



JULIANA STRACIERI

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE
PERA (*Pyrus communis* L.) DETECTADOS POR
MARCADORES MOLECULARES**

LAVRAS - MG

2012

JULIANA STRACIERI

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE PERA (*Pyrus
communis* L.) DETECTADOS POR MARCADORES MOLECULARES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dra. Luciane Vilela Resende

Lavras-MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Stracieri, Juliana.

Diversidade genética entre acessos de pera (*Pyrus communis* L.) detectados por marcadores moleculares / Juliana Stracieri. – Lavras : UFLA, 2012.

57 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Luciane Vilela Resende.

Bibliografia.

1. Caracterização genética. 2. Diversidade genética. 3. Marcador microsatélite. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.1323

JULIANA STRACIERI

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE
PERA (*Pyrus communis* L.) DETECTADOS POR
MARCADORES MOLECULARES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 06 de Agosto de 2012.

Dr. Renato Mendes Guimarães UFLA

Dra. Mariney de Menezes UFLA

Dra. Luciane Vilela Resende
Orientador

Lavras-MG

2012

*Meus pais, Alcides e Vicentina pelo apoio incondicional,
meu irmão Fabiano e meu sogro Alberto pelo exemplo e incentivo,
meu namorado e melhor amigo, Luis Carlos, pela compreensão e pelo apoio.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras – UFLA e ao departamento de Agricultura – DAG, pela realização do curso de pós-graduação.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG, pelo incentivo científico e apoio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, por conceder a bolsa de estudos.

À minha orientadora, Luciane Vilela Resende, que sempre se fez presente, proporcionando-me crescimento e confiando no meu trabalho.

Aos professores do DAG, pelo conhecimento transmitido ao longo do curso.

A todos do laboratório de Análise de Sementes, em especial: Wilder, Adriano, Mariney e Natalia, que participaram direta ou indiretamente do trabalho diário.

Ao Lucas Rezende Pinheiro pelo apoio na análise dos dados.

Aos funcionários do DAG, em especial à secretária da pós-graduação em Fitotecnia, Marli dos Santos Túlio.

RESUMO

A pereira é uma frutífera pertencente à família Rosaceae e ao gênero *Pyrus*. No Brasil, a produção de peras é de aproximadamente 16 mil toneladas por ano, que representa menos de 10% do total da fruta consumida no país, a baixa produção se deve à falta de cultivares adaptadas às condições climáticas. Com o presente trabalho objetivou-se identificar e avaliar a diversidade genética entre acessos de pera (*Pyrus communis* L.), em seis municípios do Sul de Minas Gerais (Carrancas, Itumirim, Lavras, Nepomuceno, Perdões e Ribeirão Vermelho). A caracterização genética foi efetuada em 147 acessos de sete populações, com base em 21 *primers* SSR, as análises de agrupamento dos genótipos foram realizadas pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages) com base no coeficiente de Jaccard. A similaridade genética entre as populações foi calculada pelo índice de identidade de Nei. Em todos os *primers* foram observadas bandas polimórficas sendo que estas corresponderam a aproximadamente 93% do total de bandas observadas; em média, cada iniciador produziu 8,4 fragmentos. O coeficiente de dissimilaridade para todos os genótipos variaram de 0,032 a 0,69. As populações dois e sete, respectivamente das regiões de Perdões - MG e Lavras - UFLA foram as que apresentaram maior distância genética em relação às demais e agruparam-se separadamente com similaridade de 0,83. Em contrapartida, as populações dois e quatro, respectivamente de Perdões e Ribeirão Vermelho, apresentaram a maior semelhança genética, em torno de 0,94. Também foi constatado que a população sete, coletada na região de Lavras - UFLA, foi a que apresentou maior número de bandas polimórficas, obtendo assim a maior porcentagem de polimorfismo (86,24%) e, conseqüentemente, maior diversidade genética. Já as populações dois e cinco, provenientes de Perdões e Lavras - CG, apresentaram o menor número de fragmentos em heterozigose e, conseqüentemente, a menor diversidade genética. Observou-se que há variabilidade genética entre os acessos de pera estudados.

Palavras-chave: Marcador microssatélite, caracterização genética, diversidade genética

ABSTRACT

The pear is a fruit belonging to the family Rosaceae and the genus *Pyrus*. In Brazil, the production of pears is approximately 16.000 tonnes per year, which represents less than 10% of the total fruit consumed in the country, the low production is due to lack of cultivars adapted to climatic conditions. This study aimed to identify and evaluate genetic diversity among accessions of pear (*Pyrus communis* L.) in six cities of Southern Minas Gerais (Carrancas, Itumirim, Lavras, Nepomuceno, Perdões and Ribeirão Vermelho). Genetic characterization was performed in 147 accessions of seven populations, based on 21 SSR primers, the cluster analysis of genotypes were performed by using UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages) based on Jaccard. The genetic similarity between populations was calculated by Nei's identity index. In all primers were observed polymorphic bands corresponded to approximately 93% of the observed bands, on average, each initiator fragments produced 8.4. The dissimilarity coefficient for all genotypes ranged from 0.032 to 0.69. Populations 2 and 7, respectively in the regions of Perdões and Lavras - UFLA showed the greatest genetic distance compared to the others and were grouped separately with similarity of 0.83. However, population 2 and 4, respectively Perdões and Ribeirão Vermelho, showed the greatest genetic similarity, about 0.94. It was found that population 7, collected in Lavras - UFLA, showed the highest number of polymorphic bands, thus obtaining the highest percentage of polymorphism (86.24%) and consequently greater genetic diversity. Already populations 2 and 5, from Perdões and Lavras - CG, showed the lowest number of fragments in heterozygous and consequently the lowest genetic diversity. It was observed that there is variability among the accessions studied pear.

Keywords: microsatellite marker, genetic characterization, genetic divergence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração botânica de <i>Pyrus communis</i> L. (THOMÉ, 2012).....	17
Figura 2	Gel de poliacrilamida contendo exemplo de polimorfismo detectado pelo <i>primer</i> KA16 nos acessos seis e sete da população de Itumirim, nos acessos de um a 11 da população de Perdões e nos acessos de um e dois da população de Nepomuceno.....	36
Figura 3	Determinação do número ideal de fragmentos.....	39
Figura 4	Dendrograma gerado pelo método UPGMA por meio da matriz de dissimilaridade de Jaccard, por <i>primers</i> SSR, entre acessos de <i>Pyrus communis</i> L.....	41
Figura 5	Dendrograma UPGMA das populações de <i>Pyrus communis</i> L.....	42
Figura 6	Distribuição espacial da análise de coordenadas principais por marcadores SSR.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção das principais frutíferas de clima temperado, entre os anos de 2005 e 2010 (FAO, 2012).....	19
Tabela 2	Área colhida das principais frutíferas de clima temperado, entre os anos de 2005 e 2010, Brasil (FAO, 2012).....	19
Tabela 3	Participação de cada Estado na produção das principais frutíferas de clima temperado em 2010, Brasil (IBGE, 2012).....	20
Tabela 4	Resultados de comparações entre dois acessos por marcadores SSR.....	25
Tabela 5	Procedência das populações estudadas de <i>Pyrus sp.</i>	27
Tabela 6	Populações de <i>Pyrus sp.</i> estabelecidas de acordo com o sítio de coleta, visando à diversidade genética.....	27
Tabela 7	Características referentes aos 21 pares de <i>primers testados</i> . F: <i>primer forward</i> ; R: <i>primer reverse</i> (YAMAMOTO, 2002).....	29
Tabela 8	Esquema da análise de variância molecular (AMOVA) para sete populações de <i>Pyrus communis</i> L., com as respectivas esperanças dos quadrados médios.....	34
Tabela 9	<i>Primers</i> SSR, número de fragmentos totais e de fragmentos polimórficos obtidos.....	38
Tabela 10	Padrão de fragmentos gerados pelos <i>primers</i> SSR nas populações de <i>Pyrus communis</i> L.....	44

Tabela 11	Análise genética das populações pelos <i>primers</i> SSR; I: índice de Shannon, He: Heterozigose esperada, %P: percentagem de locos polimórficos. O desvio padrão é apresentado entre parênteses.....	45
Tabela 12	Análise de variância molecular (AMOVA) das populações de <i>Pyrus communis</i> L.....	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	A CULTURA DA PERA	14
2.1.1	Origem, história e botânica da pereira	14
2.1.2	Importância econômica da pereira.....	18
2.1.3	Cultivares da pera	21
2.2	MARCADORES MOLECULARES	22
2.2.1	Marcadores microssatélites (SSR).....	24
2.2.2	Diversidade genética.....	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Material vegetal.....	26
3.2	Extração de DNA.....	27
3.3	Quantificação e diluição do DNA	28
3.4	Amplificação (SSR)	28
3.5	Eletroforese e visualização dos géis	31
3.6	Análises estatísticas	31
3.6.1	Diversidade genética	31
3.6.2	Variabilidade genética	33
3.6.3	Identificação do número ótimo de marcadores.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	Nível de polimorfismo	35
4.2	Identificação do número ótimo de marcadores.....	38
4.3	Diversidade genética entre os acessos.....	40
4.4	Diversidade genética entre as populações.....	42
4.5	Variabilidade genética inter e intrapopulacional	43
4.6	Análise de variância molecular (AMOVA)	45
5	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48
	ANEXOS.....	54

1 INTRODUÇÃO

A pera (*Pyrus communis* L.) é a fruta fresca importada em maior quantidade pelo Brasil e sua produção nacional se concentra na região Sul do país, existindo uma pequena produção em alguns estados do Sudeste. Em Minas Gerais seu cultivo é pouco expressivo, em razão da falta de cultivares adaptadas a aspectos climáticos e à presença de materiais crioulo e de origem desconhecida.

Apesar da grande diversidade genética nas espécies frutíferas, a produção de frutas, em geral, é dependente de um número limitado de cultivares. Em particular, a produção mundial de *Pyrus communis* L. é baseada em menos de dez variedades (MOURGUES et al., 1996).

A caracterização molecular tem sido utilizada com diversas finalidades, dentre elas a quantificação e caracterização da diversidade genética, que é realizada por meio de medidas de similaridade ou dissimilaridade, as quais são visualizadas por métodos de agrupamentos. Com isso, os marcadores moleculares permitem acessar o genótipo e a variabilidade do ácido desoxirribonucleico (DNA) de acessos de plantas, assim, identificar polimorfismo.

Um dos marcadores moleculares que se destacam por sua utilidade em estudos de diversidade genética são os marcadores moleculares microssatélites (SSR). Apresentam característica codominante, que lhes permite a separação de indivíduos heterozigotos e homozigotos, são multialélicos, que os tornam altamente polimórficos dentre todos os marcadores moleculares. Os marcadores microssatélites são obtidos de forma simples, por meio de amplificação via PCR (polymerase chain reaction) e são altamente reproduzíveis e passíveis de automatização, que permite rapidez na avaliação de um grande número de genótipos e locos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Objetivou-se com esse trabalho identificar e avaliar a diversidade genética de acessos de pera, obtidos de diferentes populações de cultivo

comercial e familiar do Sul de Minas Gerais, pelo uso de marcadores moleculares microssatélites.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A CULTURA DA PERA

2.1.1 Origem, história e botânica da pereira

A pereira pertence à família *Rosaceae* e gênero *Pyrus*. É uma planta perene, oriunda de países de clima temperado, onde o frio hibernal é acentuado. Compreende mais de 20 espécies, todas nativas do Velho Mundo do Hemisfério Norte, sendo as mais importantes pertencentes às seguintes espécies: *Pyrus communis* L. (Europeias – nativas do sul da Europa e Ásia), *P. pyrifolia* ou *P. serotina* (Asiáticas – nativas da Mongólia), *P. bretschneideri* (Chinesa) e híbridos entre *P. communis* e *P. pyrifolia*. Outra espécie menos conhecida comercialmente, porém muito utilizada em programas de melhoramento, em razão de sua rusticidade é a *P. ussuriensis* (Siberiana), motivo pelo qual é muito cruzada com *P. communis* (MITCHAM; MITCHELL, 2007; NAKASU; FAORO, 2003). Outras espécies ainda são utilizadas como porta-enxerto (*P. calleryana* Dcne e *P. betulaefolia* Bge), para a indústria (*P. nivalis* Jacp.) e com finalidades ornamentais (*P. calleryana* Dcne) (MITCHAM; MITCHELL, 2007).

O desenvolvimento de modernas variedades teve início em 1700 na Bélgica, onde havia adequadas condições de crescimento para as pereiras: baixa temperatura, umidade e solos pesados. O padre belga Nicholas Hardenpont foi o primeiro melhorista noticiado, cultivando *seedlings* de pereira, produziu a primeira variedade de polpa macia e succulenta batizada como “fruta manteigosa” (MITCHAM; RACHEL, 2007).

Outros melhoristas amadores foram seus seguidores, tal como o farmacêutico e físico Jean Baptiste Von Mons, o qual em seu “Viveiro da Fidelidade” caracterizou mais de 80 mil *seedlings* (MITCHAM; MITCHELL, 2007). Segundo registros, durante o século XVI a XVIII a França era o maior produtor de pera, possuindo no ano de 1867 cerca de 900

cultivares e no século XVIII, na Bélgica, foram desenvolvidas as cultivares Beurré Bosc, Beurré D'Anjou, Flemish Beauty e Winter Nelis (LAYNE; QUAMME, 1975).

Não foram encontrados relatos históricos da introdução da pera no Brasil, no entanto, a espécie mais difundida é a *Pyrus communis* L., popularmente conhecida como pera europeia, essas são alógamas, diploides ($2n=34$, $n=17$), andróginas e apresentam auto-incompatibilidade (QUEZADA; NAKASU; HERTER, 2003).

As gemas de pereira são mistas, pois apresentam a parte floral e a parte vegetativa na mesma estrutura. As folhas são serradas, crenadas ou inteiras, são involutas na gema e pecioladas, apresentando duas estípulas bem desenvolvidas na base (QUEZADA; NAKASU, 2003).

As flores são brancas e raramente rosadas. O cálice é composto de cinco sépalas e as pétalas, também em número de cinco, apresentam formato de unha. Apresentam de 20 a 30 estames com anteras comumente vermelhas (LAYNE; QUAMME, 1975). Os estiletos variam de dois a cinco e são livres, porém, estreitamente unidos na base. Os ovários são ínferos, tendo cinco lóculos com dois óvulos por lóculo, apresentando, no máximo, um conjunto com dez sementes por fruta (BELL et al., 1996).

A pereira apresenta flores completas, andróginas e com auto - incompatibilidade gametofítica, característica muito comum em frutíferas de clima temperado, geralmente são polinizadas por insetos (LEITE; SOUZA, 2003). A eficiência do processo de polinização depende de fatores relacionados à cultura a ser polinizada, como, por exemplo, estrutura e morfologia da flor, horário de liberação do pólen, viabilidade e longevidade do pólen, período de receptividade do estigma, vida útil dos óvulos e concentração e conteúdo de açúcar total de seu néctar (FREITAS, 1996).

O fruto da pereira, a pera, assim como a maçã, é um pseudofruto, formado pelo ovário envolvido pelo receptáculo floral, carnoso e muito desenvolvido que é a porção comestível de frutos (Figura 1). São bagas grandes e suculentas, que existem em milhares de variedades e se

diferenciam pela forma, tamanho, cor, consistência, sabor, aroma e casca. Os formatos vão das que lembram um violão às redondas. Os tamanhos podem variar de seis a 15 cm de comprimento; a cor pode ir do verde ao amarelo, passando pelo castanho e o vermelho. Quanto à consistência, os tipos de pera variam entre a dura e granulosa e a macia e cremosa, que “derrete na boca”, característica que concedeu à pera o apelido de “fruta manteiga” (BARBOSA et al., 1995).



Figura1 Ilustração botânica de *Pyrus communis* L. (THOMÉ, 2012)

2.1.2 Importância Econômica da Pereira

A pera é uma das frutas frescas importada em maior quantidade pelo Brasil. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Frutas - IBRAF (2009), em 2011, foram importadas aproximadamente 210 mil toneladas, superando em 10,79% a quantidade de 2010. O Brasil importa até 90% da fruta *in natura* consumida no país. Os principais países fornecedores são: Argentina (81,8% do total importado), Portugal (8,4%), Estados Unidos da América (6,2), Espanha (2,3), e outros (1,3). Assim é possível afirmar que a cultura da pereira constitui uma importante oportunidade no mercado brasileiro.

Segundo Fachinello et al. (2011), os entraves que impossibilitam a produção satisfatória no Brasil são problemas relacionados ao vigor das plantas, tipo de porta-enxerto, abortamento floral, insuficiência de frio hibernal, falta de cultivares adaptadas às condições edafoclimáticas. O desenvolvimento de novas cultivares e de trabalhos de pesquisa que assegurem a produção contínua dessa espécie em condições adversas pode ajudar no aumento de áreas cultivadas em nosso país.

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, com uma produção de aproximadamente 42 milhões de toneladas ao ano, mas participa com apenas 2% do comércio global do setor, que demonstra o forte consumo interno (ANUÁRIO..., 2012). A área plantada com frutas no país é de aproximadamente 1,9 milhões de hectares.

As frutas que mais contribuem no volume total da produção brasileira são a laranja, banana, abacaxi, melancia e mamão que, juntas, somam aproximadamente 30 milhões de toneladas. Nesse contexto, a produção de frutas de clima temperado representa apenas 7,5 % da produção nacional (Tabela 1) e 8 % da área total cultivada com frutíferas no Brasil (Tabela 2); no entanto, são responsáveis por aproximadamente 37 % do valor total das exportações de frutas do país. Esses valores demonstram a grande importância da fruticultura de clima temperado, principalmente nas

exportações, as quais são necessárias para manter a balança comercial positiva.

Tabela 1 Produção das principais frutíferas de clima temperado, entre os anos de 2005 e 2010.

Produção (toneladas)						
Ano	Figo	Maçã	Marmelo	Pera	Pêssego	Uva
2010	25727	1275850	964	16367	220739	1305670
2009	24146	1222890	975	14856	216236	1365490
2008	22565	1124160	905	17391	239149	1421430
2007	23225	1115380	931	17074	185959	1371560
2006	25476	863019	910	18161	199719	1257060
2005	23697	850535	1078	19746	235471	1232560

Fonte: Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2012)

Tabela 2 Área colhida das principais frutíferas de clima temperado, entre os anos de 2005 e 2010.

Área colhida (ha)						
Ano	Figo	Maçã	Marmelo	Pera	Pêssego	Uva
2010	2933	38536	209	1533	20194	79970
2009	2886	38205	211	1394	19043	81355
2008	2859	38072	197	1609	21320	79946
2007	2850	37832	196	1650	22398	78273
2006	3007	36107	185	1723	22453	75354
2005	2911	35493	215	1759	23794	73203

Fonte: FAO (2012)

As frutíferas de clima temperado estão distribuídas em 11 dos 26 estados brasileiros, o Rio Grande do Sul responde por aproximadamente 49,3 % do total produzido no país, seguido de Santa Catarina (23,2 %), São Paulo (10,3 %), Paraná (6,2 %), Pernambuco (5,3 %), Bahia (3,0 %) e Minas

Gerais (1,8 %) (Tabela 3). Além desses, as frutíferas de clima temperado estão presentes no Estado do Rio de Janeiro, Paraíba, Mato Grosso e Goiás.

Tabela 3 Participação de cada Estado na produção das principais frutíferas de clima temperado em 2010.

Fruta	Produção (toneladas)	Participação de cada Estado (%)
Figo	25.727	RS (43,0); SP (20,7); MG(20,5); SC (10,3); PR (5,5)
Maçã	1.275.850	SC (50,9); RS (45,5); PR (3,2); SP (0,1); MG (0,2)
Marmelo	964	MG (51,4); BA (27,9); RS (20,7)
Pera	16.367	RS (56,8); PR (24,7); SP (10,4); MG (5,7); SC (2,5)
Pêssego	220.739	RS (65,1); SP(14,0); MG (11,8); PR (7,5); SC (1,6)
Uva	1.305.670	RS(54,2); SP(13,6); PE(11,7); PR(7,5); BA(6,7); SC(5,0); MG (0,9); PB (0,1); MT (0,1); GO(0,2)

Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2012)

A fruticultura participa diretamente na economia do país, por meio do valor das exportações e mercado interno e pode-se salientar ainda a importância no caráter econômico-social, uma vez que está presente em todos os estados brasileiros, sendo responsável pela geração de 5,6 milhões de empregos diretos, o equivalente a 27 % do total da mão - de - obra agrícola do país. O setor de fruticultura está entre os principais geradores de renda, emprego e de desenvolvimento rural do agronegócio nacional. A atividade frutícola possui elevado efeito multiplicador de renda e, portanto, com força suficiente para dinamizar economias locais estagnadas e com poucas alternativas de desenvolvimento (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

O aumento da área cultivada e a produção de frutas de clima temperado têm crescido no Brasil. As exportações brasileiras de frutas frescas passaram por um período negativo de cinco anos, entre 1994 e 1999,

em que o valor importado foi maior do que o exportado, resultando em déficit na comercialização de frutas (FAO, 2012).

Essa situação mudou a partir de 1999, quando o valor exportado passou a ser maior do que o valor importado e, a partir daí, o país vem somando sucessivos resultados positivos com as exportações de frutas frescas. No ano de 2011, o país exportou aproximadamente 680.000 toneladas de frutas, o que significou US\$ 633 milhões (IBRAF, 2009), dos quais as frutas de clima temperado representaram 197.964 toneladas.

Dessa forma, é notável a importância da fruticultura de clima temperado para o desenvolvimento da fruticultura nacional. As frutas mais produzidas são, em ordem decrescente, uva, maçã, pêssego, caqui, figo, pera e marmelo. O crescimento total no período de 1999-2009 foi de 43,5 %, que corresponde a 4,35% ao ano (FACHINELLO et al., 2011).

2.1.3 Cultivares de Pera

No Brasil, o cultivo da pereira é feito com sucesso na região Sul e em escala modesta, em áreas com altitude acima de 600 m de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. O plantio deve ser feito com base em mudas enxertadas das melhores cultivares disponíveis. Os frutos podem ser consumidos tanto ao natural como industrializados, em compotas, sucos e adicionados em iogurtes. A colheita é realizada entre os meses de dezembro a abril. As safras consideradas comerciais são obtidas a partir do quinto ano de instalação do pomar. Colhem-se os frutos pela coloração. A colheita é manual, em cestas ou caixas (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2007).

O cultivo comercial de frutíferas temperadas distribuiu-se por diversas regiões paulistas, graças às ações de programas locais de pesquisas, principalmente de melhoramento genético, de introdução e avaliação de cultivares e de sistemas de cultivo (BARBOSA et al., 1997).

Os resultados alcançados têm estimulado os fruticultores a investirem nesse mercado, popularizando culturas como videira e frutíferas de caroço.

Com isso, muitos pomares de frutas de clima temperado foram instalados em regiões novas, pouco pesquisadas quanto à adaptação climática e cultural.

No Brasil as cultivares mais utilizadas são:

Híbridos - IAC: ‘Primorosa’ (IAC 9-3), ‘Centenária’ (IAC 9-47), ‘Seleta’ (IAC 16-28), ‘Triunfo’ (IAC 16-34) e ‘Tenra’ (IAC 15-20, polinizante).

Peras rústicas tradicionais: tipo D’água (‘Branca’, ‘D’água’ de ‘Valinhos’ e ‘D’água de São Roque’), tipo Francês (‘Madame Sielboldt’ e ‘Grazzine’) e tipo dura ou d’água de outono (‘Kieffer’, ‘Schmidt’ e ‘Parda’).

Peras orientais: ‘Okussankichi’, ‘Hossui’, ‘Kossui’, ‘Atago’ e ‘Yari’ (para regiões mais frias).

Pera europeia: ‘Packham's Triumph’ (para regiões mais frias).

Porta-enxertos: pereiras comuns (‘Kieffer’ ou ‘Parda’); *Pyrus betulafolia* bunge; *Pyrus calleryana* Decne e marmeleiros (‘Portugal’ e ‘Provence’) (CAMPO DALL’ORTO et al., 1996).

Na região sul do estado de Minas Gerais, as peras rústicas tipo D’água predominam entre os produtores familiares, já nas populações Lavras – Casa da Goiaba, Carrancas e Lavras – UFLA foi relatado o plantio de híbridos IAC, além das peras rústicas encontradas na região.

2.2 MARCADORES MOLECULARES

Uma das formas de aumentar o número de variedades de pera existentes é por meio do melhoramento convencional, o qual requer vários anos, em função do longo período juvenil e alto nível de heterozigose da pera. Deste modo, a introdução de importantes características agronômicas, por meio da transformação genética, poderá ser um método alternativo,

rápido e sem causar um grande número de recombinações gênicas (MOURGUES; CHEVREAU; LAMBERT, 1996).

De acordo com Caboni, Lauri e Angelo (2000), o estabelecimento de um protocolo de regeneração é um dos pré-requisitos para programas de melhoramento genético. Estudos de melhoramento têm sido extensivamente utilizados como potentes ferramentas, tanto no que diz respeito à obtenção de cultivares com vantagens econômicas, como alta produtividade e melhor aspecto dos frutos, quanto à caracterização e conservação de material genético (PEREIRA, 1984).

A variação genética tem sido estudada pelos caracteres fenotípicos, que são frequentemente influenciados por condições ambientais (PESSON, 2011). Tais estudos, no entanto, passaram a ser complementados, nas últimas décadas, por técnicas moleculares (DREW, 1997; SUNIL, 1999), como marcadores moleculares, cujo conhecimento pode auxiliar, tanto em estudos de mapeamento genético de populações quanto na identificação de híbridos de interesse nas gerações de indivíduos e na seleção de potencial porta-enxerto, possibilitando ainda a definição de estratégias para conservação de recursos genéticos (SANTOS et al., 2007).

A utilização de marcadores moleculares é uma ferramenta chave que possibilita aos programas de melhoramento determinar mapeamento e diagnósticos genéticos, taxonomia molecular, análises de integridade genética e estudos evolutivos de macro e microrganismos. Alternativamente, o uso de marcadores genéticos, baseados na identificação de polimorfismo de DNA, é utilizado pelo melhorista para criar um padrão genético próprio de cada cultivar (WÜNCH; HORMAZA, 2007). Uma das principais vantagens da utilização destes é propiciar a redução do tempo para identificação da diversidade genética entre os indivíduos trabalhados (XAVIER et al., 2005).

Com o advento da técnica de PCR (reação da polimerase em cadeia) acelerou o desenvolvimento de novas classes de marcadores moleculares (MULLIS; FALOONA, 1987). Atualmente, as técnicas mais utilizadas de

marcadores moleculares, são as Isoenzimas, RFLP, RAPD, AFLP, SNP, SCAR e Microssatélites, os quais podem ser aplicados para diversos fins, por exemplo, estudar a estrutura genética de populações; análise de filogenia; detecção gênica com caracteres monogênicos ou poligênicos; identificação de variedades; avaliação de germoplasma; seleção indireta de características agrônômicas, dentre outros. Várias pesquisas estão sendo desenvolvidas nesta área tendo a sua eficiência comprovada em emprego das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, genética quantitativa e no melhoramento de plantas (BORÉM; CAIXETA, 2009).

2.2.1 Marcadores Microssatélites (SSR)

Um dos marcadores moleculares mais utilizados são os SSRs ou microssatélites. Estes são definidos como sequências repetidas em Tanden compostas de números variáveis de motivos contendo de um pb a seis pb (CHARLESWORTH; SIIEGOWSKI; STEPHAN, 1994). A primeira publicação, com a utilização dos SSR (simple sequence repeats) em plantas superiores, foi feita por Condit e Hubbel (1991). Os SSR são marcadores com base no polimorfismo de microssatélite. Microssatélites são regiões curtas e altamente repetidas do genoma, estas regiões do DNA são altamente polimórficas, portanto conveniente para a avaliação das relações entre os genótipos.

Esses marcadores fornecem um elevado nível de informação genética por *locus* em razão de: sua natureza codominante, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados, permitindo que sejam amplamente úteis em estudos populacionais; são altamente multialélicos; são amplificados via PCR, que facilita sua obtenção mesmo com poucas quantidades de DNA. Uma vez desenvolvidos os *primers* que amplificam tais regiões do genoma, podem ser facilmente explorados (SUGANUMA; CIAMPI, 2011). Além disso, os SSR são os marcadores que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo,

denominado “PIC” (*Polymorphism Information Content*) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores moleculares SSR têm se demonstrado ferramentas muito úteis e com diversas aplicações em estudos de caracterização de cultivares, criação de mapas genéticos e análises de diversidade genética em diversas espécies vegetais.

2.2.2 Diversidade Genética

Inicialmente para o estudo da divergência genética, é necessário o estabelecimento de um coeficiente de similaridade ou dissimilaridade entre os indivíduos. Este é o ponto inicial para várias técnicas de análise, que permite melhor visualização dos relacionamentos entre os indivíduos (DUARTE; SANTOS; MELO, 1999).

Existem diversos coeficientes de similaridade, mas os mais indicados, para a análise de dados binário, são aqueles que relacionam variáveis dicotômicas, ou seja, que possuem somente dois valores (GOWER, 1985).

Os coeficientes de similaridade mais simples relacionam-se com as variáveis binárias, em que cada variável pode assumir apenas dois valores. Para marcadores SSR, as quatro possíveis observações de comparação entre dois genótipos são classificadas com base na presença (1) ou na ausência (0) de um marcador para cada genótipo conforma Tabela 4.

Tabela 4 Resultados de comparações entre dois acessos por marcadores SSR.

		Genótipo <i>i</i>	
		1	0
Genótipo <i>j</i>	1	a (1, 1)	b (1, 0)
	0	c (0, 1)	d (0, 0)

A partir dos padrões de coincidência ou não coincidência das variáveis, na comparação de dois genótipos, vários coeficientes de similaridade têm sido propostos, combinando quantidades diferentes de a, b, c e d. Para isso, destacam-se os coeficientes de coincidência simples, o de Jaccard e o de Nei, os quais excluem a coincidência do tipo (00) como fator de similaridade (CRUZ; CARNEIRO, 2003), pois a ausência da banda pode ser por motivos diferentes como deleção, translocação, inversão ou ausência dos alelos.

A matriz gerada contém informações sobre a divergência genética entre os acessos. A matriz de similaridade pode ser utilizada para obtenção das estimativas de similaridades ou dissimilaridade genéticas.

Com a escolha do coeficiente mais adequado para a similaridade ou dissimilaridade genética, é realizada posteriormente a análise de agrupamento UPGMA (*Unweighted pair-group method averages*), considerado superior aos outros métodos utilizados (TOTTI; VENCOVSKY; BATISTA, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Folhas de indivíduos das populações de *Pyrus sp.* foram coletadas em seis municípios do Sul de Minas (Tabela 5). Cada população compreende um sítio de coleta, visto que, nas populações Lavras – Casa da Goiaba, Carrancas e Lavras - UFLA onde os acessos eram de origem comercial a coleta foi seletiva, já, nas outras populações, todos os indivíduos presentes tiveram uma amostra coletada. No município de Lavras MG, as amostras foram coletadas em mais de um local. Cada população está apresentada na Tabela 6.

Para a coleta de material vegetal foi necessária uma padronização de metodologia visto que não existia protocolo para a mesma e o material

vegetativo das pereiras oxida-se rapidamente. Assim, foi retirado um ramo com aproximadamente 20 cm de comprimento, contendo folhas recém-formadas. Este foi envolvido em folhas de papel umedecido, devidamente identificado e armazenado em caixas isotérmicas enquanto era transportado para o Laboratório de Eletroforese do Setor de Sementes - LAS da Universidade Federal de Lavras - UFLA.

Tabela 5 Procedência das populações estudadas de *Pyrus sp.*

Município	Latitude	Longitude	nº de acessos
Carrancas – MG	-21,4878	-44,6419	26
Itumirim – MG	-21,3172	-44,8706	7
Lavras – MG	-21,2450	-45,0000	34
Nepomuceno – MG	-21,2325	-45,2347	52
Perdões – MG	-21,0908	-45,0914	11
Ribeirão Vermelho – MG	-21,1906	-45,0611	17

Tabela 6 Populações de *Pyrus sp.* estabelecidas de acordo com o sítio de coleta, visando à diversidade genética.

População	Procedência	Nome comum	Nome científico
População 1	Itumirim – MG	Pereira	<i>Pyrus sp.</i>
População 2	Perdões – MG	Pereira	<i>Pyrus sp.</i>
População 3	Nepomuceno – MG	Pereira	<i>Pyrus sp.</i>
População 4	Ribeirão Vermelho – MG	Pereira	<i>Pyrus sp.</i>
População 5	Lavras - MG/Casa da Goiaba	Pereira	<i>Pyrus sp.</i>
População 6	Carrancas – MG	Pereira	<i>Pyrus sp.</i>
População 7	Lavras - MG/UFLA	Pereira	<i>Pyrus sp.</i>

3.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o método CTAB 2% (2% acetyldimethyltiethylammonium bromide) (FERREIRA; GRATAPLAGIA, 1998), no qual cerca de 1g do material vegetal jovem e sadio foi macerado em almofariz, em contato com nitrogênio líquido, em virtude da grande oxidação observada no material. Durante o processo de extração, optou-se por utilizar, juntamente com o nitrogênio líquido, uma

pequena porção de PVP (polivinilpirrolidona), em seguida, o macerado foi transferido para tubos tipo Falcon, adicionados 10 mL de tampão CTAB 2%, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH=8.0, 1% proteinase K, 0.2% β -mercaptoethanol) e incubados em banho-maria 65°C por 60 minutos, posteriormente foram adicionados 1.000 μ L de clorofórmico:álcool isoamílico (24:1) com o objetivo de separar os ácidos nucleicos (sobrenadante) das proteínas (precipitado). Os microtubos foram centrifugados por cinco minutos a 14.000 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos de dois mL, em que foi adicionado isopropanol para a precipitação dos ácidos nucleicos.

O precipitado formado, *pellet*, foi lavado num processo de duas etapas, utilizando um mL etanol a 70% e etanol a 100%, o álcool foi eliminado, o *pellet* seco ao ar por duas horas foi posteriormente suspenso em 100 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM, pH. 8,9; EDTA 1 mM).

3.3 Quantificação e diluição do DNA

Para a quantificação do DNA foi utilizado o NanoVue da marca GE Healthcare e a pureza foi calculada por meio da relação OD260/OD280. A avaliação da quantidade de DNA foi realizada, por meio de gel de agarose 0,8% e visualizado em equipamento de fotodocumentação Vilber Lourmat. Após a quantificação o DNA foi diluído para a concentração de 25ng.

3.4 Amplificação (SSR)

As reações de amplificação dos fragmentos de DNA (PCR) foram feitas em termociclador Perkin Elmer Modelo Gene Amp PCR System ® 2400, em um meio com volume final de 20 μ L, contendo: dois μ L da solução de DNA genômico (25 ng), 0,5 μ L de cada *primer* (10 pmol de *primer forward*, 10 pmol de *primer reverse*) (Tabela 7), juntamente com um *mix* composto de: 13,8 μ L de água ultrapura esterilizada; dois μ L de tampão

10X; 0,6µL de MgCl₂ (25mM), 0,4 µL de dNTP (10 mM); 0,2 µL de Taq polimerase (INVITROGEN Life Technologies 5 U/µL). Em seguida, o material foi amplificado e realizada a eletroforese a 120 V por 1 h e 45 min em gel de poliacrilamida e visualizado após a revelação. As reações foram preparadas em ambiente refrigerado, em recipiente com gelo, com ponteiras autoclavadas e pipetas separadas para esta finalidade. O intuito foi manter o material livre de qualquer tipo de contaminação.

O programa de amplificação consistiu 94°C de temperatura inicial por cinco min, cinco ciclos de amplificação a 94 °C por 30 seg; 60 °C por 30 seg. Nesta etapa foi adaptado um *Toch Down*, reduzindo-se 1,6°C a cada ciclo; 72 °C por 30 seg. Em seguida o material foi submetido a mais 35 ciclos, iniciando a 94°C por 30 seg, 52°C por 30 seg, 72°C por 30 seg. A extensão foi feita a 72°C por cinco mim. Após as reações, os produtos de amplificação do DNA foram armazenados em freezer a, aproximadamente, 4°C.

Tabela 7 Características referentes aos 21 pares de *primers* testados. F: *primer forward*; R: *primer reverse*;

Identificação do <i>primer</i>	
Operon	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')
NH001c	<i>F:AATACTAATCCTTTTTGCTAA</i> <i>R:TCCATTCAATCTGTCTCGGTC</i>
NH002b	<i>F:GGAGTCAGCGGCAAAAAAAG</i> <i>R:CCCCTCCCTCCTCTTATTGT</i>
NH005b	<i>F:TGAGAAGAATTAGCCATGATGA</i> <i>R:TTACTACTTGCGTGCGTTCC</i>
NH007b	<i>F:TACCTTGATGGGAACTGAAC</i> <i>R:AATAGTAGATTGCAATTACTC</i>
NH008b	<i>F:GGAAAGAGAAGGAAGAAGAGAAGG</i> <i>R:TGATAGGGGCATTTCGGTAA</i>

Tabela 7, continua.

NH009b	<i>F:CCGAGCACTACCATTGA</i> <i>R:CGTCTGTTTACCGCTTCT</i>
NH011b	<i>F:GGTTCACATAGAGAGAGAGAG</i> <i>R:TTTGCCGTTGGACCGAGC</i>
NH013b	<i>F:GGTTTGAAGAGGAATGAGGAG</i> <i>R:CATTGACTTTAGGGCACATTC</i>
NH012a	<i>F:CCGCCAGTACCCATCTCCA</i> <i>R:ACCACTCAAACCCCCCTC</i>
NH014a	<i>F:CAAACCTAACCCATAAATACC</i> <i>R:TGTTCATATATTCATCACTC</i>
NH015a	<i>F:TTGTGCCCTTTTTCTACC</i> <i>R:CTTTGATGTTACCCCTTGCTG</i>
NH017a	<i>F:CAGAAAGGAGAGGGCTACAG</i> <i>R:CCCTCACCCAATCAAAACTC</i>
KA4b	<i>F:AAAGGTCTCTCTCACTGTCT</i> <i>R:CCTCAGCCCAACTCAAAGCC</i>
KA5	<i>F:CAACAACAACAAAAACAGTAA</i> <i>R:AGCCTTAGAAATAGAAACAACA</i>
KA14	<i>F:TCATTGTAGCATTTTTATTTTT</i> <i>R:ATGGCAAGGGAGATTATTAG</i>
KA16	<i>F:GCCAGCGAACTCAAATCT</i> <i>R:AACGAGAACGACGAGCG</i>
KB16	<i>F:AAAGAACAGCAAGAACCA</i> <i>R:GATTTTGTCCGCAGGT</i>
KU10	<i>F:AGAGTCGGTTGGGAAATGATTG</i> <i>R:AGTATGTGACCACCCCGATGTT</i>
BGA35	<i>F:GCTTCATCACCGTCTGCT</i> <i>R:AGAGGGAGAAAGGCGATT</i>
BGT23b	<i>F:CACATTCAAAGATTAAGAT</i> <i>R:ACTCAGCCTTTTTTCCCAC</i>
HGA8b	<i>F:CATAGAGAAAGCAAAGCAAA</i> <i>R:AACAAGCAAAGGCAGAACAA</i>

Fonte: Gianfranceschi, Seglias e Tarchini (1998) e Yamamoto et al. (2002)

3.5 Eletroforese e visualização dos géis

Em cada microtubo contendo 20 µL de DNA amplificado foram adicionados cinco µL de corante *stop solution*. Desta mistura, 10 µL foram aplicados nas canaletas do gel de poliacrilamida 1,5% e submetidos à eletroforese em tampão TBE 1X a 120V por uma hora e quarenta e cinco minutos. Para efeito de comparação do tamanho dos fragmentos, foi utilizado como padrão o DNA Ladder 100 bp.

Após a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi submetido à coloração com prata e visualizado no transiluminador da marca Hoefer MacroVue modelo Vis-45.

3.6 - Análises estatísticas

Os produtos da amplificação, visualizados no gel, produzidos por cada *primer*, foram utilizados na elaboração de uma matriz de similaridade genética, por meio do registro da presença (1) e da ausência (0) de bandas no perfil eletroforético de cada genótipo. Os dados foram empregados para estimar todas as análises subsequentes.

3.6.1 - Diversidade genética

As matrizes binárias foram usadas para a obtenção das estimativas de similaridades genéticas (S_{gij}), com auxílio do programa XLSTAT (Addinsoft®, versão 2011.2.04), empregando-se o coeficiente de Jaccard, para os genótipos conforme abaixo:

$$S_{gij} = \frac{a}{a + b + c}$$

A similaridade genética entre as populações foi calculada pelo índice de identidade de Nei (INL), como segue:

$$INL = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Em que:

- a = presença de bandas em ambos os genótipos;
- b = presença de banda no primeiro genótipo e ausência no segundo;
- c = presença no segundo e ausência no primeiro;
- d = a ausência em ambos os genótipos.

Com base na matriz de similaridade genética Jaccard, foi realizado o agrupamento dos genótipos, utilizando o método de médias não ponderadas das similaridades (UPGMA), por meio do programa XLSTAT (Addinsoft®, versão 2011.2.04), assim como para o agrupamento das populações pelo mesmo método a partir da matriz de identidade de Nei com o programa Genalex v. 6.3 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). O agrupamento das amostras, considerando o método de análise de coordenadas principais, foi realizado com auxílio do software XLSTAT (Addinsoft®, 17 versão 2011.2.04), utilizando os mesmos parâmetros para os indivíduos e para as populações utilizados para os agrupamentos UPGMA.

Com a matriz binária, também, calculou-se a porcentagem de polimorfismo obtida com cada *primer* como proposto abaixo:

$$P = \frac{nbp}{nbt} \times 100$$

P = porcentagem de polimorfismo (ou taxa de polimorfismo);

nbp = número de bandas polimórficas;

nbt = número de bandas total.

3.6.2 Variabilidade genética

Para a análise genética intrapopulacional, empregou-se o programa Genalex v. 6.3 (PEAKALL; SMOUSE, 2006) em que, para dados dominantes, assume-se que as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) que supõe que a frequência genotípica para o homocigoto AA será p^2 , para o heterocigoto Aa será $2pq$ e os outros homocigotos aa será de q^2 .

Inicialmente são obtidas estimativas das frequências dos alelos A e a, denominadas de p e q, respectivamente, mas é possível estimar essa frequência, onde presença de fragmento representa ambos os genótipos AA ou Aa, alelo “A” tem frequência calculada por $p=1-q$, alelo “a” tem frequência calculada por $q=\frac{\sum n_{aa}}{N}$, e frequência de genótipos aa= q^2 , onde N é o número total de indivíduos e n_{aa} a população (CRUZ, 2006).

A heterozigosidade esperada (H_e), também chamada de diversidade genética, foi calculada para cada loco segundo Nei (1987).

$$H_e = 1 - \sum p^2$$

Sendo p a frequência de cada um dos alelos

Outro tipo de análise em genética de populações é a utilização do índice de Shannon (LEWONTIN, 1972), comumente utilizado em estudos ecológicos para indicar a variabilidade da espécie por área, o qual se baseia na frequência ou ausência de fragmentos.

$$I = \sum p_i \ln p_i$$

Sendo p a frequência da presença ou da ausência de fragmentos.

Foram calculados alguns parâmetros de frequência de fragmentos nas populações: número total de fragmentos; número de fragmentos com

frequência maior que 5%; número de fragmentos comuns (frequência superior a 5%), ocorrentes em 25% ou menos nas populações; número de alelos comuns (frequência maior que 5%), ocorrentes em 50% ou menos nas populações; número de fragmentos que pertencem a somente aquela determinada população.

O procedimento empregado foi a análise de variância molecular (AMOVA) (Tabela8), sendo efetuada para as sete populações de *Pyrus communis* L., baseada nas matrizes de dissimilaridade e processada no *software* Genalex v. 6.3 (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

A variância genética total σ_t^2 corresponde a $\sigma_a^2 + \sigma_p^2$, sendo os componentes de variância testados a partir do coeficiente Φ_{st} , conforme descrito por Excoffier, Smouse e Quattro (1992):

$$\Phi_{st} = \frac{\sigma_p^2}{\sigma_t^2}$$

em que :

Φ_{st} : Representa o valor dos genótipos tomados ao acaso dentro das procedências em relação aos genótipos tomados em toda a amostra;

σ_p^2 : Componente de variância, em razão das diferenças entre procedências;

σ_a^2 : Componente de variância, em função das diferenças entre genótipos dentro de procedências.

Tabela 8 Esquema da análise de variância molecular (AMOVA) para sete populações de *Pyrus communis* L., com as respectivas esperanças dos quadrados médios.

Fontes de variação	Graus de liberdade	E (QM)
Entre populações	P-1	$\sigma_a^2 + n \sigma_p^2$
Dentro de populações	N-P	σ_a^2
Total	N-1	σ_t^2

P: número de populações; N: número total de indivíduos; n: valor ponderado, em função do número diferente de acessos para cada procedência; σ_p^2 : variância entre populações; σ_a^2 : variância dentro de populações; σ_t^2 : variância total. Fonte: Adaptado de Schneider, Roessli e Excoffier (2000).

A partir do cálculo de PhiPT foi testada a hipótese: H0= Não há diferença entre as populações (PhiPT=0): H1= Há diferença genética entre as populações (PhiPT>0). O PhiPT será calculado como segue:

$$\Phi_{PT} = \frac{V_{IP}}{(V_{IP} + V_{DP})} = \frac{V_{IP}}{V_T}$$

Onde: V_{IP} é a variação estimada entre populações; V_{DP} é a variação estimada dentro da população; V_T é a variação estimada total.

3.6.3 Identificação do número ótimo dos marcadores

Para verificar se o número de fragmentos foi suficiente para analisar o grupo amostral de 147 genótipos, foram realizados *Bootstraps* a partir de simulações com reamostragens de diferentes tamanhos, sendo cada uma repetida 5.000 vezes por aplicação do *software* DBOOT (COELHO, 2000), obtendo-se assim, as estimativas de correlação entre os valores da matriz de similaridade de Jaccard e as matrizes geradas pelas reamostragens e o valor do coeficiente de variação (CV%), que indica o ajuste entre a matriz original e a matriz amostral (PINHEIRO, 2011). O número ideal de bandas foi considerado quando o coeficiente de variação assumiu valor inferior a 0,10.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Nível de polimorfismo

Os 21 pares de *primers* selecionados para a análise de diversidade genética nos 147 acessos de pera estão listados na Tabela 7. Um exemplo de polimorfismo, detectado por esses *primers*, pode ser visto na Figura 2, em

que se encontram as bandas polimórficas geradas pelos acessos seis e sete da população um, acessos de um a 11 da população dois e acessos de um e dois da população três (Anexo Tabela 1A), pelo *primer* KA16.

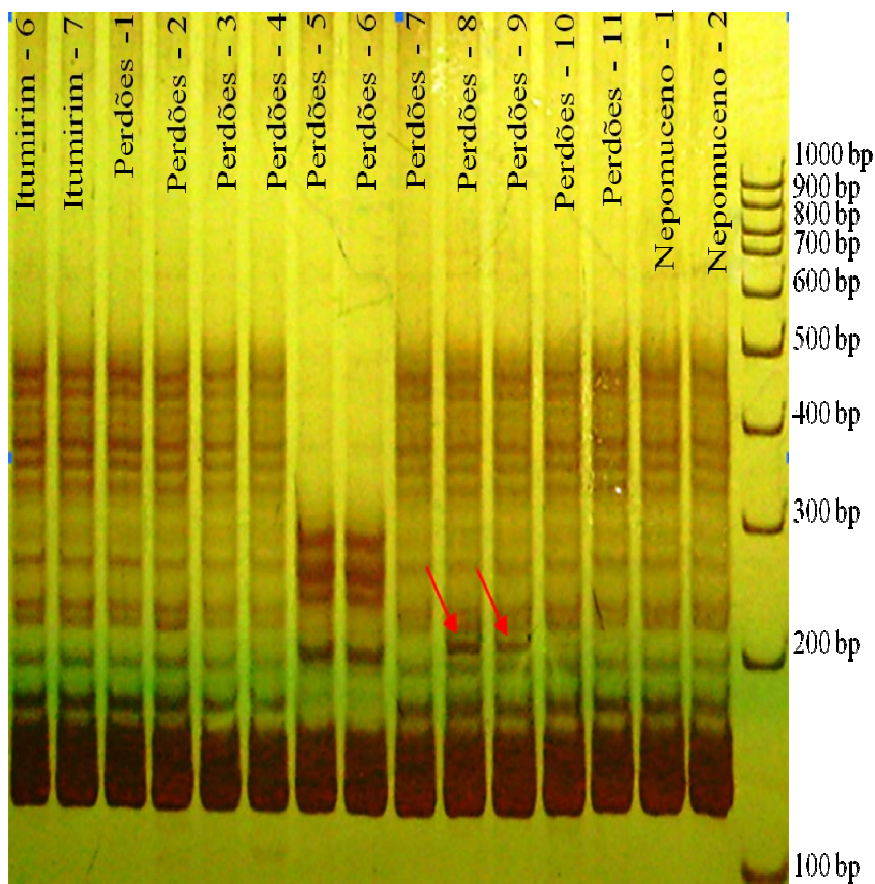


Figura 2 Gel de poliacrilamida contendo exemplo de polimorfismo detectado pelo *primer* KA16 nos acessos seis e sete da população de Itumirim, nos acessos de um a 11 da população de Perdões e nos acessos de um e dois da população de Nepomuceno.

As reações efetuadas com estes 21 *primers* proporcionaram 189 produtos de amplificação, os quais forneceram uma média de nove bandas por par de *primer*. O maior número de alelos foi registrado no loco NH009b

que amplificou 16 alelos, seguidos pelo loco KA16 que amplificou 15 alelos, enquanto o menor número ocorreu nos locos NH014a com apenas quatro alelos, seguidos pelos *primer* NH002b e KA4b com cinco alelos e os *primer* NH007b, KB16 e KA5 com sete alelos (Tabela9).

No total foram encontrados 189 fragmentos, sendo 177 (93,7%) polimórficos, os quais forneceram uma média de 8,4 fragmentos polimórficos por *primer*. O maior número de fragmento polimórficos, dezesseis, foi registrado no *primer* NH09b, enquanto o menor número ocorreu no *primer* NH014a, um total de quatro fragmentos polimórficos.

Conforme publicado na literatura (SANTOS et al., 2011; YAKOVIN et al., 2011; YAMAMOTO et al., 2002), o número de *primers* empregados para a caracterização molecular em *Pyrus communis* L. assim como o número de fragmentos totais é variado.

Santos et al. (2011), na caracterização molecular de acessos de *Pyrus* spp. provenientes da Espanha, utilizaram 20 *primers* SSR, diferentes dos utilizados neste trabalho, para analisar a diversidade molecular de 221 acessos e 21 cultivares comerciais de pera. Obtiveram, assim, uma média de 16,55 bandas por *primer*, valor superior à observada no presente trabalho.

Yakovin et al. (2011) obtiveram uma variação de alelos por loco de 10 a 16, o *primer* KU10 apresentou 10 fragmentos, igual ao observado neste trabalho.

Tabela 9 *Primers* SSR, número de fragmentos totais e de fragmentos polimórficos obtidos.

<i>Primers</i>	Número de fragmentos	Número de fragmentos polimórficos	% de Polimorfismo
NH01c	9	6	66,67%
NH02b	5	5	100%
NH05b	10	9	90%
NH07b	7	7	100%
NH08b	10	10	100%
NH09b	16	16	100%
NH011b	8	8	100%
NH012a	12	12	100%
NH013a	11	11	100%
NH014a	4	4	100%
NH015a	8	8	100%
NH017a	10	10	100%
KU10	10	8	80%
KA5	7	7	100%
KA14	8	7	87,5%
KA14b	5	5	100%
KA16	15	14	93,33%
KB16	7	7	100%
BGT23	9	7	77,78%
BGA35	9	7	77,78%
HGA8b	9	9	100%
TOTAL	189	177	93,65%

Pelos valores publicados, conforme observado em diversos resultados das pesquisas mencionadas, o número de *primers* e fragmentos totais, utilizados no presente trabalho, aproximam-se dos utilizados em diversas literaturas.

4.2 Identificação do número ótimo de marcadores

As análises de reamostragem (*bootstraps*) realizadas empregando-se 189 fragmentos para os 147 genótipos são apresentados na Figura 3.

De acordo com os dados apresentados, houve uma relação direta entre o número de fragmentos e a magnitude de correlação dos valores de matriz de similaridade de Jaccard.

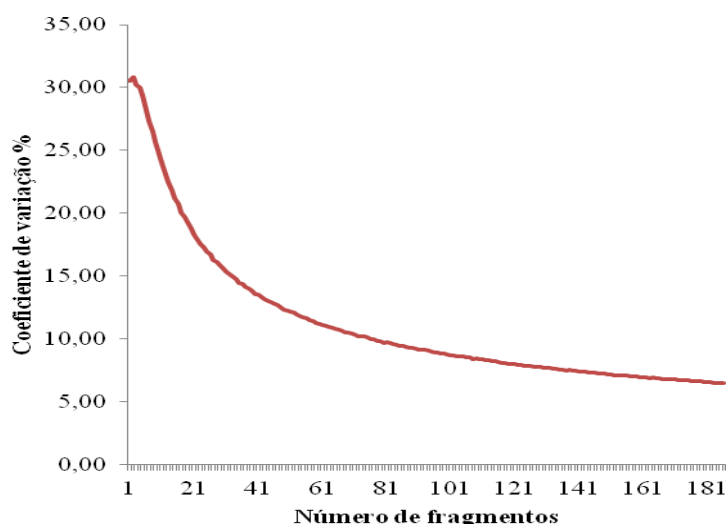


Figura 3 Determinação do número ideal de fragmentos.

Como esperado, a magnitude do coeficiente de variação diminuiu conforme o aumento do número de bandas avaliadas.

Vários estudos têm mostrado que a precisão das distância genética é reforçada por meio de um CV médio de 10% (HALLDÉN et al., 1994; SANTOS et al., 1994; THORMANN et al., 1994; TIVANG; NIENHUIS; SMITH, 1994). A precisão experimental, medida por meio do CV (6,46%), indica um alto nível de precisão dos marcadores microssatélites nesse estudo, pois é menor que 10%.

A partir de 80 fragmentos o coeficiente de variação apresenta valores menores que 10%, sugerindo que 80 bandas são o suficiente para estimativas confiáveis de similaridade genética

4.3 Diversidade genética entre os acessos

Os coeficientes de dissimilaridade de Jaccard (SSR) para todos os 147 genótipos variaram de 0,032 entre os acessos 9, 15, 16, 17 e 18 da população de Nepomuceno a 0,69 entre os acessos um da população Lavras –UFLA e 29 da população de Nepomuceno (Figura 4). O dendrograma foi gerado pelo método UPGMA. Um corte feito a 0,3313 (média) separou os genótipos em três grupos, o primeiro grupo é formado pelos indivíduos quatro e 23 da população de Itumirim (1.4 e 1.23), indivíduo 10 da população de Nepomuceno (3.10), indivíduos 4, 10, 16 e 17 da população de Ribeirão Vermelho (4.4; 4.10; 4.16 e 4.17), indivíduos um, dois, três, quatro, cinco e seis da população Lavras – Casa da Goiaba (5.1; 5.2; 5.3; 5.4; 5.5 e 5.6), indivíduos 10, 11, 12, 13, 23, 24 da população de Carrancas (6.10; 6.11; 6.12; 6.13; 6.23 e 6.24), indivíduos 1, 7, 10, 13, 21 e 24 da população Lavras - UFLA (7.1; 7.7; 7.10; 7.13; 7.21 e 7.24); e; o segundo grupo é formado pelos indivíduos 23 da população Lavras – UFLA e 22 da população Carrancas e o terceiro e último grupo é formado pelos demais indivíduos (Anexo).

A distribuição dos genótipos nos grupos mostrou a separação dos diferentes acessos, assim como uma baixa divergência genética entre eles. O primeiro grupo é composto na sua maioria pela população Lavras - Casa da Goiaba, Carrancas e Lavras - UFLA, que são as únicas populações que possuem cultivares comerciais, além dos materiais crioulos da região. O terceiro grupo foi o maior, contendo a maioria dos genótipos estudados, provavelmente esse grupo é formado por materiais geneticamente semelhantes.

O dendrograma gerado pela matriz de similaridade de Jaccard entre os 147 genótipos pode ser visualizado na Figura 4

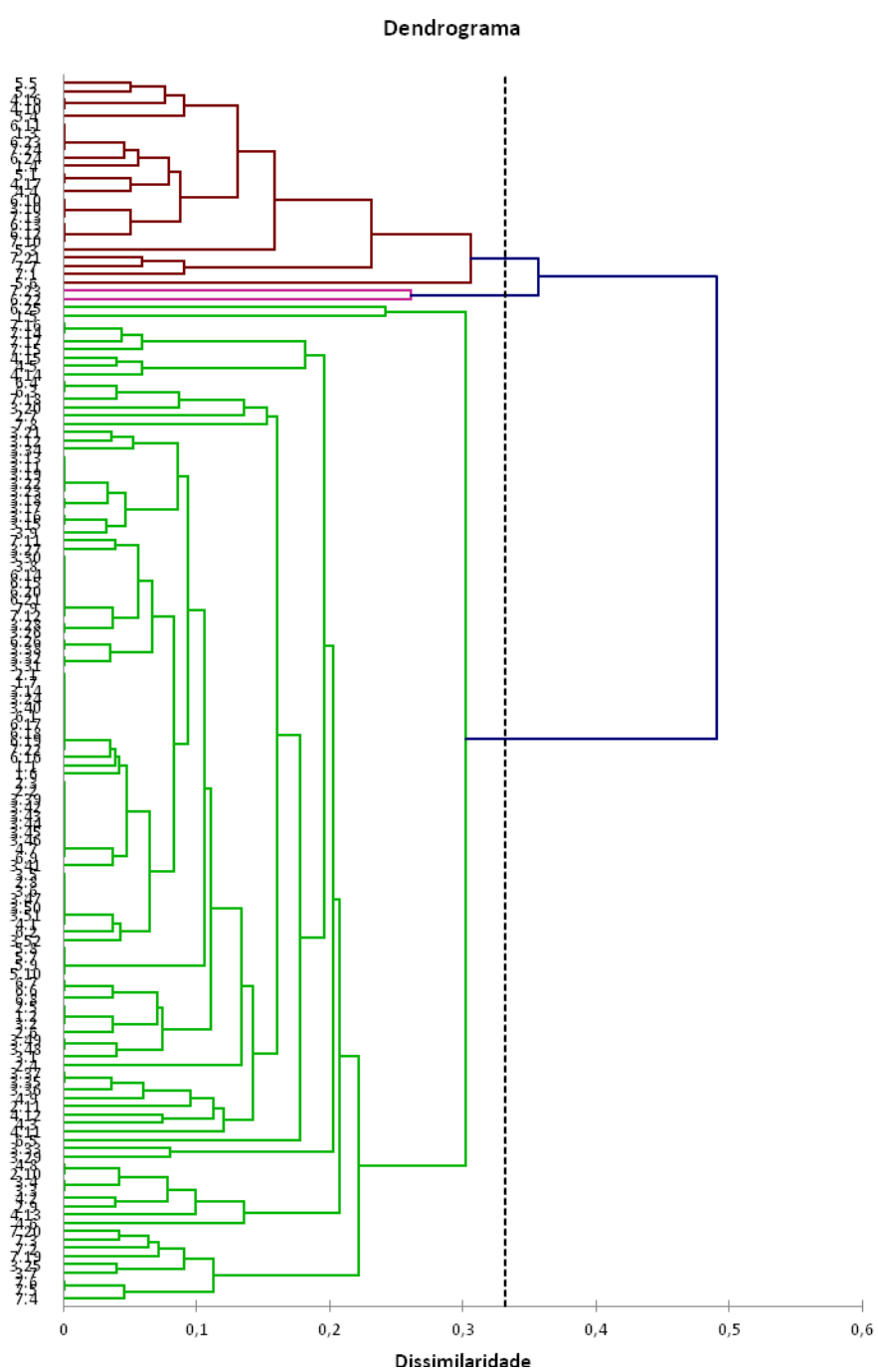


Figura 4 Dendrograma gerado pelo método UPGMA por meio da matriz de dissimilaridade de Jaccard, por *primers* SSR, entre acessos de *Pyrus communis* L..

4.4 Diversidade genética entre as populações

O dendrograma gerado pelos marcadores SSR separa as populações em quatro grupos. O primeiro contendo as populações de Itumirim, Perdões e Ribeirão Vermelho; o segundo contendo apenas a população Lavras – Casa da Goiaba; o terceiro contendo as populações de Nepomuceno e Carrancas e o quarto e último contendo a população Lavras - UFLA (Figura 5).

As populações de Perdões e Lavras - UFLA foram as que apresentaram maior distância genética em relação às demais populações e agruparam-se separadamente com dissimilaridade de 0,17. Já as populações Perdões e Ribeirão Vermelho, apresentaram a menor dissimilaridade genética, em torno de 0,06.

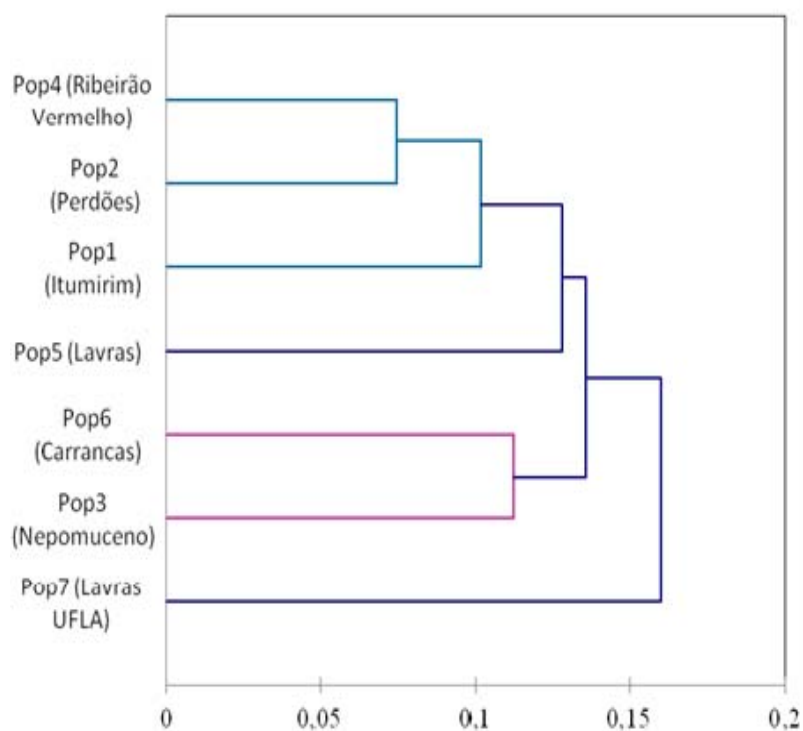


Figura 5 Dendrograma UPGMA das populações de *Pyrus communis* L..

A dissimilaridade genética entre as populações da região é considerada baixa o que leva a concluir que os acessos podem apresentar origem comum.

A distribuição espacial bidimensional das populações explicam 53,6% da variação total, como pode ser visto na Figura 6.

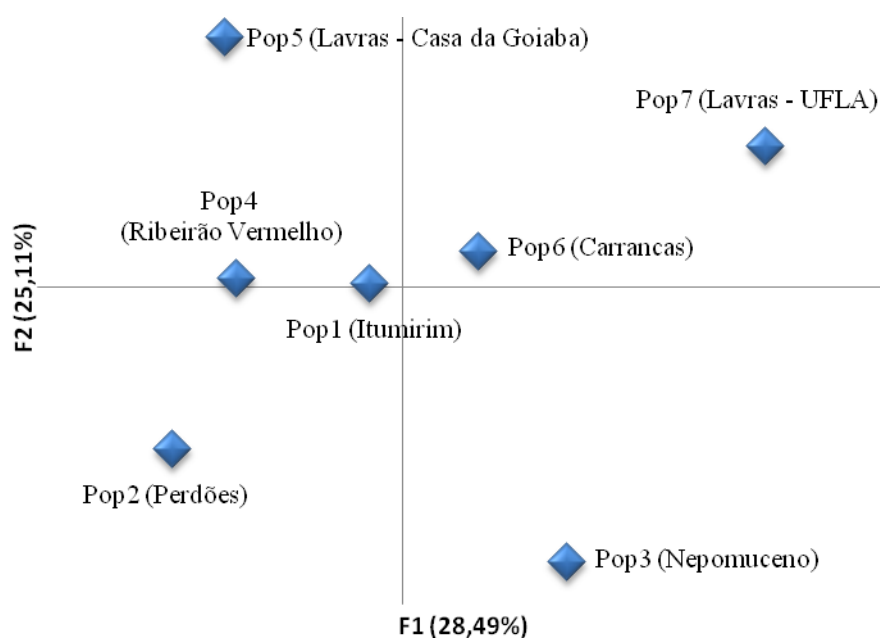


Figura 6 Distribuição espacial da análise de coordenadas principais por marcadores SSR

4.5 Variabilidade genética inter e intrapopulacional

O número de bandas totais gerados pelos *primers* SSR variou de 166 para as populações Perdões, Ribeirão Vermelho e Lavras – Casa da Goiaba a 183 para a população Lavras – UFLA (Tabela 10). Apenas as populações Nepomuceno, Carrancas e Lavras – UFLA apresentaram locos com

frequência menor que 5%. As populações Nepomuceno e Lavras - UFLA foram as únicas a apresentarem apenas um loco exclusivo.

Em trabalhos envolvendo correlação genética entre indivíduos e populações, como o de Bao et al. (2007) e Yamamoto et al. (2002), foram observados coeficientes de correlação genética que mostram que as populações em questão exibem uma grande correspondência genética.

Yamamoto et al. (2002), também, encontraram uma diversidade significativa entre e dentro de espécies de *Pyrus sp.*, utilizando-se de marcadores SSR.

Tabela 10 Padrão de fragmentos gerados pelos *primers* SSR nas populações de *Pyrus communis* L..

População	Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5	Pop6	Pop7
Nº de fragmentos	170	166	183	166	166	183	184
Nº de fragmentos Freq. $\geq 5\%$	170	166	174	166	166	176	183
Nº de fragmentos exclusivos	0	0	1	0	0	0	1
Nº de fragmentos comuns a $\leq 25\%$	0	0	0	0	0	0	0
Nº de fragmentos comuns a $\leq 50\%$	1	2	8	1	4	10	10

A porcentagem de locos polimórficos (%P) (Tabela 11) para cada uma das populações foi bastante similar nas populações Itumirim (pop um) (54,50%), Perdões (pop dois) (51,32%), Ribeirão Vermelho (pop quatro) (58,20%) e Lavras – Casa da Goiaba (pop cinco) (55,03%); já as populações Nepomuceno (pop três) (78,31%), Carrancas (pop seis) (74,60%) e Lavras – UFLA (pop sete) (86,24%) apresentaram um maior polimorfismo o que significa que essas são mais divergentes dentro delas quando comparadas com as demais populações.

Os valores do Índice de Shannon (I) e de heterozigose esperada (He) mostraram-se muito similares (Tabela 11), fato que não foi observado em outros trabalhos. Santos et al. (2011) encontraram um He entre 0,30 e 0,95

para 21 cultivares de pera europeia, resultado de uma alta diversidade genética.

Tabela 11 Análise genética das populações pelos *primers* SSR; I: índice de Shannon, He: Heterozigose esperada, %P: percentagem de locos polimórficos. O desvio padrão é apresentado entre parênteses.

Populações	I	He	%P
Pop1	0,313(0,022)	0,214(0,015)	54,50%
Pop2	0,305(0,023)	0,211(0,016)	51,32%
Pop3	0,401(0,019)	0,268(0,014)	78,31%
Pop4	0,330(0,022)	0,225(0,015)	58,20%
Pop5	0,300(0,021)	0,202(0,015)	55,03%
Pop6	0,408(0,020)	0,277(0,015)	74,60%
Pop7	0,477(0,017)	0,323(0,012)	86,24%
TOTAL	0,362(0,008)	0,246(0,006)	65,46%

Observa-se que a população sete, proveniente de Lavras UFLA, apresenta o maior número de fragmentos em heterozigose (Tabela 11), com isso a maior divergência genética. Isto se deve à diferente origem dos materiais, considerando tanto materiais cultivados quanto germoplasma rústico.

A frequência de heterozigotos representa a existência de variabilidade, pois cada indivíduo diploide pode ter até dois alelos por loco (WEIR, 1996). Os valores de Diversidade Genética (*He*) variaram entre 0.20 e 0.32 (Tabela 11), o que representa um alto número de locos em homozigose.

A porcentagem de locos polimórficos, o índice de Shannon e a heterozigose esperada tem sido utilizada como medida de diversidade genética em diversos trabalhos.

4.6 Análise de variância molecular (AMOVA)

A análise de variância molecular revelou diferença significativa entre populações para a distribuição da variabilidade genética (0,182,

$P \leq 0,001$), contendo 18% da variação global. Assim grande parte da proporção ficou retida dentro das populações, correspondendo a 82% da variação total (Tabela 12). Isso se deve ao fato da espécie *Pyrus communis* L. ser predominantemente alógama, favorecendo a troca de alelos dentro da própria população e assim predominando uma alta variação dentro da população.

Tabela 12 Análise de variância molecular (AMOVA) das populações de *Pyrus communis* L..

Fonte de variação	GL	QM	Var. Est.	% Var
Entre Populações	6	165,330	6,926	18
Dentro da População	140	31,104	31,104	82
TOTAL	146		38,030	100

Valor PhiPT = 0,182 P (rand \geq dado)

Legenda: GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; Var. Est.: variação estimada; %Var: percentagem de variação.

As populações de pera no Sul de Minas Gerais foram, na sua maioria, introduzidas pelos agricultores da região, os materiais estudados podem ser de origem similar o que explica a baixa dissimilaridade entre as populações. Outro fator que pode justificar os resultados encontrados neste trabalho é a propagação por estaquia dos indivíduos de pera.

CONCLUSÕES

- 1 Há variabilidade genética entre os acessos de pera analisados.
- 2 As populações de *Pyrus communis* L. apresentam maior divergência genética intrapopulacional.
- 3 A espécie *Pyrus communis* L. apresenta baixo nível de diversidade genética dentro das populações analisadas.

REFERÊNCIAS

- ANUÁRIO brasileiro de fruticultura. Santa Cruz do Sul: Gazeta, 2010. 129 p.
- BAO, L. et al. Genetic diversity and similarity of pear (*Pyrus* L.) cultivars native to East Asia revealed by SSR (simple sequence repeat) markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 54, n. 5, p. 959-971, 2007.
- BARBOSA, W. et al. **Formação rápida de mudas vigorosas de pêra através de porta-enxerto oriental**. Campinas: O Agrônomo, 1995. 12 p.
- _____. **Melhoramento do pessegueiro para regiões de clima subtropical-temperado**: realizações do Instituto Agrônomo no período de 1950-1990. Campinas: O Agrônomo, 1997. 22 p. (Documentos IAC, 52).
- BELL, R. L. et al. Pears. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Fruit breeding, tree and tropical fruits**. New York: J. Wiley, 1996. v. 1, p. 441-514.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 374 p.
- BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. **Cadeia produtiva de frutas**. Brasília: IICA/MAPA/SPA, 2007. 102 p.
- CABONI, E.; LAURI, P.; ANGELI, S. d'. In vitro plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 8, p. 755-760, Aug. 2000.
- CAMPO DALL'ORTO, F. A. et al. Frutas de clima temperado: II., pêra, figo, maçã, marmelo e pêssego em pomar compacto. In: INSTITUTO AGRÔNOMICO DE CAMPINAS. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas, 1996. p. 139-140. (Boletim, 100).
- CHARLESWORTH, B.; SIIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, London, v. 371, n. 6494, p. 215-220, Sept. 1994.
- COELHO, A. S. G. **Dboot**: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com variável de marcadores. Versão 1.1. Goiânia: UFG, 2000. Software.

CONDIT, R.; HUBBELL, S. P. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**, Ottawa, v. 34, n. 1, p. 66-71, Apr. 1991.

CRUZ, C. D. **Programa genes estatística experimental e matrizes**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 285 p.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 2003. v. 2, 585 p.

DREW, R. A. The application of biotechnology to the conservation and improvement of tropical and subtropical fruit species. **Caryologia**, Firenze, v. 1, n. 21, p. 77-80, 1997.

DUARTE, J. M.; SANTOS, J. B. dos; MELO, L. C. Comparison of similarity coefficients base on RAPD markers in the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 3, p. 427-432, 1999.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **A cultura da pera**. Brasília, 2007. 58 p.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v. 131, n. 2, p. 479-491, June 1992.

FACHINELLO, J. C. et al. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 109-120, out. 2011. Edição especial.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Production crops**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 6 jun. 2012.

FREITAS, B. M. A polinização do cajueiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 11., 1996, Teresina. **Anais...** Teresina: Confederação Brasileira de Apicultura, 1996. p. 143-156.

GIANFRANCESCHI, L.; SEGLIAS, N.; TARCHINI, R. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, n. 8, p. 1069-1076, Oct. 1998.

GOWER, J. C. Measures of similarity, dissimilarity and distance. In: KOTZ, S.; JOHNSON, N. L. (Ed.). **Encyclopedia of statistical sciences**. 5th ed. New York: J. Wiley, 1985. p. 397-404.

HALLDÉN, C. et al. Evaluation of RFLP and RAPD markers in comparison of *Brassica napus* breeding lines. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 88, n. 1, p. 123-128, Jan. 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Frutas e derivados**. São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://ibraf.org.br/>>. Acesso em: 19 jun. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 21 maio 2012.

LAYNE, R. E. C.; QUAMME, H. A. Pears. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University, 1975. p. 38-40.

LEITE, D. L.; SOUZA, C. M. de. Polinização. In: NAKASU, B. H et al. (Ed.). **Pêra: produção**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2003. p. 23-28. (Frutas do Brasil, 46).

LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, New York, v. 6, p. 381-398, 1972.

MITCHAM, E. J.; ELKINS, R. B. **Pear production and handling manual**. Davis: University of California, 2007. 25 p.

MITCHAM, E. J.; MITCHELL, F. G. Conditioning and ripening of Bartlett pears. In: MITCHAM, E. J.; ELKINS, R. B. (Ed.). **Pear production of handling manual**. Davis: University of California, 2007. chap. 26.

MOURGUES, F.; CHEVREAU, E.; LAMBERT, C. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, n. 3/4, p. 245-249, Dec. 1996.

MOURGUES, F. et al. Efficient *Agrobacterium*: mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, n. 3/4, p. 245-249, Dec. 1996.

MULLIS, K.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. **Methods in Enzimology**, New York, v. 55, p. 335-350, 1987.

NAKASU, B. H.; FAORO, I. D. Cultivares. In: CENTELLAS-QUEZADA, A.; NAKASU, B. H.; HERTER, F. G. (Ed.). **Pêra: produção**. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado; Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2003. p. 20-31. (Frutas do Brasil, 46).

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University, 1987. 512 p.

PEAKALL, R. O. D.; SMOUSE, P. E. Genalex 6: genetic analysis in excel: population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006.

PEREIRA, F. M. Rica e Paluma: novas cultivares de goiabeira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7., 1984, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBF, 1984. p. 524-528.

PESSON, H. **Estimating genetic variability in horticultural crop species at different stages of domestication**. 2011. 30 p. Thesis (Ph.D. in Plant Genetics and Breeding) - Universitatis Agriculturae Sueciae, Tokyo, 2011.

PINHEIRO, L. R. **Diversidade genética e desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya labiata* Lindl.** 2011. 56 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2011.

QUEZADA, A. C.; NAKASU, B. H. Classificação botânica, origem e evolução. In: NAKASU, B. H.; CENTELLAS-QUEZADA, A.; HERTER, F. G. (Ed.). **Pêra: produção**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2003. p. 20-22. (Frutas do Brasil, 46).

QUEZADA, A. C.; NAKASU, B. H.; HERTER, F. G. (Ed.). **Pêra: produção**. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado, 2003. 45 p. (Frutas do Brasil, 46).

SANTOS, A. R. F. et al. Genetic variability and diversification process in local pear cultivars from northwestern Spain using microsatellites. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 7, p. 1041-1056, May 2011.

SANTOS, J. B. dos et al. Comparison of RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 87, n. 8, p. 909-915, Mar. 1994.

SANTOS, M. S. et al. Caracterização do suco de araçá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) extraído mecanicamente e tratado enzimaticamente. **Acta Scientiarum Agronomic**, Maringá, v. 29, n. 5, p. 617-621, 2007.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin**: a software for population genetic data analysis. Version 200. Geneva: University of Geneva, 2000. Software.

SUGANUMA, E.; CIAMPI, A. Y. **Análise genética populacional de jatobá (*Hymenaea ssp* - Leguminosaea) utilizando microssatélites.**

Disponível em:

<http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/03/03pdf/03-007.pdf>. Acesso em: 20 out. 2011.

SUNIL, K. L. DNA markers in plant improvement: an overview. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, n. 14, p. 143-182, 1999.

THOMÉ, O. T. **Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz**: in Wort und Bild für Schule und Haus. Disponível em:

<http://caliban.mpizkoeln.mpg.de/~stueber/thome/Alphabetical_list.html>. Acesso em: 15 jan. 2012.

THORMANN, C. E. et al. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 88, n. 8, p. 973-980, Sept. 1994.

TIVANG, J. G.; NIENHUIS, J.; SMITH, O. S. Estimation of sampling variance of molecular marker data using the bootstrap procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, n. 2/3, p. 259-264, Oct. 1994.

TOTTI, R.; VENCOVSKY, R.; BATISTA, L. A. R. Utilização de métodos de agrupamento hierárquico em acessos de *Paspalum* (*Graminea Poaceae*). **Revista de Ciências Exatas e Tecnologia**, Valinhos, v. 22, n. 1, p. 25-35, 2001.

WEIR, B. S. **Genetics data analysis II**: methods for discrete population genetic data. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 455 p.

WÜNSCH, A.; HORMAZA, J. I. Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 113, n. 16, p. 37-43, 2007.

XAVIER, G. R. et al. Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 4, p. 353-359, abr. 2005.

YAKOVIN, N. A. et al. Polymorphism of microsatellite Loci in Cultivars and Species of Pear (*Pyrus* L.). **Russian Journal of Genetics**, Moscow, v. 47, n. 5, p. 564-570, Sept. 2011.

YAMAMOTO, T. et al. Development of microsatellite markers in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 14-16, 2002.

ANEXOS

TABELA 1A Identificação dos acessos de pera utilizados neste estudo

População	Indivíduo	Código
1 – Itumirim	1	1.1
1 – Itumirim	2	1.2
1 – Itumirim	3	1.3
1 – Itumirim	4	1.4
1 – Itumirim	5	1.5
1 – Itumirim	6	1.6
1 – Itumirim	7	1.7
2 – Perdões	1	2.1
2 – Perdões	2	2.2
2 – Perdões	3	2.3
2 – Perdões	4	2.4
2 – Perdões	5	2.5
2 – Perdões	6	2.6
2 – Perdões	7	2.7
2 – Perdões	8	2.8
2 – Perdões	9	2.9
2 – Perdões	10	2.10
2 – Perdões	11	2.11
3 – Nepomuceno	1	3.1
3 – Nepomuceno	2	3.2
3 – Nepomuceno	3	3.3
3 – Nepomuceno	4	3.4
3 – Nepomuceno	5	3.5
3 – Nepomuceno	6	3.6
3 – Nepomuceno	7	3.7
3 – Nepomuceno	8	3.8
3 – Nepomuceno	9	3.9
3 – Nepomuceno	10	3.10
3 – Nepomuceno	11	3.11
3 – Nepomuceno	12	3;12
3 – Nepomuceno	13	3.13
3 – Nepomuceno	14	3.14
3 – Nepomuceno	15	3.15
3 – Nepomuceno	16	3.16
3 – Nepomuceno	17	3.17
3 – Nepomuceno	18	3.18

3 – Nepomuceno	19	3.19
3 – Nepomuceno	20	3.20
3 – Nepomuceno	21	3.21
3 – Nepomuceno	22	3.22
3 – Nepomuceno	23	3.23
3 – Nepomuceno	24	3.24
3 – Nepomuceno	25	3.25
3 – Nepomuceno	26	3.26
3 – Nepomuceno	27	3.27
3 – Nepomuceno	28	3.28
3 – Nepomuceno	29	3.29
3 – Nepomuceno	30	3.30
3 – Nepomuceno	31	3.31
3 – Nepomuceno	32	3.32
3 – Nepomuceno	33	3.33
3 – Nepomuceno	34	3.34
3 – Nepomuceno	35	3.35
3 – Nepomuceno	36	3.36
3 – Nepomuceno	37	3.37
3 – Nepomuceno	38	3.38
3 – Nepomuceno	39	3.39
3 – Nepomuceno	40	3.40
3 – Nepomuceno	41	3.41
3 – Nepomuceno	42	3.42
3 – Nepomuceno	43	3.43
3 – Nepomuceno	44	4.44
3 – Nepomuceno	45	3.45
3 – Nepomuceno	46	3.46
3 – Nepomuceno	47	3.47
3 – Nepomuceno	48	3.48
3 – Nepomuceno	49	3.49
3 – Nepomuceno	50	3.50
3 – Nepomuceno	51	3.51
3 – Nepomuceno	52	3.52
4 - Ribeirão Vermelho	1	4.1
4 - Ribeirão Vermelho	2	4.2
4 - Ribeirão Vermelho	3	4.3
4 - Ribeirão Vermelho	4	4.4
4 - Ribeirão Vermelho	5	4.5
4 - Ribeirão Vermelho	6	4.6
4 - Ribeirão Vermelho	7	4.7

4 - Ribeirão Vermelho	8	4.8
4 - Ribeirão Vermelho	9	4.9
4 - Ribeirão Vermelho	10	4.10
4 - Ribeirão Vermelho	11	4.11
4 - Ribeirão Vermelho	12	4.12
4 - Ribeirão Vermelho	13	4.13
4 - Ribeirão Vermelho	14	4.14
4 - Ribeirão Vermelho	15	4.15
4 - Ribeirão Vermelho	16	4.16
4 - Ribeirão Vermelho	17	4.17
5 - Lavras - Casa da Goiaba	1	5.1
5 - Lavras - Casa da Goiaba	2	5.2
5 - Lavras - Casa da Goiaba	3	5.3
5 - Lavras - Casa da Goiaba	4	5.4
5 - Lavras - Casa da Goiaba	5	5.5
5 - Lavras - Casa da Goiaba	6	5.6
5 - Lavras - Casa da Goiaba	7	5.7
5 - Lavras - Casa da Goiaba	8	5.8
5 - Lavras - Casa da Goiaba	9	5.9
5 - Lavras - Casa da Goiaba	10	5.10
6 - Carrancas	1	6.1
6 - Carrancas	2	6.2
6 - Carrancas	3	6.3
6 - Carrancas	4	6.4
6 - Carrancas	5	6.5
6 - Carrancas	6	6.6
6 - Carrancas	7	6.7
6 - Carrancas	8	6.8
6 - Carrancas	9	6.9
6 - Carrancas	10	6.10
6 - Carrancas	11	6.11
6 - Carrancas	12	6.12
6 - Carrancas	13	6.13
6 - Carrancas	14	6.14
6 - Carrancas	15	6.15
6 - Carrancas	16	6.16
6 - Carrancas	17	6.17
6 - Carrancas	18	6.18
6 - Carrancas	19	6.19
6 - Carrancas	20	6.20
6 - Carrancas	21	6.21

6 – Carrancas	22	6.22
6 – Carrancas	23	6.23
6 – Carrancas	24	6.24
6 – Carrancas	25	6.25
6 – Carrancas	26	6.26
7 - Lavras UFLA	1	7.1
7 - Lavras UFLA	2	7.2
7 - Lavras UFLA	3	7.3
7 - Lavras UFLA	4	7.4
7 - Lavras UFLA	5	7.5
7 - Lavras UFLA	6	7.6
7 - Lavras UFLA	7	7.7
7 - Lavras UFLA	8	7.8
7 - Lavras UFLA	9	7.9
7 - Lavras UFLA	10	7.10
7 - Lavras UFLA	11	7.11
7 - Lavras UFLA	12	7.12
7 - Lavras UFLA	13	7.13
7 - Lavras UFLA	14	7.14
7 - Lavras UFLA	15	7.15
7 - Lavras UFLA	16	7.16
7 - Lavras UFLA	17	7.17
7 - Lavras UFLA	18	7.18
7 - Lavras UFLA	19	7.19
7 - Lavras UFLA	20	7.20
7 - Lavras UFLA	21	7.21
7 - Lavras UFLA	22	7.22
7 - Lavras UFLA	23	7.23
