará alcançar estes objetivos, pois tratará da sumarização dos resultados dos dois primeiros artigos, possibilitando selecionar com maior precisão, acessos com características de interesse agronômico para cruzamentos posteriores.

Conclusões

Neste estudo, a abordagem Bayesiana juntamente com a clássica foram eficientes para detectar três pools alélicos, os quais tem alta relação com os grupos que compõem o banco de germoplasma, sendo que dois destes são integrantes da subfamília *Amygdalus* e o terceiro da *Prunophora*. Além disso, as análises possibilitaram avaliar a diversidade genética do banco. Assim, os *loci* podem ser empregados para caracterização de genótipos do gênero *Prunus*, possibilitando inferir sobre a estrutura genética de populações de mesma espécie e do mesmo 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 varietá di susino. Frutticoltura (Bologna), Bologna, v. 64, n. 4, p. 83-87.

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 aplication 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. 2001. 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 dele piantearboree da frutto: Pesco. L'Informatore Agrario, suplemento, 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.

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.

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 frequence. 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.

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.

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.

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, 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 establishmentand 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 transfereability 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.

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, vol1, 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.

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.

Wünsc H.A. 2008. 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

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

Tabela 1. Continuação...

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

Tabela 2. Características dos 17 pares de oligonucleotídeos alvos de *loci* SSR empregados para avaliação do banco 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**	***Prunus* spp.**
BPPCT002	Dirlewanger et al. (2002)	F- TCGACAGCTTGATCTTGACC R- CAATGCCTACGGAGATAAAAGAC	$(AG)_{25}$	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	$(AG)_8GG(AG)_6$	134	134 +	134 +	139 +
BPPCT030	Dirlewanger et al. (2002)	F- AATTGTACTTGCCAATGCTATGA 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- TTGCTCAAAAGTGTCGTTGC R- ACACGTAGTGCAACACTGGC	$(CT)_{11}(CA)_{28}$	143	145 +	143 +	95 +
UDP96005	Cipriani et al. (1999)	F- GTAACGCTCGCTACCACAAA R- CCTGCATATTCACCACCCAG	$(AC)_{16}TG(CT)_2$ $CA(CT)_{11}$	155	+	-	-
UDP96008	Cipriani et al. (1999)	F- TTGTACACACCCTCAGCCTG R- TGCTGAGGTTCAGGTGAGTG	$(CA)_{23}$	165	125 +	200 +	123 +
UDP96013	Cipriani et al. (1999)	F- ATTCTTCACTACACGTGCACG R- CCCCAGACATACTGTGGCTT	$(AG)_{22}(TG)_8TT(TG)_{10}$	198	187 +	200 +	170 +-
UDP96018	Ciprianiet 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- GGGAGGTTACTATGCCATGAAG 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- AGGGAAAGTTTCTGCTGCAC 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.

Tabela 3. Sumário dos parâmetros de diversidade genética obtidos pela avaliação de 15 *loci* SSR para todo o banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus* e para cada grupo.

***Locus* SSR**	**Banco de germoplasma**										**Porta-enxertos sul-brasileiros**									
	Ng	Na	Ne	I	r	He	Ho	F	PD	PI	Ng	Na	Ne	I	r	He	Ho	F	PD	PI
BPPCT002	75	18	3,54	1,80	0,14	0,71	0,46	0,34	0,84	0,10	35	4	1,98	0,79	0,04	0,49	0,43	0,13	0,68	0,35
BPPCT024	75	8	2,29	1,04	0,28	0,56	0,12	0,77	0,66	0,27	35	2	1,29	0,38	0,11	0,22	0,09	0,61	0,30	0,62
BPPCT026	75	10	4,01	1,65	0,24	0,75	0,31	0,57	0,88	0,09	35	5	2,28	1,02	0,10	0,56	0,40	0,28	0,70	0,26
BPPCT030	75	7	3,04	1,35	0,26	0,67	0,23	0,64	0,81	0,16	35	3	2,04	0,75	0,20	0,51	0,20	0,60	0,64	0,35
BPPCT034	75	12	2,12	1,28	0,20	0,52	0,21	0,58	0,64	0,24	35	3	1,12	0,26	0,04	0,11	0,06	0,47	0,16	0,79
UDP96003	75	17	6,07	2,13	0,27	0,83	0,32	0,60	0,90	0,04	35	7	3,82	1,49	0,13	0,74	0,51	0,30	0,84	0,11
UDP96008	75	13	2,87	1,44	0,10	0,65	0,47	0,26	0,80	0,17	35	5	2,24	0,93	0,02	0,55	0,51	0,07	0,68	0,30
UDP96013	75	15	4,00	1,82	0,20	0,75	0,39	0,47	0,87	0,08	35	7	3,31	1,40	0,20	0,70	0,34	0,50	0,82	0,45
UDP96018	75	8	4,35	1,66	0,20	0,77	0,40	0,47	0,89	0,08	35	5	3,04	1,23	0,09	0,67	0,51	0,23	0,83	0,17
UDP96019	75	7	1,89	0,92	0,18	0,47	0,20	0,56	0,66	0,31	35	3	1,48	0,55	0,05	0,33	0,26	0,21	0,47	0,50
UDP98025	75	16	5,83	2,14	0,30	0,82	0,26	0,68	0,89	0,04	35	3	2,05	0,76	0,17	0,51	0,20	0,53	0,62	0,31
UDP98407	75	11	5,59	1,91	0,30	0,82	0,26	0,67	0,91	0,05	35	6	1,95	0,94	0,22	0,49	0,23	0,52	0,84	0,11
UDP98411	75	11	2,23	1,33	0,29	0,55	0,09	0,83	0,57	0,21	35	7	3,66	1,53	0,10	0,73	0,34	1,00	0,89	0,79
UDP98412	75	9	3,30	1,47	0,25	0,69	0,23	0,65	0,81	0,13	35	3	1,12	0,26	0,20	0,11	0,00	0,61	0,65	0,35
UDP98414	75	9	5,22	1,80	0,31	0,80	0,24	0,69	0,89	0,06	35	6	3,20	1,43	0,25	0,69	0,26	0,62	0,79	0,13
Média	75	11,3	3,76	1,58	0,23	0,69	0,28	0,58	0,80	0,13	35	4,6	2,31	0,91	0,13	0,49	0,29	0,44	0,66	0,37
Total	75	171	58,1	23,7	-	-	-	-	-	$9{,}5e^{-15}$	35	69	34,58	13,72	-	-	-	-	-	$9{,}1e^{-9}$

Tabela 3. Continuação...

Locus SSR	Porta-enxertos introduzidos										Outras espécies									
	Ng	Na	Ne	I	r	He	Ho	F	PD	PI	Ng	Na	Ne	I	r	He	Ho	F	PD	PI
BPPCT002	27	8	3,24	1,52	0,16	0,69	0,41	0,41	0,77	0,12	13	12	9,38	2,34	0,10	0,89	0,69	0,22	0,88	0,02
BPPCT024	27	3	1,93	0,81	0	0,48	0	1	0,48	0,33	9	7	3,85	1,62	0,04	0,74	0,66	0,10	0,81	0,09
BPPCT026	27	7	4,64	1,67	0,34	0,78	0,19	0,76	0,83	0,07	4	5	4,57	1,55	0,15	0,78	0,50	0,36	0,75	0,08
BPPCT030	27	4	3,20	1,25	0,23	0,69	0,30	0,57	0,78	0,15	6	5	3,78	1,44	0,32	0,73	0,16	0,77	0,72	0,11
BPPCT034	27	7	2,62	1,26	0,20	0,62	0,30	0,52	0,83	0,20	11	9	8,06	2,13	0,17	0,87	0,54	0,37	0,87	0,02
UDP96003	27	9	3,14	1,54	0,34	0,68	0,11	0,84	0,72	0,13	11	8	3,96	1,72	0,27	0,74	0,27	0,63	0,72	0,08
UDP96008	27	5	2,10	1	0,10	0,52	0,37	0,29	0,67	0,27	11	10	7,80	2,17	0,12	0,87	0,63	0,27	0,87	0,02
UDP96013	27	10	3,10	1,61	0,22	0,68	0,30	0,56	0,77	0,12	7	9	7,53	2,10	-0,07	0,86	1	-0,15	0,77	0,03
UDP96018	27	8	3,67	1,54	0,28	0,73	0,23	0,68	0,81	0,11	8	6	2,37	1,24	0,04	0,57	0,50	0,13	0,68	0,20
UDP96019	27	7	2,39	1,08	0,25	0,58	0,19	0,68	0,66	0,25	6	1	1	0	0	0	0	1	0	1
UDP98025	27	5	3,23	1,29	0,25	0,69	0,33	0,52	0,85	0,68	10	6	4,16	1,56	0,31	0,76	0,20	0,73	0,80	0,09
UDP98407	27	12	4,84	1,91	0,34	0,79	0,33	0,58	0,84	0,06	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1
UDP98411	27	9	5,28	1,84	0,34	0,81	0,19	0,77	0,61	0,22	13	9	6,14	1,97	0,20	0,83	0,46	0,44	0,86	0,04
UDP98412	27	5	2,45	1,13	0,21	0,59	0,04	0,94	0,78	0,15	9	6	3,6	1,50	0,35	0,72	0,11	0,84	0,71	0,11
UDP98414	27	8	4,60	1,71	0,40	0,78	0,07	0,91	0,84	0,08	8	5	3,65	1,42	-0,01	0,72	0,75	-0,03	0,75	0,11
Média	27	7,13	3,36	1,41	0,24	0,68	0,22	0,67	0,75	0,19	8,5	6,6	4,72	1,52	0,13	0,67	0,43	0,31	0,67	0,20
Total	27	107	50,46	21,16	-	-	-	-	-	$1{,}43e^{-13}$	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) heterozigosidade esperada, (Ho) heterozigosidade observada, (F) índice de fixação, (PD) poder de discriminação e (PI) probabilidade de identidade.

Tabela 4. Sumário de frequência alélica dos 15 *loci* SSR avaliados no banco de germoplasma 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
A	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≤ 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.

Locus	Acesso				
BPPCT002	*P. persica*				
BPPCT024	*P. manshurica*	Genovesa	Santa Rosa		
BPPCT026	C. Tardia	GF-677	Chorão		
BPPCT030	*P. mume*				
BPPCT034	*P. manshurica*	Flordaguard	Cadaman	Barrier	GF-677
UDP96003	*P. kansuensis*	Clone 15	C. Tardia	C. Tardia	Barrier
UDP96008	*P. sellowii*	Genovesa	*P. manshurica*		
UDP96013	Genovesa	Santa Rosa	Ishtara	*P. persica*	
UDP96018	C. Precoce	Tsuk 2-CPACT	Flordaguard	GGS-TUR-08-30	
UDP96019	GF-677	GxN9	Cadaman	Barrier	
UDP98025	*P. manshurica*	Genovesa	Cadaman	Barrier	Ishtara
UDP98407	Barrier	I-93-27	Cadaman	Casc1005	
UDP98411	*P. sellowii*	*P. sellowii*	Genovesa	C. Tardia	
UDP98412	*P. sellowii*	*P. mume*	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 do banco de germoplasma 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
A	Alelo A			0,5714						0,3714		0,0286*	0,0286*	0,0286*		0,1429
	Alelo B			0,0286*	0,5429			0,5000		0,0143*						0,1571
	Alelo C				0,0143*						0,1857		0,0286*			0,0571
	Alelo D			0,0429*	0,4429						0,0143*			0,9429		0,0286*
	Alelo E			0,3286						0,1714	0,8000		0,1571			0,1143
	Alelo F		0,8714	0,0286*				0,0143*					0,2286		0,5143	
	Alelo G					0,9429		0,0143*		0,4000			0,1000	0,0286*	0,0143*	
	Alelo H		0,1286			0,0286*	0,0143*	0,0286*		0,0429*			0,0286*		0,4714	
	Alelo I								0,3143				0,4286			0,5000
	Alelo J						0,0286*		0,0286*			0,0143*				
	Alelo K	0,0143*				0,0286*	0,3000		0,4143			0,6714				
	Alelo L	0,0143*					0,0857	0,4429	0,0286*							
	Alelo M								0,0286*			0,2429				
	Alelo N						0,2143		0,1714			0,0286*				
	Alelo O	0,6143					0,3429		0,0143*							
	Alelo P						0,0143*					0,0143*				
	Alelo Q															
	Alelo R	0,3571														
	Raro Total	0,0286	0	0,1001	0,0143	0,0572	0,0588	0,0572	0,1001	0,0572	0,0143	0,0858	0,0858	0,0572	0,0143	0,0286

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			0,1852	0,2407		0,0185*		0,0185*	0,1538	0,0185*	0,1296	0,0741	0,2593		0,2593
	Alelo B				0,4259			0,6481		0,0192*	0,0185*		0,1111			0,2222
	Alelo C			0,0370*	0,0741	0,0185*				0,0385*	0,0185*	0,0185*	0,1667			0,2963
	Alelo D			0,3148	0,2593				0,0185*	0,0192*	0,4074		0,0185*	0,5741		0,0926
	Alelo E			0,2222					0,0185*	0,0577	0,5000			0,0926	0,2593	0,0370*
	Alelo F		0,2593			0,1111		0,0714		0,3077	0,0185*		0,2222		0,4259	0,0185*
	Alelo G		0,0741	0,0556		0,5556	0,0185*	0,0370*		0,3846	0,0185*	0,3333	0,2963		0,0556	0,0370*
	Alelo H		0,6667						0,0926	0,0192*		0,0185*			0,2407	0,0370*
	Alelo I			0,0185*		0,0185*	0,0185*		0,0926			0,0185*	0,0741	0,0370*	0,0185*	
	Alelo J	0,0370*		0,1667		0,0185*	0,1667		0,0926			0,2593	0,0185*	0,0370*		
	Alelo K					0,2407			0,5370			0,0370*	0,0185*			
	Alelo L	0,1852				0,0370*	0,1111	0,2222	0,0741			0,0741				
	Alelo M	0,0185*					0,0741	0,0185*	0,0185*			0,0370*				
	Alelo N	0,0556					0,5185		0,0370*			0,0185*				
	Alelo O	0,5000					0,0370*					0,0185*				
	Alelo P	0,0370*										0,0370*				
	Alelo Q	0,0370*					0,0370*									
	Alelo R	0,1296														
	Raro Total	0,1295	0	0,0555	0	0,0925	0,1295	0,0555	0,1110	0,0961	0,0925	0,2035	0,0555	0,0740	0,0185	0,1295
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							0,0455*						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≤ 0,05).

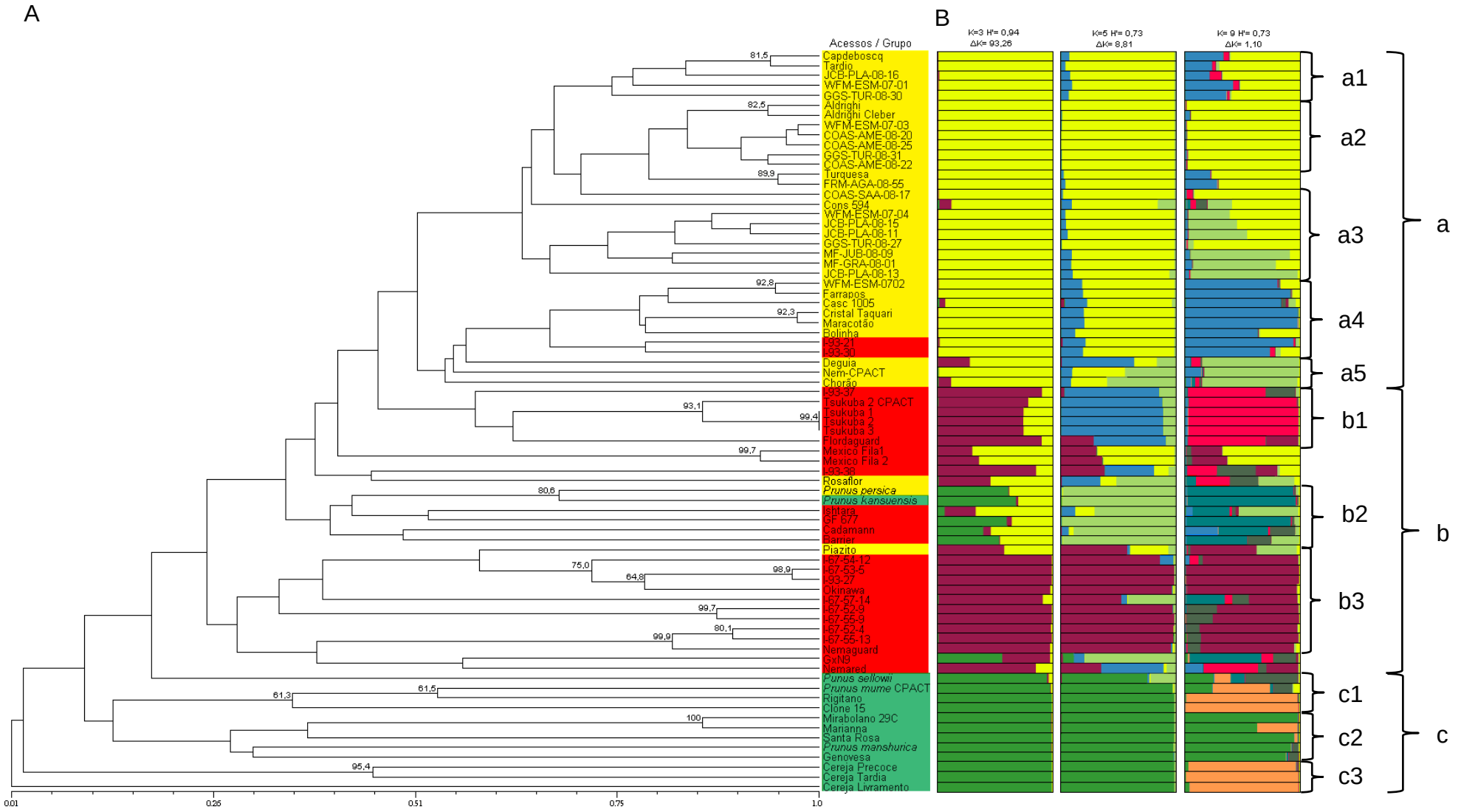


Figura 1. Agrupamento dos 75 acessos do banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus*. (A) Dendograma obtido através da análise de agrupamento UPGMA usando-se a matriz de similaridade genética gerada pelo coeficiente Nei & Li (1979) baseada na amplificação de 15 primers SSR via PCR. Os acessos estão 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* (Δ*K*).

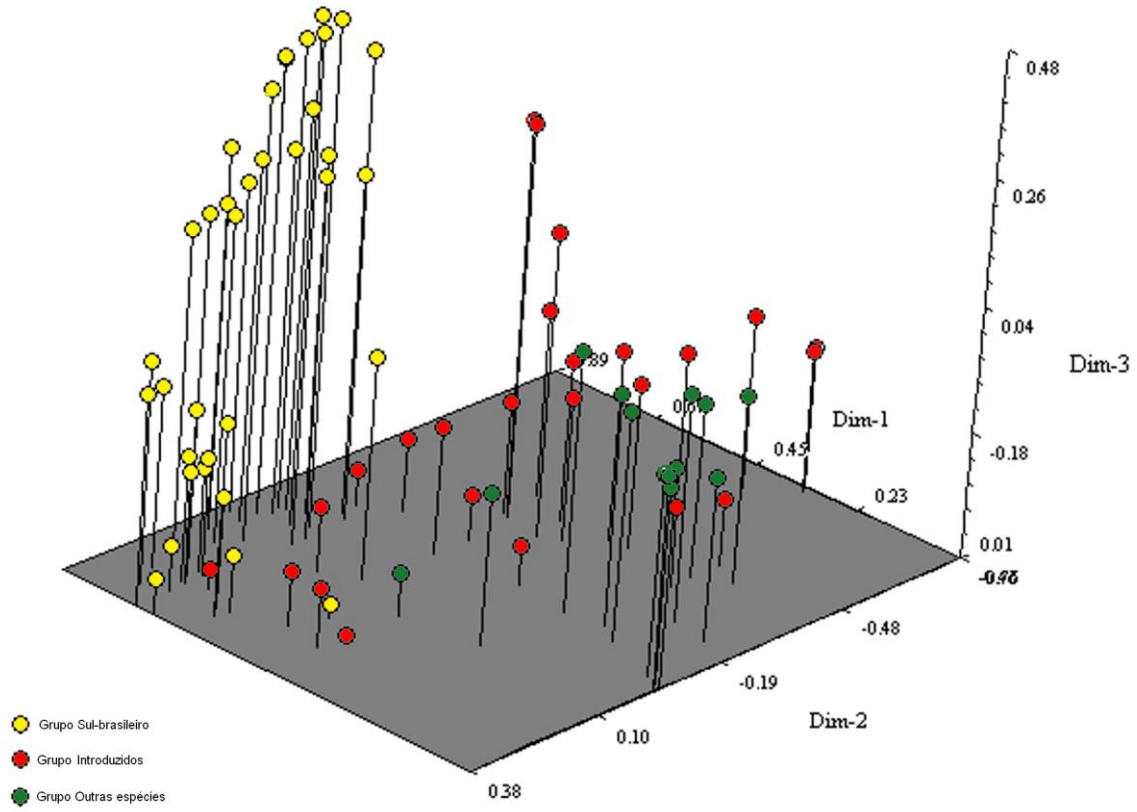


Figura 2. Dispersão tridimensional dos acessos do banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus*, baseada na análise de Componentes Principais (PCA). Os valores dos componentes principais são PC1= 37,98%, PC2= 7,31% e PC3= 6,2%, obtidos pela análise Eigen através da matriz de similaridade genética Nei & Li (1979). Os grupos que compõem o banco de germoplasma estão representados por diferentes círculos coloridos.

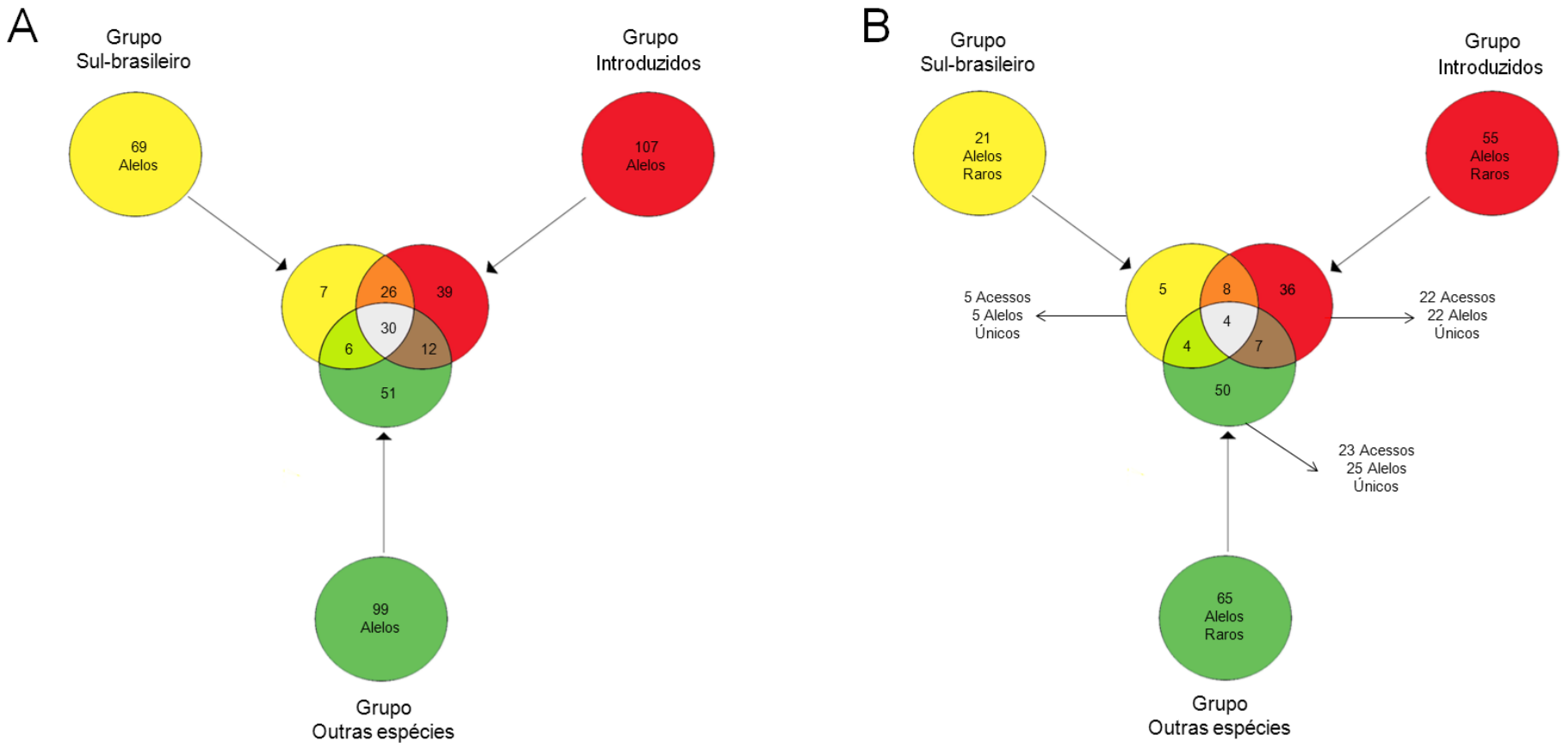


Figura 3. Representação gráfica descritiva da compartimentalização de alelos normais (A) e alelos raros (f≤ 0,05) (B) dentro e entre os grupos que constituem o banco de germoplasma de porta-enxertos de *Prunus*.

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

Grupos	Sul-brasileiros	Introduzidos	Prunus spp.
Sul-brasileiros	*****	0,7221	0,3073
Introduzidos	0,3390	*****	0,3763
Prunus spp.	1,1800	0,9773	*****

Tabela 8. Sumário da análise de particionamento de variância molecular entre grupos, entre acessos dentro de grupos e entre acessos do banco de germoplasma 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	51,713	0,50	23,02
Entre acessos dentro de grupos	72	176,120	0,77	35,34
Dentre de acessos	75	68,00	0,90	41,63
Total	149	295,833	2,17	100

Nota: Nível de probabilidade de 0%.

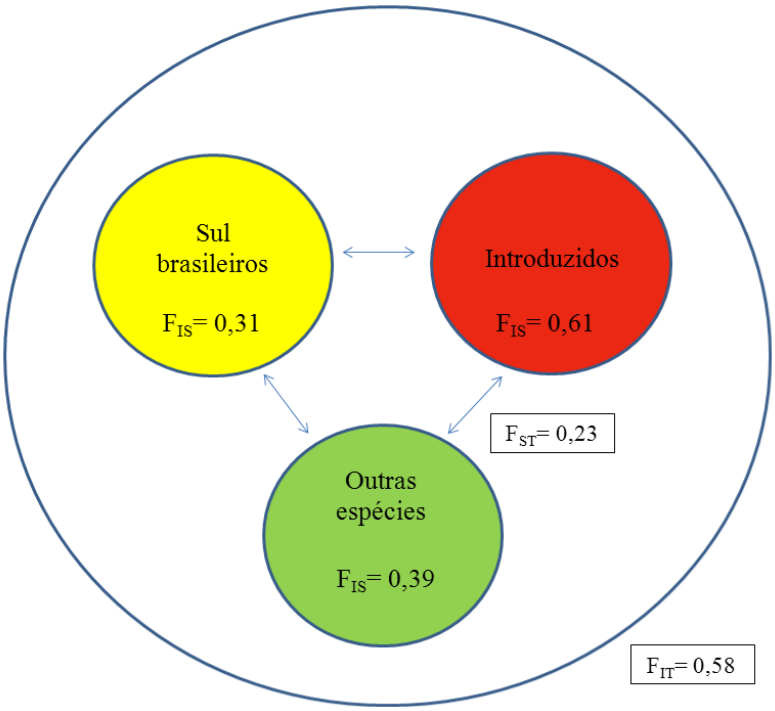


Figura 4. Estatísticas F obtidas pela análise de particionamento da variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) dos diferentes grupos de acessos que constituem o banco de germoplasma de porta-enxerto de *Prunus*. F_{IS}- coeficiente de endogamia, F_{ST}- índice de fixação e F_{IT}- coeficiente de endogamia total. *Variações totais.

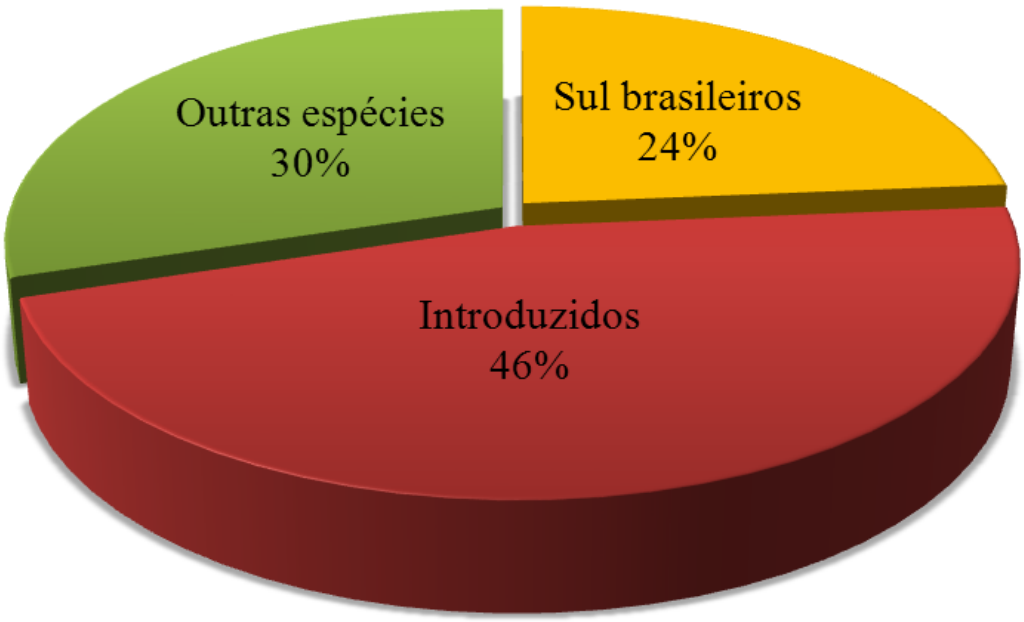


Figura 5. Diferenciação dos grupos de acessos de porta-enxertos de *Prunus* do banco de germoplasma pelo coeficiente de endogamia (F_{IS}), obtido através da análise de particionamento da variância molecular (AMOVA) com teste de probabilidade de 1023 permutações.

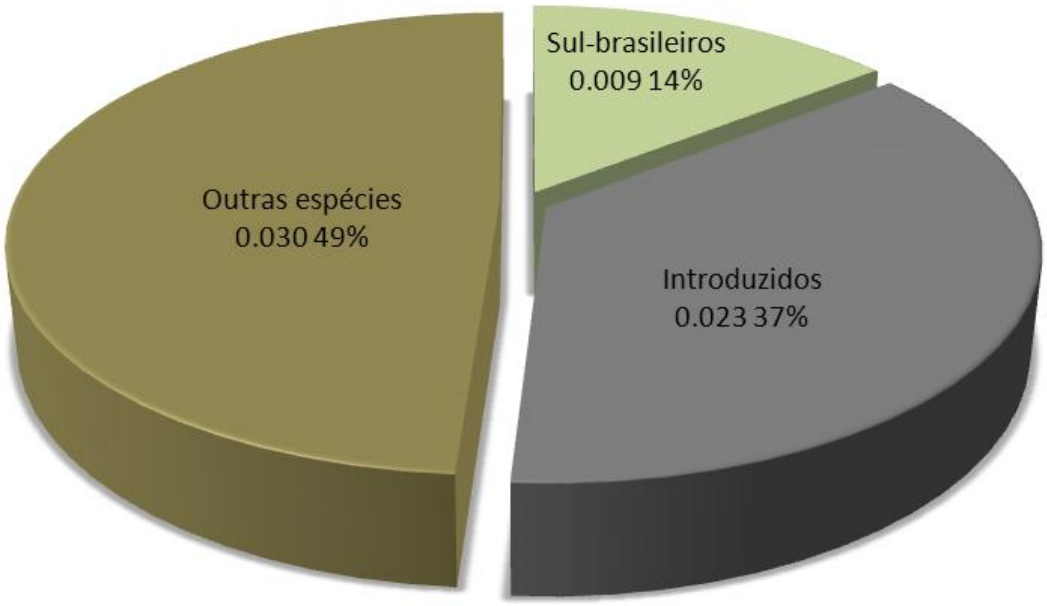


Figura 6. Coeficiente de endogamia médio (MF_{IS}) por acesso dentro dos diferentes grupos de porta-enxertos de *Prunus*, obtido através da análise de particionamento da variância molecular (AMOVA) com teste de probabilidade de 1023 permutações.

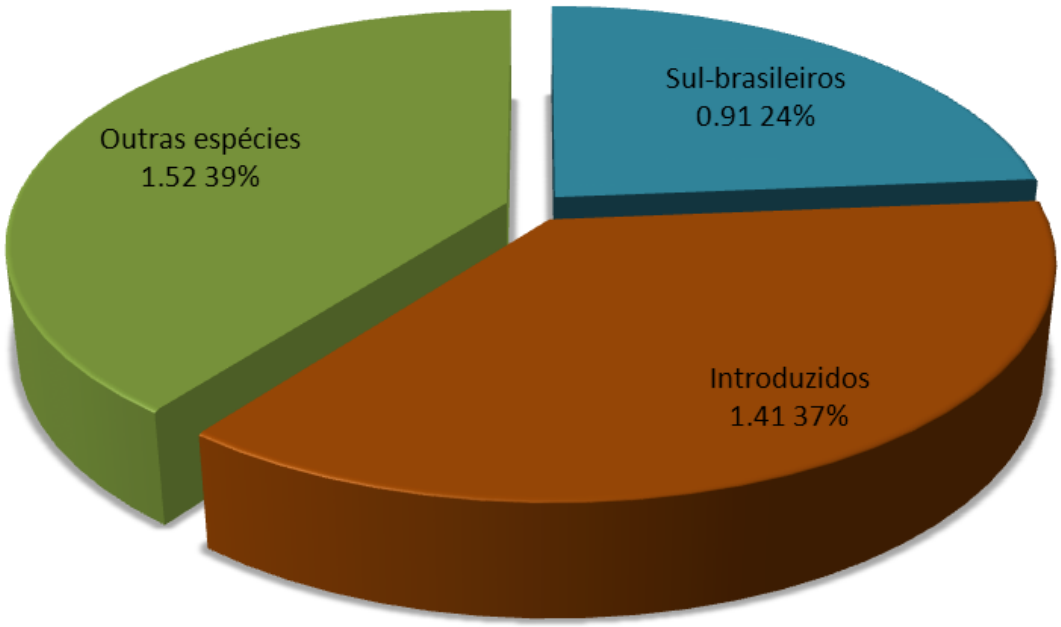


Figura 7. Distribuição de valores médios por *locus* do índice de informação de diversidade genética de Shannon (I) nos diferentes grupos de acessos de porta-enxertos de *Prunus* do banco de germoplasma.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo através das avaliações morfológicas e moleculares são complementares uns aos outros, pois a caracterização morfológica 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 genética.

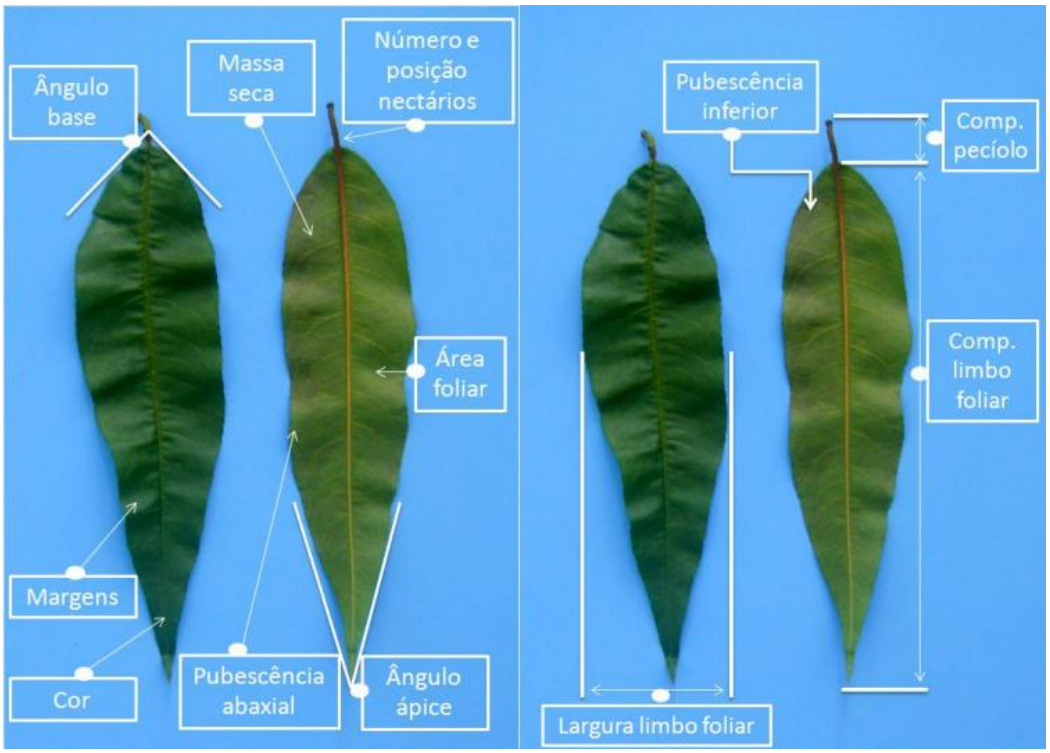
Assim, a caracterização molecular é complementar a caracterização morfológica, no entanto, esta não sofre influência de fatores ambientais, o que gera resultados satisfatórios. Os agrupamentos detectados pela abordagem de dendograma e pela Bayesiana através dos dados morfológicos e moleculares geraram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

Nesta mesma linha de trabalho irá ser elaborado um terceiro artigo, pela sumarização dos resultados das avaliações morfológicas e moleculares, o qual será possível selecionar com maior precisão acessos com características de interesse agronômico para serem conduzidos cruzamentos controlados. Além deste, outros estudos serão conduzidos, como a correlação de caracteres morfológicos entre si e com os dados dos *loci* SSR. A correlação de caracteres morfológicos com moleculares possibilita a obtenção de marcadores moleculares associados a características morfológicas, e poderão ser usados futuramente como marcadores de seleção assistida em diferentes pesquisas.

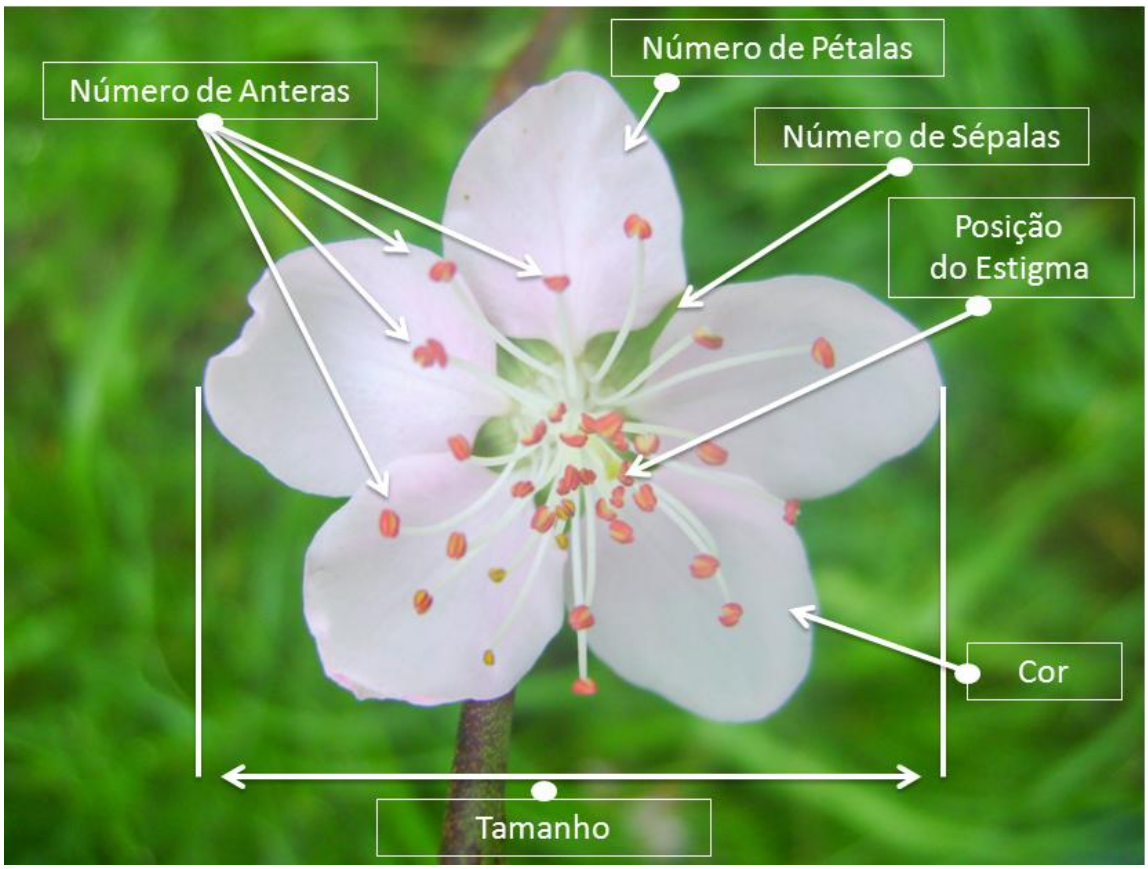
Desta maneira, este estudo servirá como base para futuros trabalhos de pesquisa na área de fisiologia vegetal e melhoramento genético de plantas.

APÊNDICE

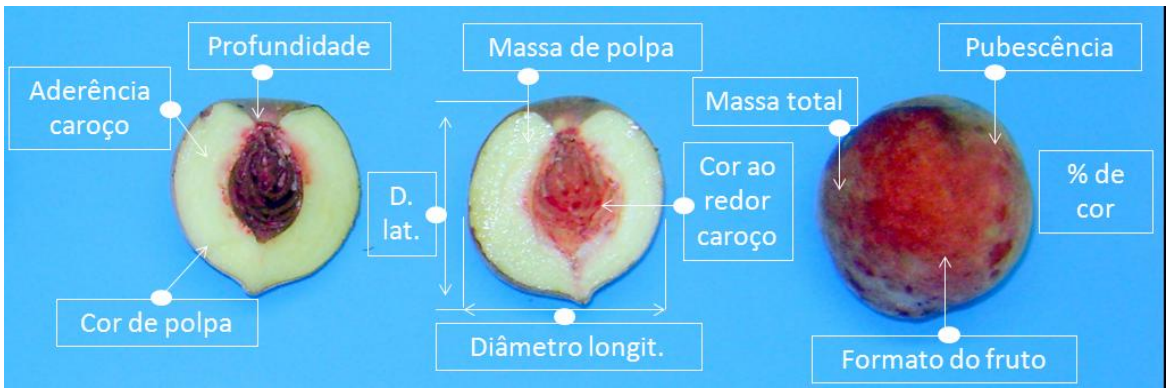
Apêndice 1. Acessos avaliados em estádio de desenvolvimento floral (reprodutivo) do banco de germoplasma de porta-enxerto de *Prunus* avaliado neste estudo.



Apêndice 2a. Caracteres morfológicos avaliados no órgão folha dos acessos do banco de germoplasma de porta-enxerto de *Prunus* avaliado neste estudo.



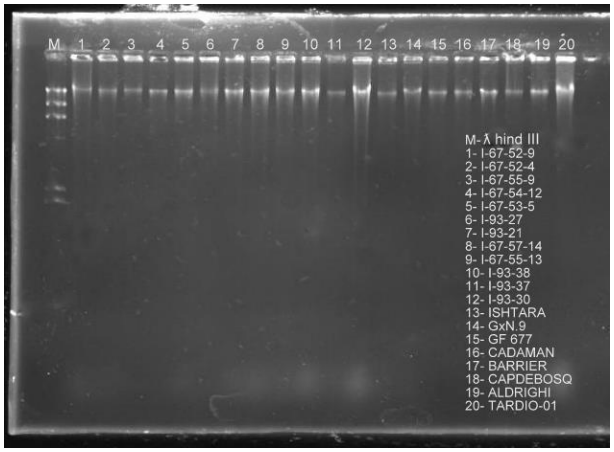
Apêndice 2b. Caracteres morfológicos avaliados no órgão flor dos acessos do banco de germoplasma de porta-enxerto de *Prunus* avaliado neste estudo.



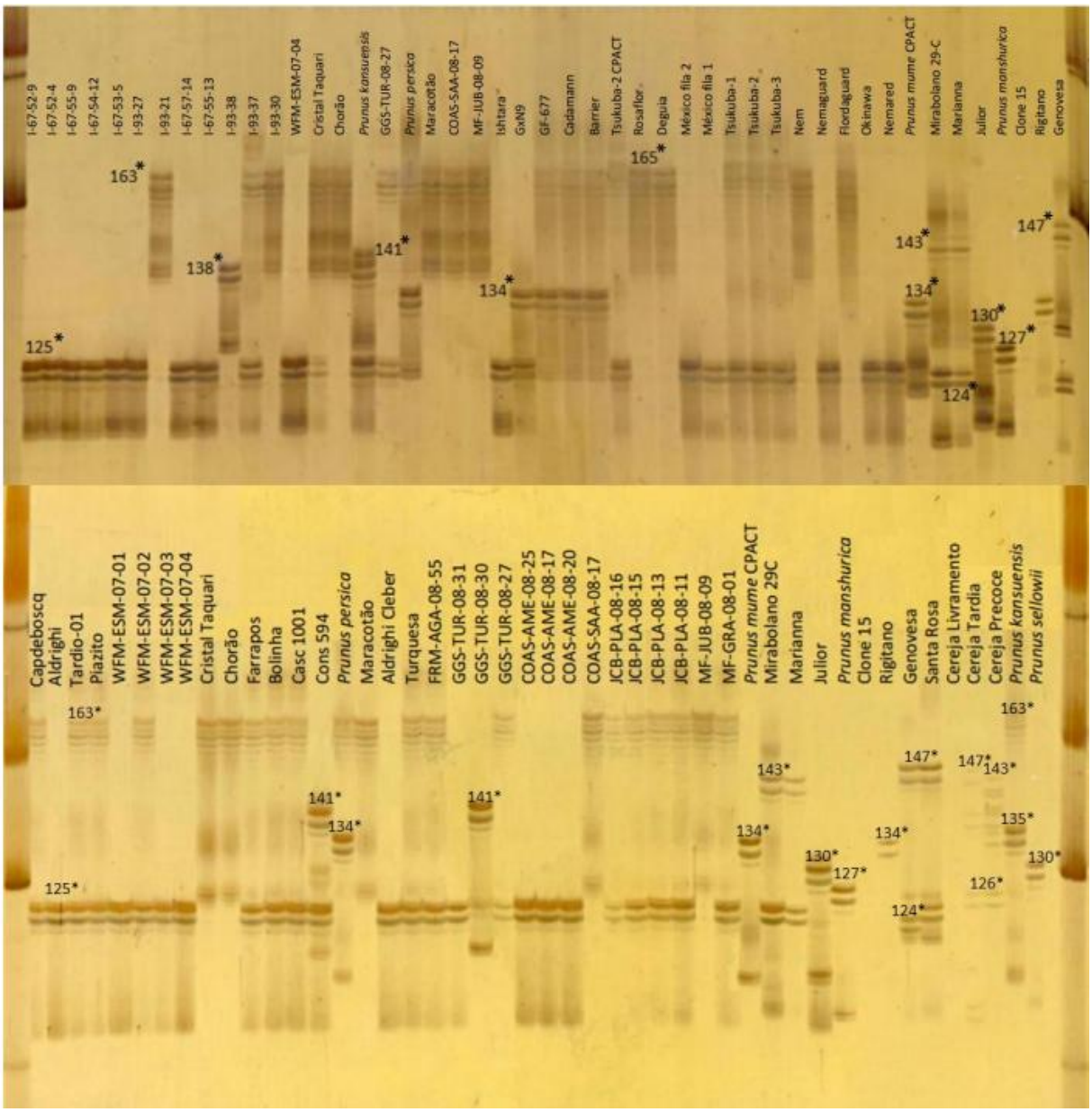
Apêndice 2c. Caracteres morfológicos avaliados no órgão fruto dos acessos do banco de germoplasma de porta-enxerto de *Prunus* avaliado neste estudo.

Apêndice 2d. Caracteres morfológicos avaliados no órgão caroço dos acessos do banco de germoplasma de porta-enxerto de *Prunus* avaliado neste estudo.

Apêndice 3. Ilustração da metodologia de análise molecular dos acessos que constituem o banco de germoplasma de porta-enxerto de *Prunus* avaliado neste estudo.



Apêndice 4. Gel de agarose utilizado para a quantificação de DNA dos acessos do banco de germoplasma de porta-enxerto de *Prunus* avaliado neste estudo.



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