

Caracterização molecular e variabilidade genética entre porta-enxertos de pessegueiro com base em marcadores codominantes

Luciane Arantes de Paula⁽¹⁾, Valmor João Bianchi⁽²⁾ e José Carlos Fachinello⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Departamento de Fitotecnia, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 Pelotas, RS. E-mail: lucianedepaula@yahoo.com.br, jfachi@ufpel.tche.br ⁽²⁾UFPel, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica. E-mail: valmorjb@yahoo.com

Resumo – O objetivo deste trabalho foi estabelecer um padrão para a caracterização molecular e a diferenciação de porta-enxertos de pessegueiro, bem como estimar parâmetros de variabilidade genética com base em marcadores codominantes. Catorze genótipos foram avaliados com uso de iniciadores para locos microssatélites das séries BPPCT e UDP, e para locos STS e SCAR. O perfil eletroforético foi registrado quanto à presença ou à ausência de bandas, as quais foram usadas para calcular a similaridade genética entre cultivares, por meio do coeficiente "simple matching", e para a análise de agrupamento de cultivares, pelo método das médias aritméticas não ponderadas (UPGMA). Foram calculados: número de alelos por loco, frequências alélicas, heterozigosidade esperada e observada, endogamia e conteúdo de informação polimórfica (PIC). Os 18 locos avaliados produziram 82 polimorfismos e permitiram elaborar um dendrograma que discriminou os genótipos em três grupos principais. A heterozigosidade esperada e observada nos 18 locos SSR foi de 0,66 e 0,22, respectivamente. Valores máximos para endogamia (1,0) foram identificados nos locos UDP 98407, UDP 98412, BPPCT 034, BPPCT 016, SCAR-SCAL 19 e STS OPAP4. O PIC variou de 0,81, para SCAR-SCAL 19, a 0,46, para UDP 98407. O polimorfismo dos 18 marcadores possibilita obter acurada relação genética entre os genótipos de pessegueiro avaliados e identificar os mais contrastantes para uso em programas de melhoramento.

Termos de indexação: *Prunus persica*, distância genética, frequência alélica, genética molecular, seleção de parentais.

Molecular characterization and genetic variability among peach rootstocks based on codominant markers

Abstract – The objective of this work was to establish a standard for molecular characterization and differentiation of peach rootstocks, as well to estimate genetic variability parameters based on codominant markers. Fourteen genotypes were evaluated using primers for microsatellite loci from the BPPCT and UDP series and for the STS and SCAR loci. The electrophoretic profile was recorded for the presence or absence of bands, which were used to calculate the genetic similarity among cultivars by the simple matching coefficient, and to perform cluster analysis by the unweighted arithmetic average (UPGMA) method. The number of alleles per locus, allele frequencies, observed and expected heterozygosity, inbreeding, and polymorphic information content (PIC) were calculated. The 18 loci produced 82 polymorphisms, allowing for the elaboration of a dendrogram, which discriminated the genotypes into three main groups. Observed and expected heterozygosity in the 18 SSR loci were 0.66 and 0.22, respectively. Maximum values for inbreeding (1.0) were identified in loci UDP 98407, UDP 98412, BPPCT 034, BPPCT 016, SCAR-SCAL 19, and STS OPAP4. PIC ranged from 0.81 for SCAR-SCAL 19, to 0.46 for UDP 98407. The polymorphism of the 18 markers allows for an accurate genetic relationship among the evaluated peach genotypes and the identification of the more contrasting ones for use in breeding programs.

Index terms: *Prunus persica*, genetic distance, allelic frequency, molecular genetics, parental selection.

Introdução

Marcadores moleculares do tipo codominantes, a exemplo dos microssatélites ou "simple sequence repeats" (SSR), têm sido amplamente indicados

para estudos de variabilidade genética, cálculos de frequência alélica, análise de segregação, mapeamento genético, identificação de genótipos e genética de populações, em virtude de sua natureza codominante e polimórfica (Ferreira & Grattapaglia, 1998). De acordo

com Ramalho et al. (1996), esses marcadores são muito importantes para trabalhos de conservação de germoplasma e programas de melhoramento.

É de grande interesse a obtenção e a identificação de variabilidade genética nas plantas, para que se possa realizar seleção efetiva que resulte em ganhos genéticos significativos (Bernardo, 2002). Portanto, estudos e estimativas de parâmetros de variabilidade genética são de fundamental importância, pois possibilitam realizar inferências quanto à frequência em que um alelo aparece em determinada população; permitem distinguir genótipos de forma eficaz, uma vez que facilitam a identificação de casos de sinônimas e homônimas entre cultivares; e auxiliam na seleção dos indivíduos que poderão ser utilizados para compor bancos de germoplasma ou serem utilizados no melhoramento genético.

Outra área de aplicação de marcadores moleculares é na certificação genética de plantas, por meio da caracterização molecular que, associada à caracterização morfofenológica, permite reconhecer com segurança o genótipo em todas as etapas de produção, a exemplo dos estudos realizados com macieira (Venturi et al., 2006), pessegueiro (Sosinski et al., 2000) e ameixeira (Bianchi et al., 2002).

Embora no Brasil o registro de cultivares não exija caracterização molecular, em outros países com sistemas de certificação de material vegetal consolidados, as técnicas moleculares têm permitido elaborar um tipo de impressão digital molecular da planta ("fingerprinting" varietal), o que facilita o controle de qualidade em qualquer etapa do processo produtivo (Bianchi et al., 2004a; Wickert et al., 2007).

Bianchi et al. (2004b) verificaram problemas de identificação inter e intravarietal de porta-enxertos de pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch], no Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), o que reforça a necessidade de comprovação da origem genética do material presente nesses bancos. Além disso, a identificação da variabilidade entre genótipos em bancos de germoplasma também tem se mostrado importante, como verificado nos trabalhos de Sosinski et al. (2000), Testolin et al. (2000), Aranzana et al. (2002) e Bouhadida et al. (2009).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um padrão para a caracterização molecular e a diferenciação de porta-enxertos de pessegueiro, bem como estimar

parâmetros de variabilidade genética com base em marcadores codominantes.

Material e Métodos

Foram analisados 14 genótipos de pessegueiro do Banco de Germoplasma de porta-enxertos da UFPel, Capão do Leão, RS: 'Nemaguard', 'Nemared', 'Flordaguard', 'Okinawa', 'Seleção UFPel 0402', 'Tsukuba 1', 'Kutoh', 'Ohatsumomo', 'Nagano Wild', 'Seleção UFPel 0390302', 'Rubira', 'Montclar', além das cultivares de copa antigas Capdeboscq e Aldrighi. O DNA foi extraído a partir de 50 mg de folhas frescas completamente expandidas, por meio do protocolo descrito por Doyle & Doyle (1991). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, dispostas em tubos de 2,0 mL, com 900 µL do tampão de extração (2% CTAB, 1,4 mol L⁻¹ de NaCl, 20 mmol L⁻¹ EDTA, 100 mmol L⁻¹ Tris, pH 8,0, 0,5% Mercaptoetanol, 1% PVP), e incubadas em banho-maria, por 60 min a 65°C. Em seguida, adicionou-se 900 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) às amostras, que foram agitadas por 5 min e centrifugadas por 10 min a 13.000 rpm. Após a centrifugação, foram coletados 700 µL de sobrenadante em novo tubo com igual volume de etanol absoluto, tendo-se mantido a amostra a -20°C por 2 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 13.000 rpm, e o sobrenadante foi eliminado. Cada precipitado de DNA foi lavado com 300 µL de etanol 70%. Para a suspensão final, foi utilizado tampão TE (10 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 1,0 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8,0) contendo RNase (10 µg mL⁻¹). O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8%.

Para as reações de PCR, foram utilizados iniciadores para locos microssatélites (SSR) da série UDP [UDP 96001, UDP 96003, UDP 96008, UDP 96013, UDP 96019, UDP 98407, UDP 98409, UDP 98412 e UDP 98414 (Cipriani et al., 1999)] e da série BPPCT [BPPCT 001, BPPCT 002, BPPCT 016, BPPCT 023, BPPCT 026, BPPCT 034 e BPPCT 041 (Dirlewanger et al., 2002)], além de iniciadores para locos STS [OPAP4 (Yamamoto & Hayashi, 2002)] e SCAR [SCAL 19 (Lecouls et al., 1999)].

Nas reações de PCR, foram utilizados 25 ng de DNA de cada amostra; 2,5 µL de 10X PCR buffer; 1,7 mmol L⁻¹ de MgCl₂; 0,5 µmol L⁻¹ de cada iniciador; 0,2 µmol L⁻¹ de dNTP; 0,75U de Taq DNA polimerase

kit Invitrogen, (Invitrogen, São Paulo, SP); e água Milli-Q, para volume final de 25 μ L.

As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador, modelo Icyler (Bio-Rad Laboratório Brasil Ltda., Rio de Janeiro, RJ), programado para dois ciclos de 94°C por 2 min, 55°C por 1 min, 72°C por 50 s; 39 ciclos de 94°C por 50 s, 52–60°C por 45 s, 72°C por 45 s; e um ciclo de 72°C por 15 min.

Aos produtos da reação de PCR, foram adicionados 10 μ L de solução desnaturante (98% de formamida, 10 mmol L⁻¹ EDTA, azul de bromofenol 0,05% e xileno cianol 0,05%), seguido de tratamento térmico a 95°C por 5 min. Uma alíquota de 4,5 μ L de cada amostra amplificada foi aplicada ao gel de poliacrilamida 6%, em tampão TBE 1X, a 65 V, por 3 horas. Para a visualização das bandas, utilizou-se nitrato de prata, segundo Bassam et al. (1991).

O perfil eletroforético dos genótipos foi registrado, tendo-se observado a presença ou a ausência de bandas em cada loco. O conjunto de dados foi utilizado para o cálculo da similaridade genética por meio do coeficiente "simple matching", e o agrupamento das cultivares foi feito pelo método das médias aritméticas não ponderadas (UPGMA), com uso do programa NTSYS versão 2.1 (Rohlf, 2000). Também foram calculados: frequências alélicas, heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho), endogamia (F), conteúdo de informação polimórfica por loco (PIC) e distâncias genéticas entre os genótipos, com uso do programa Genes (Cruz, 1997).

Resultados e Discussão

Dos 51 locos testados, apenas 18 apresentaram amplificação consistente, com produção de 82 polimorfismos. O número de alelos amplificados em cada loco variou de dois, com SCAR-SCAL 19, a sete, com UDP 96008, enquanto o número de alelos amplificados em cada genótipo, para cada loco, foi de no máximo dois, o que indica que se tratam de genótipos diploides (Figura 1 A e B).

Marcadores microssatélites têm sido muito utilizados em análises de "fingerprinting" varietal e em estudos de variabilidade genética, pela robustez e pela grande diversidade alélica, em comparação a outros tipos de marcadores moleculares. Essa característica, de acordo com Borém & Caixeta (2006), está relacionada à grande taxa de variação nas regiões de sequência repetidas,

constituente dos microssatélites. Essa variabilidade gera grande número de alelos por loco, facilmente detectáveis e com elevado poder discriminatório. Desse modo, a análise de poucos locos normalmente possibilita a diferenciação de genótipos, mesmo quando se trata de genótipos geneticamente muito

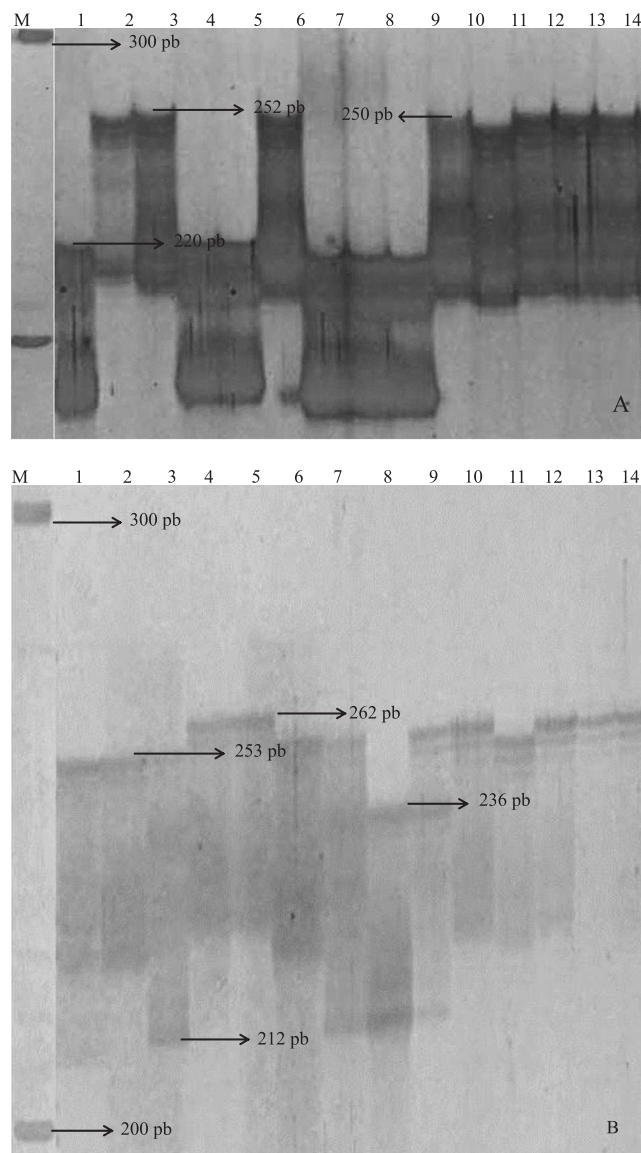


Figura 1. Produtos da amplificação gerada pelos marcadores microssatélites UDP 98407 (A) e BPPCT 041 (B), nos genótipos: 1, Nemaguard; 2, Nemared; 3, Flordaguard; 4, Okinawa; 5, Seleção UFPel 0402; 6, Tsukuba 1; 7, Kutoh; 8, Ohatsumomo; 9, Nagano Wild; 10, Capdeboscq; 11, Aldrighi; 12, Rubira; 13, Montclar; e 14, Seleção UFPel 0390302.

próximos ou aparentados. Isso pôde ser observado no presente trabalho, em que a análise seletiva de apenas três locos (BPPCT 041, BPPCT 023 e UDP 96003) foi suficiente para a diferenciação dos 14 genótipos (Figura 2).

A versatilidade e a confiabilidade da técnica de SSR têm sido verificadas por vários autores, na análise de "fingerprinting" e de diversidade genética, em diferentes espécies do gênero *Prunus* (Testolin et al., 2000; Aranzana et al., 2002; Bouhadida et al., 2009). O elevado poder discriminatório da técnica SSR também foi demonstrado por Sosinski et al. (2000), na identificação de diferenças entre pessegueiros da cultivar Springcrest, em que o SSR revelou polimorfismo suficiente para detectar variabilidade entre plantas da mesma cultivar, mas originadas de fontes diferentes.

No presente trabalho, os 82 polimorfismos obtidos foram utilizados para elaborar um dendrograma que permitiu a visualização de três grupos principais de

cultivares, com similaridade genética média (SGM), entre os 14 porta-enxertos, de 67% (Figura 3).

'Kutoh', 'Nagano Wild' e 'Ohatsumomo' formaram um grupo em que os dois primeiros porta-enxertos apresentaram similaridade genética de 93% (Figura 3), enquanto o último apresentou maior distanciamento (67% de similaridade). O agrupamento de 'Ohatsumomo' no mesmo grupo dos outros dois genótipos pode ser atribuído ao fato de ele compartilhar, com esses porta-enxertos, a mesma origem genética. Esperava-se a formação de um único grupo com 'Okinawa', 'Tsukuba 1' e 'Seleção UFPel 0402', por serem todos de origem japonesa. No entanto, isso não ocorreu, o que indica que talvez seja necessário que mais locos sejam avaliados para que se confirme a possibilidade de agrupamento de genótipos de mesma origem.

As cultivares Okinawa e Seleção UFPel 0402 ficaram agrupadas separadamente em relação aos demais porta-enxertos, com 70% de similaridade genética. Este agrupamento se explica pelo fato de

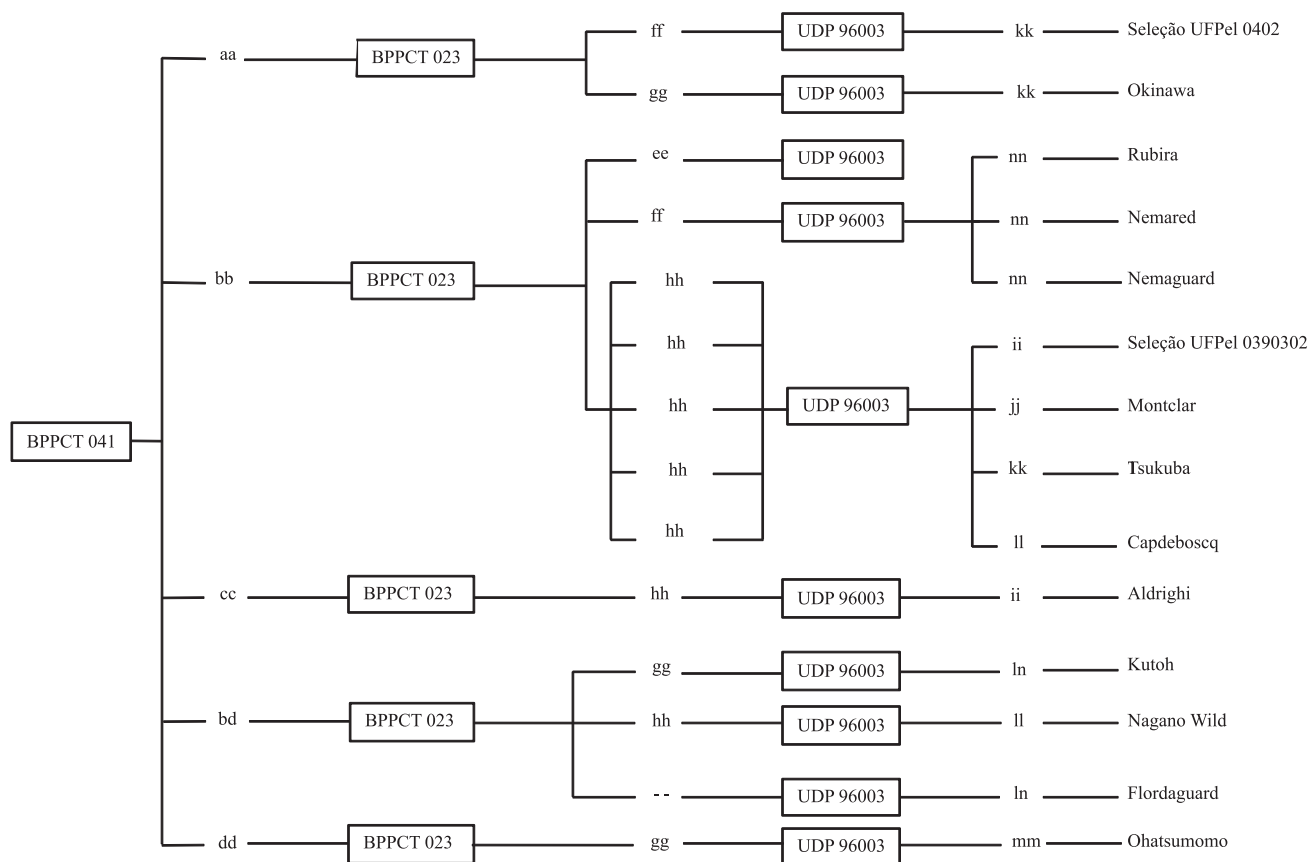


Figura 2. Chave de identificação de 14 porta-enxertos de pessegueiro, com base no polimorfismo de três marcadores de microssatélites: BPPCT 041, BPPCT 023 e UDP 96003.

'Seleção UFPel 0402' ser um genótipo obtido de uma população de plântulas derivadas por livre polinização de 'Okinawa' (Figura 3). Contudo, esperava-se obter índice de similaridade superior, e a similaridade relativamente baixa constatada é indicativo de que plântulas de 'Okinawa' podem apresentar significativa variabilidade genética. Não obstante, esse porta-enxerto vem sendo propagado por sementes.

'Capdeboscq' e 'Seleção UFPel 0390302' foram agrupados em um mesmo grupo, com similaridade genética de 82% (Figura 3). Essa proximidade pode ser explicada pelo fato de esse último genótipo ter sido obtido de população de plântulas derivadas de livre polinização da cultivar Capdeboscq.

Os porta-enxertos 'Nemared', 'Tsukuba 1', 'Rubira', 'Flordaguard' e 'Montclar' apresentaram similaridade genética de 79 a 82% e foram proximamente agrupados (Figura 3). Esses genótipos apresentam uma característica em comum, que é a coloração avermelhada das folhas, exceto 'Montclar', cujas folhas são verdes. De acordo com Yamamoto et al. (2001), os locos UDP 98409, UDP 96019 e UDP 96001, avaliados no presente trabalho, estão posicionados no mesmo grupo de ligação do caractere coloração das folhas. Esse resultado confirma a possível ligação desses marcadores com o referido caractere, o que justifica a forma de agrupamento.

'Rubira' e 'Montclar', juntamente com 'Capdeboscq' e 'Seleção UFPel 0390302', apresentam como característica contrastante a 'Tsukuba 1', 'Nemared' e 'Flordaguard' a susceptibilidade ao

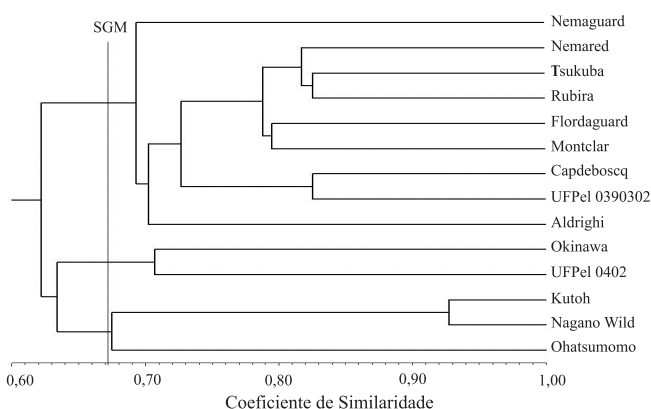


Figura 3. Dendrograma de similaridade baseado em locos microssatélites de porta-enxertos de pessegueiro, obtido pelo método de agrupamento UPGMA.

nematoide-das-galhas. Assim, o agrupamento do porta-enxerto 'Montclar' próximo ao 'Flordaguard' talvez esteja associado ao compartilhamento de alelos não ligados à coloração da folha ou à resistência a nematoides. Com relação a esse último caractere, esperava-se um melhor agrupamento entre as cultivares resistentes ao nematoide-das-galhas, o que não foi observado, possivelmente em virtude de grande parte dos marcadores utilizados neste trabalho não estarem associados à doença.

O agrupamento formado com o uso do método UPGMA foi similar ao obtido pela análise da projeção das distâncias genéticas entre os genótipos (Figura 4), o que confirma a relação genética entre os grupos formados. Agrupamento similar obtido com uso de duas técnicas distintas também foi verificado por Bertan et al. (2006) e por Silva et al. (2007), em genótipos de trigo.

A heterozigidade média esperada e observada, nos 18 locos SSR, foi de 0,66 e 0,22, respectivamente (Tabela 1). Cipriani et al. (1999) e Testolin et al. (2000), com uso de marcadores microssatélites em população de pessegueiro, obtiveram maior heterozigidade esperada (0,68) no loco UDP 96003. Entretanto, esse resultado foi inferior ao encontrado no presente trabalho. Dirlwanger et al. (2002), ao usar microssatélites da série BPPCT, obtiveram o maior valor de heterozigidade (0,42) para o loco BPPCT 001. No presente trabalho, o maior valor também foi observado para o mesmo loco dessa série (0,79), o que indica que ele apresenta alta informatividade em estudos de variabilidade genética.

Os locos UDP 98407, UDP 98412, BPPCT 034, BPPCT 016, SCAR-SCAL 19 e STS OPAP4 apresentaram os maiores valores (1,00) de endogamia (Tabela 1). Os valores negativos, encontrados nos locos UDP98414 e BPPCT041 indicam alta heterozigidade. A análise do coeficiente de endogamia possibilita mensurar a deficiência ou o excesso de heterozigotos nas populações (Reis et al., 2011).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) é um indicador da qualidade do marcador, de acordo com Botstein et al. (1980). Segundo classificação destes autores, locos marcadores com PIC superior a 0,50 são considerados muito informativos, enquanto os com valores entre 0,25–0,50 são medianamente informativos e os com valores inferiores a 0,25, pouco informativos. No presente trabalho, os maiores valores encontrados

foram de 0,81, para SCAR-SCAL 19, e de 0,79, para UDP 96003, e os menores valores foram de 0,46, para UDP 98407, e de 0,46, para BPPCT 034. A média entre todos os marcadores foi de 0,62, o que indica que os marcadores utilizados podem ser considerados de muito a medianamente informativos (Tabela 1).

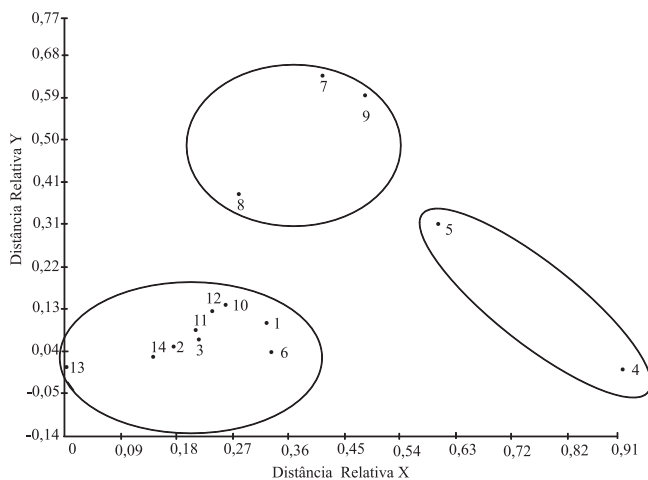


Figura 4. Projeção de distâncias relativas entre os porta-enxertos: 1-Nemaguard, 2-Nemared, 3-Flordaguard, 4-Okinawa, 5-Seleção UFPel 0402, 6-Tsukuba 1, 7-Kutoh, 8-Ohatsumomo, 9-Nagano Wild, 10-Capdeboscq, 11-Aldrighi, 12-Rubira, 13-Montclar, 14-Seleção UFPel 0390302.

Tabela 1. Frequências alélicas, heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho), coeficiente de endogamia (F) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) de 18 locos avaliados em 14 porta-enxertos de pessegueiro.

Loco	Alelos	He	Ho	F	PIC
UDP 98407	3	0,56	0,00	1,00	0,46
UDP 96008	7	0,68	0,57	0,16	0,65
UDP 98409	6	0,52	0,14	0,82	0,50
UDP 96001	5	0,71	0,29	0,45	0,66
UDP 96013	5	0,49	0,29	0,60	0,47
UDP 96019	5	0,65	0,15	0,69	0,60
UDP 98414	5	0,71	1,00	-0,53	0,66
UDP 96003	6	0,82	0,08	0,89	0,79
UDP 98412	4	0,60	0,00	1,00	0,55
BPPCT 002	5	0,72	0,14	0,76	0,68
BPPCT 041	4	0,57	0,86	-0,18	0,53
BPPCT 023	4	0,63	0,08	0,89	0,57
BPPCT 026	4	0,69	0,21	0,63	0,63
BPPCT 034	3	0,56	0,00	1,00	0,47
BPPCT 001	6	0,79	0,21	0,69	0,76
BPPCT 016	4	0,70	0,00	1,00	0,65
SCAR-SCAL 19	2	0,81	0,00	1,00	0,81
STS-OPAP4	4	0,73	0,00	1,00	0,68
Média	4,56	0,66	0,22	0,66	0,62

Foi possível identificar os porta-enxertos mais contrastantes (Figura 3) e úteis ao melhoramento. A cultivar Nagano Wild, por exemplo, apresentou similaridade de 55% com a cultivar Aldrighi, que tem como característica de interesse a boa adaptação às condições climáticas da região Sul do Brasil. Outro resultado contrastante observado (similaridade de 55%) foi entre 'Okinawa', 'Seleção UFPel 0390302' e 'Montclar'. O primeiro genótipo apresenta resistência a *Meloidogyne* spp., o segundo é bem adaptado às condições climáticas da região Sul do país, e o terceiro apresenta boa uniformidade de plantas e elevado vigor de sementes (Loreti, 2008), características desejáveis para o melhoramento de porta-enxertos de pessegueiro.

Conclusão

Os marcadores codominantes utilizados apresentam elevada capacidade discriminatória dos genótipos sob análise e possibilitam a detecção de acurada relação genética entre os porta-enxertos de pessegueiro avaliados, bem como a identificação dos mais contrastantes para uso no melhoramento genético.

Referências

- ARANZANA, M.J.; GARCIA-MAS, J.; CARBÓ, J.; ARÚS, P. Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. **Plant Breeding**, v.121, p.87-92, 2002.
- BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.196, p.80-83, 1991.
- BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Woodbury: Stemma, 2002. 360p.
- BERTAN, I.; CARVALHO, F.I.F. de; OLIVEIRA, A.C. de; VIEIRA, E.A.; HARTWIG, I.; SILVA, J.A.G. da; SHIMIDT, D.A.M.; VALÉRIO, I.P.; BUSATO, C.C.; RIBEIRO, G. Comparação de métodos de agrupamento na representação da distância morfológica entre genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.12, p.279-286, 2006.
- BIANCHI, V.J.; FACHINELLO, J.C.; SCHUCH, M.W.; SANSAVINI, S. Caracterização molecular de cultivares de pessegueiro e nectarineira com microsatélites. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, p.490-493, 2004a.
- BIANCHI, V.J.; SANSAVINI, S.; FACHINELLO, J.C. Microsatellite markers for identification of *Prunus* spp. rootstocks. **Scientia Agricola**, v.61, p.303-306, 2004b.
- BIANCHI, V.J.; VENTURI, S.; FACHINELLO, J.C.; TARTARINI, S.; SANSAVINI, S. I marcatori AFLP e SSR, risolutivi nella

- identificazione genética delle varietà di susino. **Frutticoltura**, v.64, p.83-87, 2002.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 374p.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, H.; DAVIS, R. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- BOUHADIDA, M.; CASAS, A.M.; GONZALO, M.J.; ARÚS, P.; MORENO, M.A.; GOGORCENA, Y. Molecular characterization and genetic diversity of *Prunus* rootstocks. **Scientia Horticulturae**, v.120, p.237-245, 2009.
- CIPRIANI, G.; LOT, G.; HUANG, W.G.; MARRAZZO, M.T.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.65-72, 1999.
- CRUZ, C.D. **Programa GENES**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 1997. 442p.
- DIRLEWANGER, E.; COSSON, P.; TAVAUD, M.; ARANZANA, M.J.; POIZAT, C.; ZANETTO, A.; ARÚS, P.; LAIGRET, F. Development of microsatellite markers in peach [(*Prunus persica* (L.) Batsch)] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.105, p.127-138, 2002.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.1, p.13-15, 1991.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa- CENARGEN, 1998. 220p.
- LECOULS, A.C.; RUBIO-CABETAS, M.J.; MINOT, J.C.; VOISIN, R.; BONNET, A.; SALESSES, G.; DIRLEWANGER, E.; ESMENJAUD, D. RAPD and SCAR markers linked to the Mal root-knot nematode resistance gene in Myrobalan plum (*Prunus cerasifera* Ehr.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.328-335, 1999.
- LORETI, F. Porta-enxertos para a cultura do pessegueiro do terceiro milênio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p.274-284, 2008.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. 5.ed. São Paulo: Globo, 1996. 359p.
- REIS, R.V. dos; OLIVEIRA, E.J. de; VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; SILVA, M.G. de M. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro-amarelo detectada por marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.51-57, 2011.
- ROHLF, F.J. **NTSYS.PC**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. New York: Exeter, 2000.
- SILVA, J.A.G. da; CARVALHO, F.I.F. de; HARTWIG, I.; CAETANO, V. da R.; BERTAN, I.; MAIA, L.C. da; SCHIMIDT, D.A.M.; FINATTO, T.; VALÉRIO, I.P. Distância morfológica entre genótipos de trigo com ausência e presença do caráter "stay-green". **Ciência Rural**, v.37, p.1261-1267, 2007.
- SOSINSKI, B.; GANNAVAPU, M.; HAGER, L.D.; BECK, L.E.; KING, G.J.; RYDER, C.D.; RAJAPAKSE, S.; BAIRD, W.V.; BALLARD, R.E.; ABBOT, A.G. Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.421-428, 2000.
- TESTOLIN, R.; MARRAZZO, T.; CIPRIANI, G.; QUARTA, R.; VERDE, I.; DETTORI, M.T.; PANCALDI, M.; SANSVINI, S. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. **Genome**, v.43, p.512-520, 2000.
- VENTURI, S.; DONDINI, L.; DONINI, P.; SANSVINI, S. Retrotransposon characterisation and fingerprinting of apple clones by S-SAP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.112, p.440-444, 2006.
- WICKERT, E.; LEMOS, E.G. de M.; PEREIRA, F.M.; MAYER, M.A. Marcadores fAFLP na caracterização de três genótipos de umezeiro selecionados como porta-enxertos para pessegueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1741-1746, 2007.
- YAMAMOTO, T.; HAYASHI, T. New root-knot nematode resistance genes and their STS markers in peach. **Scientia Horticulturae**, v.96, p.81-90, 2002.
- YAMAMOTO, T.; SHIMADA, T.; IMAI, T.; YAEGAKI, H.; HAJI, T. Characterization of morphological traits based on a genetic linkage map in peach. **Breeding Science**, v.51, p.271-278, 2001.

Recebido em 25 de agosto de 2011 e aprovado em 16 de janeiro de 2011