

THYANA LAYS BRANCHER

**GENOTIPAGEM DE ALELOS S EM MACIEIRA E SUA UTILIZAÇÃO COMO
FERRAMENTA AUXILIAR AO MELHORAMENTO GENÉTICO**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, como parte das exigências do para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Altamir Frederico Guidolin

Coorientador: Prof. Dr. Jefferson Luís Meirelles Coimbra

**LAGES, SC
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Brancher, Thyana Lays
Genotipagem de alelos S em macieira e sua
utilização como ferramenta auxiliar ao melhoramento
genético / Thyana Lays Brancher. - Lages , 2017.
120 p.

Orientador: Altamir Frederico Guidolin
Co-orientador: Jefferson Luís Meirelles Coimbra
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado
de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Produção Vegetal, Lages, 2017.

1. Malus domestica Borkh. 2.
Autoincompatibilidade gametofítica. 3. Alelos S. 4.
Melhoramento genético. 5. S-RNases. I. Guidolin,
Altamir Frederico. II. Meirelles Coimbra, Jefferson
Luís . , .III. Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. IV.
Título.

THYANA LAYS BRANCHER

**GENOTIPAGEM DE ALELOS S EM MACIEIRA E SUA UTILIZAÇÃO COMO
FERRAMENTA AUXILIAR AO MELHORAMENTO GENÉTICO**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, como parte das exigências do para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Banca examinadora:

Orientador: _____
Dr. Altamir Frederico Guidolin
CAV/Udesc

Coorientador: _____
Dr. Jefferson Luís Meirelles Coimbra
CAV/Udesc

Membros:

Dra. Maraisa Crestani Hawerth
Epagri-Caçador

Dr. Marcus Vinicius Kvitschal
Epagri-Caçador

Lages, 17 de fevereiro de 2017

AGRADECIMENTOS

À Deus, força constante.

À minha família. Aos meus pais, Armando Brancher e Dirce Faita Brancher, pelo apoio, incentivo, compreensão, paciência e amor dados sempre! Aos meus irmãos João Armando, Janine e Fábio André e as cunhadas Maria Fernanda e Jonine e cunhado Percy, pelo apoio e pelo incentivo. Aos sobrinhos Roger e Benício por serem a minha alegria e me darem um ar a mais sempre!

Aos professores Dr. Altamir Frederico Guidolin e Dr. Jefferson Luís Meirelles Coimbra pela orientação, oportunidade e ajuda durante o período de realização do mestrado.

Aos integrantes do Imagem pelas dicas, conselhos e auxílio nos momentos que foram necessários.

À Udesc e a todos os professores, pelo ensino. À Promop/Udesc pela concessão de bolsa de estudos pelo período de um ano e meio. À Capes, pela concessão de bolsa de estudos durante o último semestre.

À secretária de Pós-graduação em Produção Vegetal, Kátia Wiggeres, pelo auxílio e disponibilidade durante todo o curso.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - Epagri, Estação Experimental de Caçador-SC, pela disponibilização de todo o material vegetal, os reagentes e a estrutura física para realização desse trabalho.

Aos pesquisadores Dra. Maraisa Crestani Hawerth e Dr. Marcus Vinicius Kvitschal. Obrigada por me proporcionarem a oportunidade de desenvolver o trabalho com vocês, por se disponibilizarem a repassar o seu conhecimento, pelo incentivo e, principalmente, pela confiança depositada em mim. Tenham a certeza de que foram fundamentais! O que eu ia dizer mesmo? Ahh tá, obrigada pela amizade de cada dia!

Aos amigos do programa melhoramento genético de macieira da Epagri: Danielle Caroline Manentti (Danniyela) pela grande amizade, pela ajuda, companhia e alegria durante esses dois anos; ao Dr. Marcelo Couto, pelos conselhos, pelas dicas e pelas frases de efeito!; à Karoline Cardoso de Vargas, pela amizade e pela rebeldia. Aos amigos Filipe Schmidt Schuh, Everlan Fagundes e Luigi De Paris

Bombonatti. Ao senhor Frederico Denardi, por disponibilizar informações que só com sua experiência eu poderia obter.

Às grandes amizades que nasceram durante o mestrado: Thiely Corazza, minha dupla, você é especial! Quero ter você sempre comigo 😊; Nicole Trevisan, pelas conversas, conselhos e apoio!

Às amigas que estão presentes a muito tempo: Luciléia Renner Minuzzo e Emanuelli Luiza Nora, pelo incentivo constante e apoio incondicional, mesmo estando à quilômetros de distância. Vocês são especiais e muito importantes!

E à todos que, de uma forma ou outra, contribuíram para essa conquista.

Muito obrigada!

Oggi la gente ti giudica per quale immagine hai.
Vede soltanto le maschere, non sa nemmeno chi sei.
Devi mostrarti invincibile, collezionare trofei ma
quando piangi in silenzio scopri davvero chi sei.
**Credo negli esseri umani che hanno coraggio
di essere umani!**

- Marco Mengoni -

RESUMO

BRANCHER, T. L. **Genotipagem de alelos S em macieira e sua utilização como ferramenta auxiliar ao melhoramento genético**. 2017, 120f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages - SC

Devido a autoincompatibilidade gametofítica (AIG), para a formação de frutos em plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) é necessária a ocorrência de polinização cruzada entre plantas geneticamente compatíveis. A AIG é governada pelo loco multialélico S, que codifica para uma família de RNases atuantes no pistilo da planta e impede a formação do tubo polínico quando os alelos S presentes no grão de pólen forem iguais àqueles presentes no tecido diploide do pistilo. A partir da identificação dos alelos S de plantas de interesse é possível orientar as combinações entre genitores para a obtenção de populações segregantes via hibridações dirigidas e prever a eficiência de genótipos de macieira quando utilizados como polinizadores em pomares comerciais. Os objetivos dessa dissertação foram validar o uso de marcadores de DNA na identificação da constituição genética do loco S de genótipos de macieira e na definição de genótipos polinizadores a serem adotados em pomares comerciais, servindo como ferramenta auxiliar ao melhoramento genético de macieira. Realizou-se: o estudo da segregação dos alelos S em populações segregantes de macieira mediante genotipagem via marcadores de DNA (Capítulo 2); a genotipagem dos alelos S de 28 genótipos elite de macieira via marcadores de DNA e análise de dissimilaridade genética com base na caracterização quanto aos descritores mínimos requisitados para a proteção de novas cultivares (Capítulo 3); e a determinação dos genótipos polinizadores para três cultivares de macieira baseando-se na genotipagem dos alelos S associada à realização de cruzamentos teste a campo (Capítulo 4). No estudo da segregação dos alelos S em populações segregantes, a progênie do cruzamento entre Fred Hough (S^5S^{19}) vs. Monalisa (S^2S^{10}) apresentou a proporção de segregação esperada para compatibilidade entre genótipos: 1:1:1:1. Na segunda população avaliada, em ambos os genitores (M-11/01 e M-13/91) foi identificado o mesmo par de alelos S: S^3S^5 , sendo que a progênie apresentou esse mesmo genótipo. Mediante a análise molecular, em 26 dos 28 genótipos avaliados foram identificados ambos os alelos do loco S, sendo que nos dois restantes apenas um alelo foi identificado em cada genótipo. A dissimilaridade média dos 28 genótipos identificada pela caracterização morfoagronômica foi de 35 %. Considerando a compatibilidade genética total entre os genótipos e as cinco maiores dissimilaridades obtidas, foram sugeridos 15 cruzamentos para ampliação da base genética do Programa de Melhoramento Genético da Epagri. Quanto a seleção de polinizadoras, os testes de polinização a campo não demonstraram diferença significativa entre as cultivares e suas respectivas polinizadoras para as características avaliadas, porém quando os alelos S foram identificados constatou-se a presença de casos de semicompatibilidade entre alguns dos genótipos avaliados. Sugere-se que a não identificação dos genótipos semicompatíveis ocorre devido a alta concentração de grãos de pólen aplicada sobre o pistilo das flores via polinização artificial das cultivares, que pode mascarar a semicompatibilidade existente. Considerando os resultados obtidos nesse estudo, a utilização de marcadores de DNA para identificação do genótipo do loco S em macieira pode ser empregada como ferramenta auxiliar ao programa de melhoramento genético de macieira da Epagri,

tanto para a definição de combinações entre genitores para a formação de populações segregantes que serão alvo de seleção quanto para a escolha de polinizadoras geneticamente compatíveis com as cultivares produtoras de frutos a serem adotados em pomares comerciais, minimizando as perdas de produção em pomares comerciais devido a semicompatibilidade genética ou incompatibilidade entre os genótipos de macieira (cultivar copa x polinizadora).

Palavras-chave: *Malus domestica* Borkh. Autoincompatibilidade gametofítica. Alelos S. Melhoramento genético. S-RNases.

ABSTRACT

BRANCHER, T. L. **Genotyping of S alleles in apple tree and its use as an auxiliary tool for genetic improvement.** 2017, 120p. Dissertation (Master degree) - Post-Graduate Program in Plant Production. University of the State of Santa Catarina, Lages - SC

Due to the gametophytic self-incompatibility (GSI), the occurrence of cross-pollination between genetically compatible plants is necessary for the naturally fructification of apple trees (*Malus domestica* Borkh.). The GSI is governed by the multiallelic locus called S, which encodes a family of RNases that act on the pistil and prevents the formation of the pollen tube when the S alleles presented in the pollen grain is the same as that is presented in the diploid tissue of the pistil. From the identification of the S alleles of plants of interest it is possible to guide the combinations between parents to obtain segregant populations and to predict the efficiency of apple tree genotypes when they are used as pollinators in commercial orchards. The objectives of this dissertation were to validate the use of DNA markers in the identification of the genetic constitution of the S locus of apple tree genotypes, as well as the definition of pollinators genotypes to be adopted in commercial orchards, serving as an auxiliary tool for the apple breeding. The study of the segregation of the S alleles carried out in segregating populations of apple trees by DNA markers (Chapter 2); the locus S of 28 genotypes of apple trees were analyzed by DNA markers and the genetic dissimilarity analysis was done based on the characterization of the same genotypes for based on the minimum descriptors required for the protection of new cultivars (Chapter 3); and the determination of the pollinators genotypes for three apple was done based on the genotyping of the S alleles associated with cross testing (Chapter 4). In the study of segregation of S alleles in segregating populations, the progeny of the cross between Fred Hough (S^5S^{19}) vs. Monalisa (S^2S^{10}) followed the expected segregation ratio for genotype compatibility: 1:1:1:1. In the other population evaluated, the same pair of S alleles, S^3S^5 , were identified in both parents (M-11/01 and M-13/91), and the progeny showed the same genotype. In 26 of the 28 genotypes evaluated, both alleles S were identified, and in the remaining two genotypes only one allele was identified in each genotype. The average dissimilarity of the 28 genotypes obtained by the morphoagronomic characterization was 35 %. Considering the total genetic compatibility between the genotypes and the five major dissimilarities obtained, 15 crosses were suggested to increase the genetic base of the Epagri's Genetic Apple Breeding Program. Regarding the selection of pollinators, the field pollination tests did not show a significant difference between the cultivars and their respective pollinators tested for characters the fruit set and seed number, but when the S alleles present in each of the genotypes, were identified the presence of semi-compatibility cases between them. This fact can be explain by the high concentration of pollen grains applied on the pistil of the flowers on artificial pollination, which may mask the existing semi-compatibility. Considering the results obtained in this study, DNA markers can be used to identify the locus S genotype in apple trees as an auxiliary tool to the Epagri's Genetic Apple Breeding Program, both for the definition of combinations between parents for the formation of segregant populations as to chose pollinators to fruit-producing cultivars to be adopted in commercial orchards.

Keywords: *Malus domestica* Borkh. Gametophytic self-incompatibility. S Alleles. Genetic improvement. S-RNases.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Haplotipos e alelos S de RNases identificados em cultivares e espécies de macieira (atualização em 15 de janeiro de 2016).....	35
Tabela 2 - Relação de alelos S de macieira possivelmente presentes em cultivares desenvolvidas e produzidas no Brasil e seus respectivos números de registro no GeneBank, cultivares referência e referências.....	38
Tabela 3 - Sequência de nucleotídeos de cada iniciador e condições de PCR específicas para cada alelo S testado.....	45
Tabela 4 - Cultivares utilizadas como controle positivo para os respectivos alelos S caracterizados molecularmente, e respectivas referências de identificação.	47
Tabela 5 - Genótipos identificados na progênie de Fred Hough vs. Monalisa.	48
Tabela 6 - Segregação genotípica da progênie do cruzamento entre as cultivares Fred Hough (S^5S^{19}) e Monalisa (S^2S^{10}).....	50
Tabela 7 - Segregação genotípica da progênie do cruzamento entre as cultivares M-11/01 (S^3S^5) e M-13/91 (S^3S^5).....	50
Tabela 8 - Cruzamentos realizados entre as seleções M-13/91 e M-11/01, número de flores polinizadas e número de frutos formados após 40 dias.....	52
Tabela 9 - Genótipos utilizados nos cruzamentos dirigidos do Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri, em Caçador-SC, e seus respectivos genitores e alelos S.....	57
Tabela 10 - Descritores morfoagronômicos determinados pelo MAPA para proteção de novas cultivares.....	59
Tabela 11 - Cultivares utilizadas como controle positivo para os respectivos alelos caracterizados molecularmente e respectivas referências de identificação.	61
Tabela 12 - Sequência de nucleotídeos de cada iniciador e condições de PCR específicas para cada alelo S testado.....	63
Tabela 13 - Alelos S identificados em genótipos de macieira, e respectivos tamanhos do fragmento amplificado via PCR.	68
Tabela 14 - Nível de compatibilidade e dissimilaridade entre os genótipos de macieira avaliados estimada pelo algoritmo de Gower (continua).	75
Tabela 15 - Cultivares copa de macieira e respectivas seleções polinizadoras em teste.	81

Tabela 16 - Época de florescimento da cultivar SCS425 Luiza e respectivas polinizadoras em avaliação ao longo de diversos ciclos de cultivo.....	82
Tabela 17 - Época de florescimento da cultivar SCS426 Venice e respectivas polinizadoras em avaliação ao longo de diversos ciclos de cultivo.....	83
Tabela 18 - Época de florescimento da cultivar SCS427 Elenise e respectivas polinizadoras em avaliação ao longo de diversos ciclos de cultivo.....	84
Tabela 19 - Cultivares utilizadas como controle positivo para os respectivos alelos caracterizados molecularmente e respectivas referências de identificação.....	86
Tabela 20 - Sequência de nucleotídeos de cada iniciador e condições de PCR específicas para cada alelo S testado.	87
Tabela 21 - Possíveis alelos S em seleções polinizadoras de cultivares de macieira com base na genealogia dos respectivos genitores, realizada por Albuquerque Junior (2005).....	88
Tabela 22 - Análise de variância e desempenho médio de genótipos de macieira utilizados como doadores de pólen para a cultivar SCS425 Luiza.	90
Tabela 23 - Análise de variância e desempenho médio de genótipos de macieira utilizados como doadores de pólen para a cultivar SCS426 Venice.....	91
Tabela 24 - Análise de variância e desempenho médio de genótipos de macieira utilizados como doadores de pólen para SCS427 Elenise.	92
Tabela 25 - Alelos S identificados em seleções polinizadoras de macieira, desenvolvidas pela Epagri.	93
Tabela 26 - Compatibilidade genética entre cultivares copa e respectivas polinizadoras com base nos alelos S identificados via marcadores moleculares.	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo das hipóteses de ação das RNases em relação ao tubo polínico no sistema de autoincompatibilidade gametofítica. A - modelo chave fechadura entre a RNase e as proteínas da membrana do tubo; B - modelo de inibição da ação enzimática por inespecificidade com o sítio ativo.....	32
Figura 2 - Esquema representativo de uma flor de macieira.....	33
Figura 3 - Populações avaliadas e possíveis alelos S presentes na progênie considerando as respectivas genealogias e o padrão de segregação característico no gênero <i>Malus</i> spp.....	44
Figura 4 - Dendrograma de agrupamento entre genótipos copa de macieira gerado com base no desempenho para 57 descritores mínimos (MAPA, 2012). Caçador-SC, safra 2015/2016 (dissimilaridade média = 0,35; coeficiente de correlação cofenética = 0,70).....	64
Figura 5 - Frequência de ocorrência de cada alelo S em genótipos de macieira componentes da Coleção de Germoplasma Elite do Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri, Caçador-SC.....	73
Figura 6 - Frutos de macieiras apresentando diferentes formas. a) fruto de formato e desenvolvimento normais, com formação de sementes em todos os carpelos; b) fruto apresentando má formação, com desenvolvimento de sementes em apenas três dos cinco carpelos.	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ M - micromolar

cM - centimorgam

dNTP - desoxirribonucleotídeos fosfatados

EECd - Estação Experimental de Caçador

Epagri - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

ha - hectare

kg - quilograma

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mM - milimolar

nº - número

pb - par de base

PCR - *Polymerase Chain Reaction* - Reação em cadeia da polimerase

U - unidade

vs. - *versus*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	21
A MACIEIRA.....	21
Origem e domesticação	21
Importância econômica	21
O cultivo no Brasil	22
AUTOINCOMPATIBILIDADE GAMETOFÍTICA EM MACIEIRA.....	23
MARCADORES DE DNA	24
MELHORAMENTO GENÉTICO DA MACIEIRA.....	25
Capítulo 1 - Genotipagem de alelos S e sua utilização como ferramenta auxiliar em pesquisas com a cultura da macieira.....	27
RESUMO.....	27
1.1 INTRODUÇÃO.....	28
1.2 LOCO S	30
1.3 MARCADORES DE DNA PARA A SÉRIE ALÉLICA S EM MACIEIRA	36
1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
Capítulo 2 - Validação do uso de marcadores de DNA na genotipagem de alelos S em populações segregantes de macieira	41
RESUMO.....	41
2.1 INTRODUÇÃO.....	42
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	43
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
2.4 CONCLUSÃO	53
CAPÍTULO 3 - Identificação dos alelos S, caracterização morfoagronômica e dissimilaridade entre genótipos elite de macieira.....	54
RESUMO.....	54
3.1 INTRODUÇÃO.....	55
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	57
3.2.1 Descritores morfoagronômicos.....	57
3.2.2 Caracterização molecular	60
3.3 RESULTADO E DISCUSSÃO	64
3.3.1 DESCRITORES MORFOAGRONÔMICOS.....	64
3.3.2 Identificação dos alelos S	67

3.3.3	DISCUSSÃO GERAL	74
3.4	CONCLUSÃO	76
CAPÍTULO 4 - Utilização de marcadores de DNA como ferramenta auxiliar na seleção de genótipos polinizadores de macieira.....		77
RESUMO		77
4.1	INTRODUÇÃO	78
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	81
4.2.1	TESTES DE COMPATIBILIDADE A CAMPO	84
4.2.2	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	85
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
4.3.1	TESTES DE COMPATIBILIDADE A CAMPO	89
4.3.2	IDENTIFICAÇÃO DOS ALELOS S em SELEÇÕES DE MACIEIRA TESTADAS como POLINIZADORAS.....	92
4.3.3	DISCUSSÃO GERAL	95
4.4	CONCLUSÃO	97
CONSIDERAÇÕES FINAIS		98
REFERÊNCIAS		99
ANEXOS.....		99
VITAE.....		120

INTRODUÇÃO GERAL

A MACIEIRA

A macieira (*Malus domestica* Borkh.) é uma espécie frutífera lenhosa, decídua e de clima temperado, pertencente à família Rosaceae, subfamília Pomoidae. Necessita de uma quantidade mínima de horas de frio (abaixo de 7,2 °C) para superar a dormência de suas gemas e continuar o seu ciclo vegetativo e reprodutivo.

O número de cromossomos da macieira é $2n=2x=34$, sendo que comporta-se como diploide na maioria das vezes. O aparecimento de indivíduos triploides pode ocorrer espontaneamente entre indivíduos diploides de qualquer espécie do gênero *Malus* (BROWN, 2012).

ORIGEM E DOMESTICAÇÃO

A espécie *Malus domestica* é originária da Ásia, onde seu ancestral selvagem (*Malus sieversii*) ainda pode ser encontrado. Antes de sua domesticação a macieira era disseminada de forma não intencional por meio das sementes descartadas pelo homem e animais após a ingestão dos frutos. A domesticação da cultura foi realizada por gregos e romanos, sendo os romanos responsáveis pela difusão da macieira há 20.000 anos, propagando-a por toda a Europa e Ásia por meio de enxertia e escolhendo os melhores genótipos, uma vez que era possível detectar que algumas plantas apresentavam maior adaptação às determinadas regiões que outras (BLEICHER, 2006).

A grande maioria das maçãs comercializadas atualmente são provenientes de cultivares derivadas da espécie *Malus domestica* Borkh. Outras espécies como *Malus baccatta*, *Malus sylvestris*, *Malus floribunda* e *Malus eley* são utilizadas em programas de melhoramento genético por serem portadoras de genes de interesse (JOLY, 2002; IUCHI, 2002; BROWN, 2012).

IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A maçã é a uma das frutas mais produzidas no mundo, atrás apenas da uva e da laranja. Nos últimos 20 anos a produção aumentou em torno de 50%, sendo que

em 2013 a produção mundial foi de 80.822.521 toneladas de frutos. O maior produtor é a China, com aproximadamente 49,1% do total da produção mundial, seguido pelos Estados Unidos com 5,1%, e o Brasil representa cerca de 1,5 % da produção mundial, mesma produção de Chile, França e Rússia (FAO, 2013; BROWN, 2012).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE no ano de 2015, o Brasil apresentou 37.222 hectares de área cultivada e produção de 1.377.393 toneladas, proporcionando o rendimento médio de 37.104 kg ha⁻¹. Do total da produção nacional de maçã, praticamente 100 % é produzida na região Sul do Brasil, sendo que 49,4% dessa produção está concentrada no Estado de Santa Catarina, 45,6% no Rio Grande do Sul, e 4,2 % no Paraná (IBGE, 2015).

Em Santa Catarina há aproximadamente 3.017 pomicultores e 16.404,9 hectares colhidos de maçã (GOULART JUNIOR et al., 2016), sendo que 90 % são pequenos e médios produtores com pomares de até 4,5 hectares de macieira (MAPA, 2013). Vários deles trabalham associados à grandes empresas, recebendo auxílio na infraestrutura e no manejo dos pomares (MELLO, 2006).

A maior parte do total de maçãs produzidos no mundo é destinado para consumo *in natura*, e o restante da produção é destinada para a indústria (cidra, suco, destilados, entre outros), sendo que os frutos para essa finalidade são de qualidade inferior, não atendendo as características adequadas para o mercado de frutas *in natura* (MELLO, 2006; BROWN, 2012).

O CULTIVO NO BRASIL

O cultivo comercial de macieira no Brasil teve início somente na década de 1970, quando iniciou-se a produção no estado de Santa Catarina, com a implantação de pomares comerciais incentivados pelo governo (BLEICHER, 2006).

A região Sul apresenta as melhores condições climáticas para o cultivo da macieira no Brasil, sendo que o fator determinante é a baixa temperatura. Segundo Petri (2002), o acúmulo de baixas temperaturas é requerido para diminuir a concentração dos hormônios inibidores de crescimento e aumentar os níveis dos promotores de crescimento, fazendo com que a planta saia do período de dormência. Quando não há frio suficiente para a superação da dormência, há a

possibilidade de aplicação de produtos químicos para que esse processo ocorra (PETRI, 2002).

Existem aproximadamente 7.500 cultivares de maçã conhecidas no mundo (ELZEBROEK e WIND, 2008 *apud* MATSUMOTO, 2014), sendo que em torno de 40 delas possuem interesse econômico e comercial em todo o mundo (BLEICHER, 2006). No Brasil, esse número se restringe ainda mais, sendo que a produção baseia-se basicamente no cultivo de duas cultivares, Gala (55 %) e Fuji (40 %) e seus clones (MELLO, 2006). O restante da produção é proveniente de cultivares como Golden Delicious, Cripps Pink, Eva, Braeburn, Daiane, SCS417 Monalisa entre outras.

Todos os pomares comerciais de macieira são compostos pelas cultivares produtoras dos frutos de interesse, e por outro genótipo, chamado de polinizadora, responsável pela fertilização da planta produtora. As plantas polinizadoras devem apresentar épocas de floração coincidentes com as plantas produtoras dos frutos, exigências edafoclimáticas e condições de manejo o mais próximas possível das cultivares produtoras (MATSUMOTO, 2014; SCHIFINO-WITTMANN e DALL'AGNOL, 2002; ALBUQUERQUE JUNIOR, 2005). Esses fatores visam assegurar o sincronismo de florescimento e permitir o adequado manejo do pomar. Além desses aspectos citados, as plantas necessitam ser geneticamente compatíveis, pois a macieira apresenta o mecanismo de autoincompatibilidade gametofítica para fertilização das flores (MOTA, TAVARES e OLIVEIRA, 2006).

AUTOINCOMPATIBILIDADE GAMETOFÍTICA EM MACIEIRA

A autoincompatibilidade gametofítica (AIG) é um mecanismo que promove a alogamia, pois impede a autofecundação das plantas. Da mesma maneira, a AIG impede o cruzamento entre plantas portadoras de alelos em comum no loco correspondente a autoincompatibilidade, o loco S (ALLARD, 1971; DE NETTANCOURT, 1977; SCHIFINO-WITTMANN e DALL'AGNOL, 2002).

Os genótipos de macieira utilizados nos programas de melhoramento genético atualmente evidenciam vários descendentes em comum e, por isso, as possibilidades de combinações entre eles são restritas se a AIG for levada em consideração (KVITSCHAL e DENARDI, 2011; HANCOCK et al., 2008). Havendo alelos em comum entre a célula haploide do grão de pólen e o tecido diploide do

pistilo ocorrerá aborto do pólen (RAMALHO et al., 2012; BATLLE et al., 1995; BROOthaerts et al., 1995; VAN NERUN et al., 2001; MATSUMOTO, 2014; DE FRANCESCHI et al., 2016).

A ocorrência de polinização cruzada na macieira é um evento chave, tanto para a formação de frutos quanto para o sucesso de práticas de hibridações dirigidas, sendo que o nível de compatibilidade entre genótipos é, na maioria das vezes, definido por testes a campo (MATSUMOTO, 2014). Com a utilização de ferramentas de biologia molecular para a determinação do nível de compatibilidade, a identificação dos alelos S passa a ser mais rápida e/ou mais confiável, sendo que, além da cultura da macieira, essas técnicas já foram empregadas em culturas como pera e damasco, que possuem o mesmo mecanismo de autoincompatibilidade (ISHIMIZU et al., 1999; YAEgAKI et al., 2001).

MARCADORES DE DNA

Existem diversos métodos para análise e caracterização do loco S da macieira, embora antes do aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular a caracterização era estritamente realizada por meio de cruzamentos testes a campo (KOBEL et al., 1939). Em macieira, no ano de 1994 os alelos S anteriormente identificados por cruzamentos testes foram caracterizados por análise de proteínas (SASSA et al., 1994) e, atualmente, os marcadores de DNA são a alternativa para a caracterização.

Os marcadores de DNA são utilizados para marcar regiões do genoma cuja expressão seja de difícil identificação e que representem facilmente diferenças (polimorfismos) entre indivíduos. Quanto mais polimorfismos forem identificados, mais informações são geradas. Para ser utilizado com sucesso na análise de polimorfismos, o marcador de DNA deve estar "intimamente ligado" ao alelo de interesse para que ambos sejam identificados juntos quando o indivíduo expressar o fenótipo estudado (RAMALHO et al., 2012). Portanto, o uso de marcadores de DNA pode contribuir substancialmente para a obtenção de ganhos genéticos no melhoramento genético da cultura da macieira (RAMALHO et al., 2012; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

A grande maioria dos genótipos de macieira ainda não apresenta os seus alelos do loco S genotipados, o que geraria informações a respeito das plantas que

possuam compatibilidade para serem utilizadas nos trabalhos inerentes ao melhoramento genético de macieira (BROWN, 2012).

MELHORAMENTO GENÉTICO DA MACIEIRA

O primeiro melhorista de macieira no mundo que se tem notícia foi Thomas Andrew Knight (1759-1838), que utilizou os princípios da hibridação para obter plantas de macieira melhoradas. Atualmente, existem vários programas de melhoramento de macieira instalados em todo o mundo, normalmente em empresas de pesquisas ou universidades, que dão subsídios e estrutura para as pesquisas (BROWN, 2012).

No Brasil, os programas de melhoramento genético foram criados logo que a maçã passou a ser produzida comercialmente, entre eles os programas do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) em 1953, e do Instituto Agrônomo do Paraná (Iapar), criado em 1979 (HAUAGGE e BRUCKNER, 2002).

Por apresentar grande importância na economia do estado de Santa Catarina, em 1973 foi implantado o Programa de Melhoramento Genético de Macieira em Caçador e em São Joaquim, conduzido pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri - na época chamada de Empasc), tendo como objetivo o desenvolvimento de novas cultivares adaptadas ao clima de Santa Catarina, resistentes às doenças (incluindo resistência à sarna e mancha foliar de *Glomerella*) e com baixa exigência de frio hibernar. Depois de 1982, o programa acrescentou ao seu foco de pesquisa o desenvolvimento de genótipos com médio requerimento de frio - 500 a 600 horas de frio (DENARDI e HOUGH, 1987) e qualidade de frutos.

Desde 1973, foram desenvolvidas e lançadas 19 cultivares por meio das pesquisas do programa de melhoramento genético de macieira da Epagri. São elas: Primícia (DENARDI, HOUGH e CAMILO, 1988a), Princesa (DENARDI, HOUGH e CAMILO, 1988b), Fred Hough (DENARDI e CAMILO, 1994), Imperatriz (DENARDI e CAMILO, 1996), Catarina (BONETI et al., 1996), Baronesa (DENARDI e CAMILO, 1997), Fuji Suprema (PETRI, DENARDI e SUSUKI, 1997), Lisgala (DENARDI, CAMILO e PETRI, 1997), Daiane (DENARDI e CAMILO, 1998a), Duquesa (DENARDI e CAMILO, 1998b), Condessa (DENARDI e CAMILO, 1998c), Joaquina (BONETI, PEREIRA e BRIGHENTI, 2003), SCS417 Monalisa (DENARDI, 2009),

Castel Gala (DENARDI e STUKER, 2008), Fuji Precoce (DENARDI, 2009), Kinkas (DENARDI, 2009), SCS425 Luiza, SCS426 Venice e SCS427 Elenise (DENARDI, KVITSCHAL e HAWERROTH, 2015).

A necessidade de desenvolver plantas com melhor adaptação, elevada produtividade de frutos e resistentes às doenças mais comuns nas regiões de cultivo da macieira impulsionam as pesquisas, inclusive contemplando estudos envolvendo biologia molecular (LIEBHARD et al., 2002). No melhoramento genético clássico, sem o auxílio de técnicas de biologia molecular, o desenvolvimento de novas cultivares de macieira necessita de, pelo menos, 12 anos de trabalho e de avaliações (KVITSCHAL et al., 2013). É um processo difícil e que demanda tempo, tanto pelo mecanismo de autoincompatibilidade presente, quanto pelo fato da macieira ser perene, com ciclo longo e de grande porte quando as plantas atingem a idade adulta (BROWN e MALONEY, 2003).

A utilização de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar para o melhoramento clássico pode dinamizar o período de pré-seleção e de determinação de genótipos polinizadores para as possíveis novas cultivares, proporcionando maior eficiência e agilidade ao processo de avaliação (KVITSCHAL et al., 2013; BROWN e MALONEY, 2003).

CAPÍTULO 1 - Genotipagem de alelos S e sua utilização como ferramenta auxiliar em pesquisas com a cultura da macieira

(Revisão)

RESUMO

A macieira (*Malus domestica* Borkh.) é uma espécie diploide com flores hermafroditas, mas alógama por apresentar o mecanismo de autoincompatibilidade gametofítica, exigindo o cruzamento entre plantas geneticamente compatíveis para que ocorra a fertilização e geração de frutos. Para adequada polinização em pomares comerciais e para a obtenção da maior quantidade de híbridos possíveis em cruzamentos dirigidos realizados na rotina de programas de melhoramento genético, plantas totalmente compatíveis devem ser utilizadas. A autoincompatibilidade é determinada pelo loco S, que é responsável pela codificação de proteínas envolvidas na formação do tubo polínico. Contudo, há a necessidade de pares de alelos S distintos entre os genitores envolvidos nos cruzamentos para que haja formação adequada dos zigotos. Nesse sentido, a utilização de marcadores de DNA permite a identificação de alelos S em genótipos de macieira, auxiliando tanto na escolha de genótipos compatíveis para cruzamentos e geração de populações híbridas, quanto na determinação de polinizadoras eficientes para uso comercial, capazes de gerar informações importantes para as diferentes etapas inerentes ao melhoramento genético de macieira.

Palavras-chave: *Malus domestica* Borkh. Autoincompatibilidade gametofítica. Polinização cruzada. Marcadores de DNA. Série alélica S.

ABSTRACT

The apple tree (*Malus domestica* Borkh.) is a diploid specie with hermaphrodite flowers, but require the crossing between genetically compatible plants for fertilization and fructification because the gametophytic self-incompatibility mechanism. Totally compatible plants must be used in order to promote the correct pollination in commercial orchards and to obtain more hybrids in apple breeding programs. Self-incompatibility is determined by the locus S, which is responsible for the coding of proteins involved in the formation of the pollen tube. However, different allele S pairs among the parents involved in crosses are require for adequate formation of the zygote. In this sense, the use of DNA markers allows the identification of S alleles in apple genotypes, assisting both the selection of compatible genotypes for generation of hybrid populations, and the determination of efficient pollinators for commercial use.

Keywords: *Malus domestica* Borkh. Gametophytic self-incompatibility. Cross-pollination. DNA markers. Allele S.

1.1 INTRODUÇÃO

A macieira (*Malus domestica* Borkh.) é uma espécie frutífera pertencente à família Rosaceae, subfamília Pomoidae, sendo uma das frutas mais cultivadas no mundo, atrás apenas da uva e da laranja. Existem mais de sete mil cultivares de macieira conhecidas (ELZEBROEK e WIND, 2008 *apud* MATSUOTO, 2014), porém cerca de 40 possuem interesse econômico e comercial em todo o mundo (BLEICHER, 2006).

As plantas do gênero *Malus* em geral, são dependentes da ocorrência de polinização cruzada para a reprodução e, consequente, formação de frutos. O mecanismo determinante dessa dependência é a autoincompatibilidade gametofítica, que consiste na incapacidade de uma planta fértil em produzir descendentes por autofecundação ou após a polinização entre indivíduos geneticamente incompatíveis (aparentados ou não), que evidenciam alelos em comum no loco S que determina a autoincompatibilidade (ALLARD, 1971). Assim, considerando grãos de pólen e pistilos com potencial de germinação, crescimento e desenvolvimento normais, existindo alelos comuns entre genitores masculinos e femininos, teoricamente, ocorrerá o aborto do grão de pólen (MATSUMOTO, 2014). Ou seja, quando os genitores manifestam o mesmo par de alelos, haverá 100 % de aborto de pólen e, por consequência, nenhum descendente (semente) será formado (RAMALHO et al., 2012). Já, na presença de um alelo em comum entre genitores ocorrerá a semicompatibilidade, podendo ocasionar a formação de frutos de formato desuniforme em função da formação de sementes em apenas alguns carpelos (BATLLE, ALSTON e EVANS, 1995; BROOHAERTS et al., 1995; VAN NERUN, et al., 2001). Todavia, quando todos os alelos envolvidos no cruzamento são diferentes, 100 % das sementes podem ser formadas (RAMALHO et al., 2012; BATLLE, ALSTON e EVANS, 1995; BROOHAERTS et al., 1995; VAN NERUN, et al., 2001; MATSUMOTO, 2014).

Devido à autoincompatibilidade gametofítica, os pomares de macieira são compostos pela cultivar copa e por outro genótipo que é responsável pela sua fertilização. Ambas as plantas devem apresentar épocas de floração coincidentes e condições de desenvolvimento de frutos semelhantes, para permitir o adequado manejo do pomar (MATSUMOTO, 2014; SCHIFINO-WITTMANN e DALL'AGNOL, 2002; ALBUQUERQUE JUNIOR, 2005). Além disso, as plantas necessitam ser

geneticamente compatíveis, sendo a polinização cruzada entre indivíduos com alelos S distintos um evento chave para a formação de frutos e para o sucesso das práticas de hibridações dirigidas (MOTA, TAVARES e OLIVEIRA, 2006; MATSUMOTO, 2014).

Os programas de melhoramento genético trabalham com genitores que expressem ao menos alguma característica favorável, como resistência à doenças, qualidade de fruto, elevado potencial produtivo etc., resultando em um estreitamento progressivo da base genética das populações subsequentes, que pode comprometer o potencial dos genótipos utilizados a longo prazo (HEO et al., 2012). Em virtude da maioria das cultivares de macieira desenvolvidas nos últimos anos terem em sua ascendência genitores comuns em alguma geração, tendem a apresentar alto grau de parentesco entre si (KVITSCHAL e DENARDI, 2011). Com isso aumenta-se a probabilidade de existirem alelos S em comum, o que restringe as possibilidades de combinações para hibridações bem sucedidas.

No geral, o nível de compatibilidade entre genótipos de macieira ainda é exclusivamente determinada por ensaios a campo, que podem ser pouco eficientes devido ao tempo de avaliação, realizada uma vez ao ano na época de floração e/ou aos resultados variáveis em função dos efeitos de ambiente na expressão dos caracteres de avaliação: número de frutos formados por inflorescência, número de sementes por fruto e sua distribuição nos lóbulos carpelares (KOBEL et al., 1939; MATSUMOTO, 2014; HEO et al., 2012).

Com a expansão das pesquisas na área de biologia molecular, desenvolveu-se grande interesse em encontrar alternativas que diminuíssem o tempo e o trabalho para a avaliação, e aumentassem a eficácia da obtenção desses resultados. Uma das técnicas desenvolvidas foi a identificação dos alelos S por meio de marcadores de DNA. A genotipagem dos alelos S já foi utilizada em culturas como a pereira (*Pyrus* spp.) e o damasco (*Prunus armeniaca*) para gerar informações sobre a compatibilidade entre genótipos para hibridações dirigidas, sendo que ambas também possuem o mesmo mecanismo de autoincompatibilidade visto na macieira (ISHIMIZU et al., 1999; YAEAGAKI et al., 2001).

1.2 LOCO S

Em espécies da família Rosaceae, a autoincompatibilidade gametofítica é controlada por um único loco, o loco S. A determinação da compatibilidade ou não entre pólen vs. pistilo ocorre quando o alelo S do tecido haploide do grão de pólen é combinado com os dois alelos S presentes do tecido diploide do pistilo (McCUBBIN e KAO, 2000).

Resultados obtidos por meio de experimentos de mapeamento genético indicam que nos gêneros *Malus* spp. e *Pyrus* spp. o loco S está localizado na porção terminal do cromossomo 17 (YAMAMOTO et al., 2002; DE FRANCESCHI et al., 2011; DE FRANCESCHI et al., 2016). De acordo com Huang et al. (1994), Ioerger, Clark e Kao (1990), Ma e Oliveira (2002), e Yamane e Tao (2009), no geral e na família Rosaceae (LI et al., 2012) o loco S tem cinco regiões altamente conservadas (C1, C2, C3, C4 e C5), sendo que as regiões C2 e C3 correspondem a regiões de codificação das RNases, similares às aquelas presentes em fungos. Segundo esses autores, as duas regiões incluem resíduos de histidina como peça fundamental para desenvolver a capacidade catalítica, sendo que a alteração de uma histidina por outro aminoácido, como a aspargina, ocasiona a perda da atividade enzimática e, por consequência, a perda da capacidade de reconhecimento do alelo S do grão de pólen. Ainda segundo esses autores, existe também uma região hipervariável entre as regiões C2 e C3 que interage nos processos bioquímicos que ocorrem, porém, que não estão totalmente elucidados.

Os alelos S podem ser mais similares aos seus alelos correspondentes em outra espécie do que os diferentes alelos dentro de uma única espécie (IOERGER, CLARK e KAO, 1990; ORTEGA et al., 2006). Nesse caso, a maior similaridade de sequência de bases e tamanho de alelos S nas Rosaceae ocorre entre os alelos S do gênero *Malus* e os alelos S do gênero *Pyrus*, com aproximadamente 60 à 69 % de similaridade (SASSA et al., 1996).

Para explicar o mecanismo de atuação dos genes presentes no grão de pólen e no pistilo foi proposta a atuação de, ao menos, dois conjuntos de genes determinantes: um conjunto codifica as ribonucleases (RNases) presentes no pistilo, as quais determinam a função feminina de reconhecimento de pólen autoincompatível; e outro conjunto de genes que codificam proteínas F-box (*SFBB*: *S-locus F-box brothers*), específicas da célula haploide do grão de pólen,

determinando a função masculina da autoincompatibilidade (BROOHAERTS et al., 1995; USHIJIMA et al., 2003; SANZOL e HERRERO, 2007; YAMANE e TAO, 2009; LI et al., 2012; MORIMOTO, AKAGI e TAO, 2015). Em plantas com autoincompatibilidade gametofítica, os produtos dos alelos S do pistilo são proteínas com atividade catalítica de RNases (LI et al., 2012). Essas enzimas são capazes de entrar no citoplasma do tubo polínico quando o haplotipo é incompatível e degradar o RNA que iria ser traduzido para a formação das proteínas que promovem o crescimento do tubo polínico (McCLURE et al., 1990; TAO et al., 1997). Já a atuação das proteínas codificadas pelo gene F-box ainda não está totalmente elucidada, sendo aceitas duas hipóteses para explicar como as proteínas trabalham em conjunto com as RNases para a inibição do crescimento do tubo e determinação da autoincompatibilidade, de acordo com McCubbin e Kao (2000):

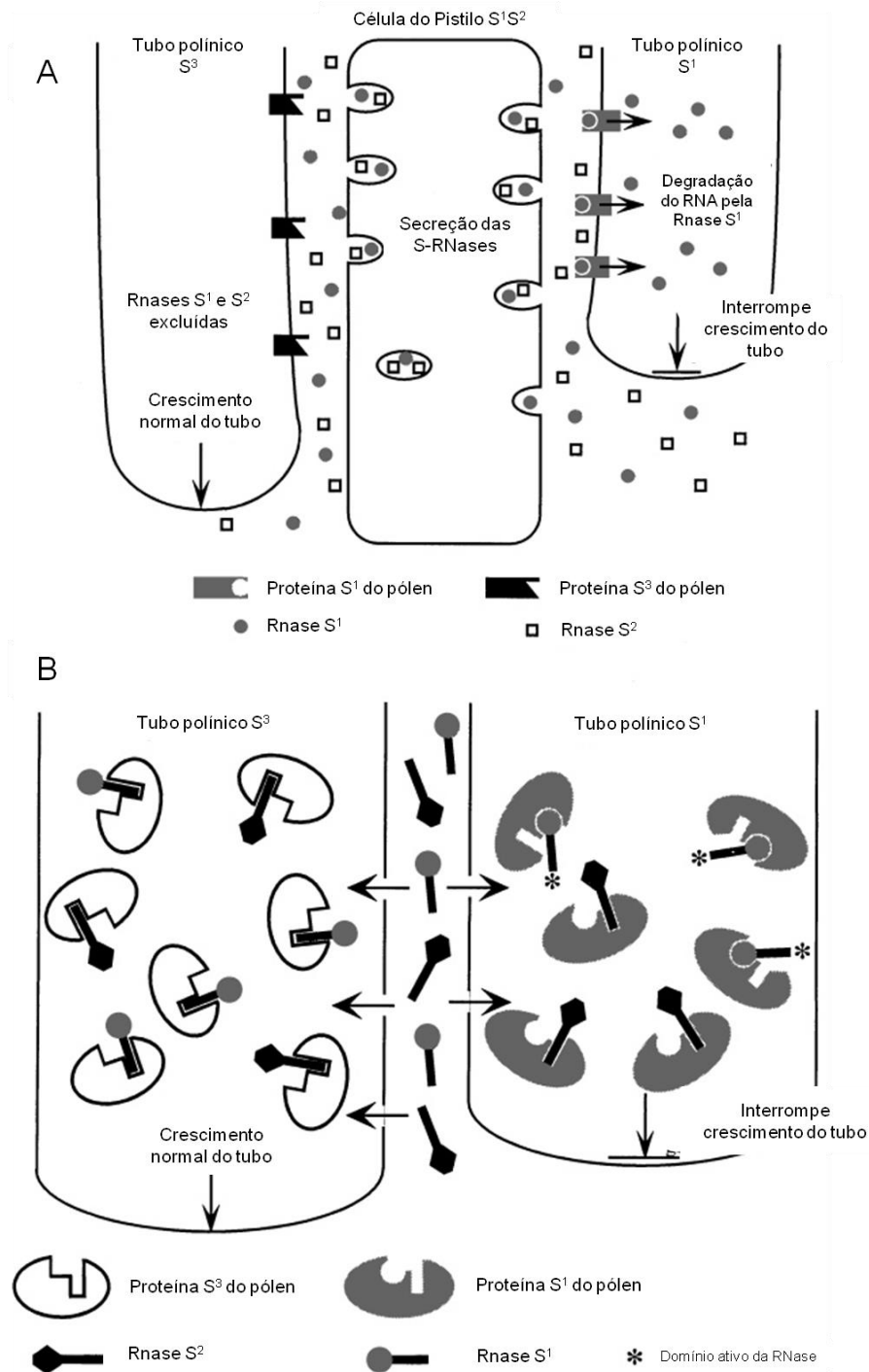
1) Uma das hipóteses é a atuação do modelo chave-fechadura entre as proteínas da membrana do tubo polínico e as RNases do pistilo, uma vez que, quando os alelos S são comuns, a RNase se liga à proteína e é capaz de transportar-se para dentro do tubo polínico onde degrada o RNA presente, conforme representado na Figura 1A;

2) A outra hipótese sugere a entrada de quaisquer das RNases no tubo polínico, mesmo na presença de alelos S em comum, tendo atuação na parte interna dos tubos, sendo que nesse caso as RNases inibem o crescimento do tubo polínico quando ligadas a um domínio inibidor nas proteínas codificadas por alelos S comuns entre o tecido haploide do grão de pólen e o pistilo, conforme representado na Figura 1B. Na presença de alelos distintos, a RNase tem interação com o sítio ativo das proteínas do pólen, que é diferente do domínio específico necessário para a atuação da RNase, e dessa maneira a atividade catalítica é inibida. Dentre essas duas hipóteses, a segunda é a mais aceita pela comunidade científica (McCUBBIN e KAO, 2000).

Mutações e recombinações podem resultar na formação de novos alelos (LI et al., 2012), porém, para que isso ocorra deve haver a mutação tanto no alelo S do pistilo quanto no alelo S que codifica as proteínas do tubo polínico (HENG et al., 2011). Alguns tipos de mutações podem, ainda, determinar a compatibilidade entre genótipos que apresentem os mesmos alelos, ou tornar genótipos autocompatíveis. Essas mutações são pontuais e ocorrem ou no grão de pólen ou no pistilo, fazendo

com que o local onde ocorreu a mutação perca a sua funcionalidade, sem afetar a atividade do local sem a mutação (LI et al., 2016).

Figura 1 - Esquema representativo das hipóteses de ação das RNases em relação ao tubo polínico no sistema de autoincompatibilidade gametofítica. A - modelo chave fechadura entre a RNase e as proteínas da membrana do tubo; B - modelo de inibição da ação enzimática por inespecificidade com o sítio ativo.



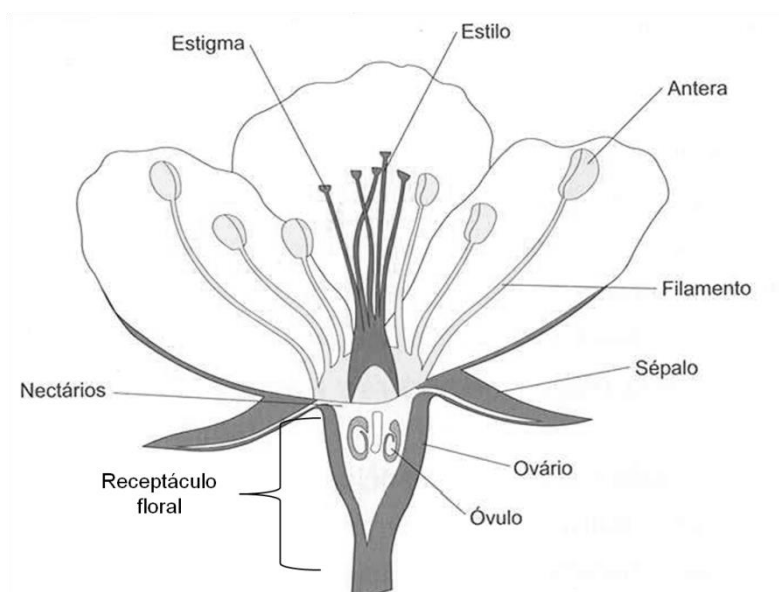
Fonte: McCubbin e Kao, 2000. Traduzida pela autora, 2016.

Já foram identificados casos onde não ocorre a rejeição do pólen entre indivíduos portadores dos mesmos alelos S em macieira, tanto pela ocorrência de mutações no grão de pólen quanto no tecido diploide do pistilo (HEO et al., 2012, SAITO et al., 2007; MATSUMOTO et al., 1999; LI et al., 2016). Como exemplo, a cultivar Megumi apresenta 88,8 % de frutificação sob autofecundação, produzindo cerca de quatro sementes por fruto (MATSUMOTO, 2014). Além disso, algumas pesquisas já propuseram a existência de homozigose nos loco S de determinados genótipos. Matsumoto et al. (1999) identificaram os alelos S de descendentes da autofecundação da cultivar Megumi (S^2S^9) e encontraram três genótipos diferentes para o loco S em sua progênie: S^2S^2 , S^2S^9 e S^9S^9 . Já Kato, Kato e Sassa (2012) realizaram a autofecundação das cultivares de pereira japonesa Imamura-aki (S^1S^6) e Natsuhikari (S^3S^4) e identificaram nas progênies os genótipos S^1S^1 e S^6S^6 , S^3S^3 e S^4S^4 , respectivamente. Nesse cenário, há a possibilidade da fecundação do óvulo por grãos de pólen S-incompatíveis e consequente formação de frutos.

Por outro lado, na macieira a formação de frutos também pode ocorrer por partenocarpia (~5 % de frutificação) em algumas cultivares, não havendo participação de pólen exógeno (HEGEDUS, 2006).

As porções comestíveis da maçã são originárias do desenvolvimento do receptáculo floral que forma o pseudofruto, já os frutos verdadeiros são as sementes formadas na porção central do ovário, conforme apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Esquema representativo de uma flor de macieira.



Matsumoto (2014) desenvolveu um banco de dados que está disponível *on line* (<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~hort/apple/>) no qual apresenta os alelos S identificados em pouco mais de 600 acessos de macieira já caracterizados; entre esses acessos estão diferentes espécies do gênero *Malus* spp. e diferentes cultivares. Nesse banco de dados também constam os alelos já identificados em macieira e suas respectivas cultivares e espécies referência, conforme apresentado na Tabela 1. A última atualização do banco de dados foi realizada em 15 de janeiro de 2016. Dentre as cultivares caracterizadas estão algumas bastante utilizadas em hibridações dirigidas, como a Golden Delicious, a Idared, e a Red Delicious, cultivares produzidas em nível comercial, como a Fuji e a Granny Smith, e também genótipos não tradicionais no Brasil, como a Menzauer Jagerapfel, a Bohnapfel e a Merlijin).

A nomenclatura japonesa, que foi a primeira nomenclatura adotada quando a identificação dos alelos S se restringia a testes à campo e análises de crescimento do tubo polínico, utiliza letras para identificação dos alelos S. Porém, vários alelos tiveram sua nomenclatura alterada com o desenvolvimento de novas ferramentas para a sua identificação, tanto pela descoberta de novos alelos quanto pela identificação de alelos sobrepostos. Atualmente, a nomenclatura mais utilizada é a numeração dos alelos (Tabela 1).

Tabela 1 - Haplotipos e alelos S de RNases identificados em cultivares e espécies de macieira (atualização em 15 de janeiro de 2016).

Haplotipo proposto	Alelos S proposto	Antigo nome do alelo	Cultivar/Espécies	Alelos S			Nº no GeneBank	Referência
1	1	1, f	Fuji*	1	9b		D50837	Sassa et al. (1996)
2	2	2, a	Golden delicious*	2	3		U12199	Broothaerts et al. (1995) Komori et al. (2000)
3	3	3, b	Golden delicious*	2	3		U12200	Broothaerts et al. (1995) Komori et al. (2000)
4	4	4	Gravenstein**	4	11	20	AF327223	Boskovic e Tobutt (1999) Van Nerum et al. (2001)
5	5	5	Queen's Cox*	5	9a		U19791	Janssens et al. (1995)
6	6a 6b	6	Oetwiler Reinette*	3	6a		AB094495	Kitahara e Matsumoto (2002)
		12	Citron d'Hiver**	3	5	6a	AB105061	Boskovic e Tobutt (1999)
		17	Blenheim Orange**	1	3	6b	AB105062	Boskovic e Tobutt (1999)
		19	Bohnappel**	6b	9	16	AB094493	Boskovic e Tobutt (1999)
7	7a	7	Idared*	3	7a		U19792	Janssens et al. (1995)
	7b	d, e ^z	Akane*	7b	24		AB032246	Kitahara et al. (2000)
8	8	8	Ontario Reinette*	1	8			Não publicado
9	9a	9	Queen's Cox*	5	9a		U19793	Janssens et al. (1995)
	9b	c	Fuji*	1	9b		D50836	Sassa et al. (1996)
10	10a	10, 25 ^y	Prima*	2	10a		AF327221	Van Nerum et al. (2001)
	10b	i	McIntosh*	10b	25		AB052683	Kitahara e Matsumoto (2002)
11	11	10/11, 13	Gravenstein**	4	11	20	AB105060	Boskovic e Tobutt (1999)
		14	Jacques Lebel**	1	3	11	AB094492	
15	15	15	Kaiserapfel**	1	10	15		Boskovic e Tobutt (1999)
16	16a	27, 27a	Baskatong*	16a	26		AF016919	Verdoodt et al. (1998) Van Nerum et al. (2001)
		22, 27b	Alkmene*	5	16b		AF327222	Boskovic e Tobutt (1999) Van Nerum et al. (2001)
		23, 27b	Delbard Jubile*	2	16b		AF327222	Boskovic e Tobutt (1999) Van Nerum et al. (2001)
	16b	25 ^x , 27b	Merlijin*	3	16b		AF327222	Boskovic e Tobutt (1999) Van Nerum et al. (2001)
		16, 27a ^w	Bohnappel**	6b	9	16c	AB126322	Boskovic e Tobutt (1999) Broothaerts (2003)
	16c							
18	18	18	Menzauer Jagerapfel**	3	5	18		Boskovic e Tobutt (1999)
20	20a	g, d ^v	Indo*	7	20a		AB019184	Matsumoto et al. (1999)
	20b	g ⁱ	<i>Malus transitoria</i> **	20b	30	?	AB096138	Matsumoto et al. (2001)
21	21	21	Ribston Pippin**	1	9	21	AB094494	Boskovic e Tobutt (1999)
23	23	10 ^u	Granny Smith*	3	23		AF239809	Schneider et al. (2001)
24	24a	24	Braeburn*	9	24a		AF016920	Verdoodt et al. (1998)
	24b	h	Akane**	7	24b		AB032247	Kitahara et al. (2000)
25	25	25, z	McIntosh*	10b	25		AB062100	Kitahara e Matsumoto (2002)
26	26	26	Baskatong*	16	26		AF016918	Verdoodt et al. (1998)
28	28	19, 30, e, d ^l , de ^l , g ^t	Delicious*	9	28		AB035273	Matsumoto e Kitahara (2000) Broothaerts et al. (2003)
		28, 30	Red delicious*	9	28		AF201748	Schneider et al. (2001)
29	29	29	Anna*	3	29		AY039702	Não publicado
30	30	t	<i>Malus transitoria</i> **	20b	30	?	AB035928	Matsumoto e Kitahara (2000) Matsumoto et al. (2001)
31	31	31	York Imperial*	2	31		DQ135990	Não publicado
32	32	32	Burgundy*	20	32		DQ135991	Não publicado

Fonte: Matsumoto, 2014, traduzido e modificado pela autora, 2016.

NOTAS: * Genótipo diploide. ** Genótipo triploide.

1.3 MARCADORES DE DNA PARA A SÉRIE ALÉLICA S EM MACIEIRA

Existem diversos marcadores moleculares desenvolvidos para possibilitar a identificação do genótipo do loco S em diferentes espécies. Anteriormente ao desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, os alelos S de cultivares de interesse eram determinados indiretamente por meio de cruzamentos testes a campo. Em 1994, os alelos S anteriormente identificados foram caracterizados por análise de proteínas (SASSA et al. 1994). Contudo, nos últimos anos os marcadores de DNA tem representado uma alternativa viável e eficiente para a realização dessa caracterização.

Um dos primeiros trabalhos descritos sobre a autoincompatibilidade gametofítica em macieira com a identificação dos respectivos alelos S por meio de marcadores de DNA foi realizado por Broothaerts et al. (1995). Nesse trabalho foi avaliada a cultivar Golden Delicious, que até então não possuía seus alelos S caracterizados, mesmo sendo uma das cultivares com representativa importância comercial em nível mundial. Foram analisadas as proteínas produzidas pelos pistilos das flores de Golden Delicious e a parte do DNA representante do gene S foi amplificada pela reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizando iniciadores desenhados para acessar o genes para S-RNases da família Solanaceae, que já haviam sido desenvolvidos. Além disso, para a caracterização dos alelos S presentes nessa cultivar, o fragmento amplificado foi sequenciado e comparado à biblioteca de cDNA constituída a partir de estudos com tecidos vegetais específicos ao pistilo floral, na busca por sequências homólogas. Dois cDNAs específicos de pistilo foram identificados, definindo os alelos S² e S³, que hoje já foram identificados em uma série de cultivares. Por visualização em gel de agarose, os fragmentos gerados para os alelos S² e S³ foram identificados, apresentando 449 e 500 pb respectivamente.

Janssens et al. (1995) identificaram outros três alelos: os alelos S⁵ e S⁹ na cultivar Queen's Cox, e o alelo S⁷ na cultivar Idared. Baseando-se nas sequências nucleotídicas dos cDNAs dos cinco alelos S para macieira identificados até então, esses autores desenvolveram um método de genotipagem alelo-específico por meio da técnica de PCR. Realizaram a extração do RNA total das plantas seguido pela síntese do cDNA para construção dos iniciadores a serem utilizados na PCR. Atualmente, sabe-se que esses alelos estão presentes em outras cultivares de

macieira, como o alelo S^5 na Gala e na Sansa, e o alelo S^9 nas cultivares Fuji, Jonadel e Florina (BROOTHAERTS, VAN NERUM e KEULEMANS, 2004). Ainda no trabalho de Janssens et al. (1995), foram identificados os alelos S das cultivares comerciais White Transparent (S^5), Schöne von Boskoop ($S^2S^3S^5$) e Wellington (S^9). O alelo S1, com 530 pb foi identificado por Sassa et al. (1996) nas cultivares Fuji e Jonathan.

No sentido de refinar a técnica de identificação dos alelos S via PCR, os autores Janssens et al. (1995), Van Nerun et al. (2001), Broothaerts, Van Nerun e Keulemans (2004) e Janssens et al. Larsen et al. (2016) realizaram a digestão enzimática dos produtos de reações com enzimas de restrição para diferenciação de amplificadores de tamanho igual que dificultavam a sua identificação em gel de agarose. Essa variação do PCR tradicional é chamada de CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), sendo que a clivagem ou não dos fragmentos ocorre pela presença de sítio(s) de restrição reconhecido(s) pelas enzimas de restrição, e possibilita a caracterização dos diferentes indivíduos mediante a análise dos polimorfismos encontrados (YAMANE e TAO, 2009). Dependendo dos fragmentos gerados após a digestão, os alelos S específicos podem ser caracterizados.

Verdoodt et al. (1998) identificaram outros três alelos: S^{24} , S^{26} e S^{27} , todos eles utilizando as técnicas e procedimentos citados anteriormente. O alelo S^{24} (580 pb) foi caracterizado primeiramente na cultivar Braeburn, sendo o outro alelo presente o S^9 . O alelo S^{24} também foi identificado na cultivar Rome Beauty ($S^{20}S^{24}$) (BROOTHAERTS, VAN NERUM e KEULEMANS, 2004). Já os alelos S^{26} (194 pb) e S^{27} (274 pb) foram definidos a partir de estudos com a cultivar Baskatong. Broothaerts (2003) sugeriu a renomeação do alelo S^{27} para S^{16} após encontrar homologia completa entre a sequência de bases nitrogenadas entre dos dois alelos, cuja nomenclatura vem sendo utilizada até hoje. O produto de PCR utilizando os iniciadores para o alelo S^{16} (274 pb) necessita de digestão pela enzima de restrição Taq I, gerando dois fragmentos, de 243 e 31 pb respectivamente.

Em 2001, Van Nerum et al. identificaram outros quatro alelos S: o S^{20} , com 920 pb, e pela digestão dos produtos da PCR com enzima de restrição Nar I gerou dois fragmentos de 800 e 120 pb, na cultivar Mutsu, anteriormente citado como alelo S^9 por Matsumoto et al. (1999); o S^{22} com 274 pb, pela digestão dos produtos da PCR com enzima de restrição Taq I, gerando três fragmentos de 199, 31 e 44 pb, respectivamente, na cultivar Alkemene, anteriormente citado como S^{27b} , o S^{23} , com

237 pb foi identificado na cultivar Delbard Jubilé, e também na cultivar Granny Smith (BROOTHAERTS, VAN NERUM e KEULEMANS, 2004); e o alelo S^4 foi identificado na cultivar Gravenstein, com aproximadamente 280 pb, digerido com a enzima de restrição Taq I, gerando dois fragmentos de 200 e 80 pb. O alelo S^4 foi identificado também em outras cultivares de macieira como na Gloster (BROOTHAERTS, VAN NERUM e KEULEMANS, 2004). Van Nerum et al. (2001) também identificaram o alelo S^{10} na cultivar Prima, caracterizado por um fragmento gerado de 209 pb. O alelo S^6 , de 850 pb, foi designado para o porta-enxerto de macieira Marubakaido (S^6S^{26}), por Agapito-Tenfen et al. (2013).

Mais recentemente, Larsen et al. (2016) desenvolveram um novo protocolo para caracterização do loco S em macieira, utilizando alguns dos iniciadores citados anteriormente e outros iniciadores desenvolvidos especificamente para reações *multiplex* de PCR, com o auxílio de sequenciador de DNA via eletroforese capilar. Foram identificados 25 diferentes alelos em cultivares da espécie *Malus domestica* dinamarquesas e em outras espécies de *Malus* (KIM et al., 2006). Utilizaram um iniciador *forward* padrão, o ASPF3 e um iniciador *reverse* desenvolvido por esses autores, o "EIIWPN-R", sendo que o amplificado gerado engloba a maioria dos alelos descritos, e a diferenciação dos alelos S foi realizada mediante digestão dos fragmentos por enzimas de restrição específicas (LARSEN et al., 2016). Além disso, para alelos como o S^3 , o S^5 e o S^{10} esses autores desenvolveram iniciadores específicos, já que os demais iniciadores utilizados até então não foram capazes de identificá-los com acurácia.

Os marcadores de DNA capazes de identificar alelos S específicos possivelmente presentes em cultivares desenvolvidas no Brasil estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Relação de alelos S de macieira possivelmente presentes em cultivares desenvolvidas e produzidas no Brasil e seus respectivos números de registro no GeneBank, cultivares referência e referências. (Continua)

Alelo S	Nº no GeneBank	Cultivar referência	Referências
S^1	D50837	Fuji (S^1S^9)	Sassa et al. (1996)
S^2	U12199	Golden Delicious (S^2S^3)	Broothaerts et al. (1995)
S^3	U12200	Golden Delicious (S^2S^3)	Broothaerts et al. (1995)
S^4	AF327223	Gloster (S^4S^{19})	Van Nerum et al. (2001)

Tabela 2 - Relação de alelos S de macieira possivelmente presentes em cultivares desenvolvidas e produzidas no Brasil e seus respectivos números de registro no GeneBank, cultivares referência e referências. (Conclusão)

Alelo S	Nº no GeneBank	Cultivar referência	Referências
S ⁵	U19791	Gala (S ² S ⁵)	Janssens et al. (1995)
S ⁶	-	-	Agapito-Tenfen et al. (2013)
S ⁷	AB032246	Idared (S ³ S ⁷)	Janssens et al. (1995); Kitahara et al. (2000)
S ⁹	D50836	Fuji (S ¹ S ⁹)	Janssens et al. (1995); Sassa et al. (1996)
S ¹⁰	AB052683	McIntosh (S ¹⁰ S [?])	Richman, Broothaerts e Kohn (1997); Kitahara e Matsumoto (2002); Van Nerum et al. (2001)
S ¹⁹	AB035273	Delicious (S ⁹ S ¹⁹)	Matsumoto e Kitahara (2000)
S ²⁰	AB019184	Mutsu (S ² S ³ S ²⁰)	Matsumoto et al. (1999)
S ²²	AF327222	Alkmene (S ⁵ S ²²)	Van Nerum et al. (2001)
S ²³	AF239809	Granny Smith (S ³ S ²³)	Schneider et al. (2001)
S ²⁴	AF016920	Braeburn (S ⁹ S ²⁴)	Kitahara et al. (2000); Verdoodt et al. (1998)
S ²⁶	AF016918	Baskatong (S ¹⁶ S ²⁶)	Verdoodt et al. (1998)

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de marcadores de DNA permite conhecer antecipadamente o genótipo do loco S, e assim possibilita a seleção *a priori* das plantas completamente compatíveis, potencializando o uso adequado dos diferentes genótipos em pesquisas relacionadas ao melhoramento genético de macieira e a compatibilidade de genótipos em pomares comerciais.

Atualmente existem 25 alelos S já caracterizados em genótipos de macieira no mundo todo, para os quais a identificação é possível pela utilização dos respectivos conjuntos de iniciadores via técnica de PCR, sendo essa uma alternativa viável a ser utilizada na rotina dos programas de melhoramento genético.

Na prática, a utilização dos marcadores de DNA pode viabilizar a definição de combinações entre diferentes cultivares (ou seleções de interesse) para os experimentos de hibridações, que representam a etapa inicial do processo de melhoramento genético. Além disso, apresentam elevada importância no sentido de gerar informações para a identificação de genótipos que podem servir como

polinizadores em pomares comerciais, considerando que a total compatibilidade entre cultivar copa e polinizadora é um fator determinante para a produção de frutos de qualidade.

CAPÍTULO 2 - Validação do uso de marcadores de DNA na genotipagem de alelos S em populações segregantes de macieira

RESUMO

A autoincompatibilidade gametofítica é um mecanismo reprodutivo característico de diversas famílias vegetais, entre elas a família Rosaceae que engloba as espécies do gênero *Malus*. Esse mecanismo exige a polinização cruzada entre plantas compatíveis para que ocorra a reprodução, sendo controlado por um único loco multialélico chamado de loco S. Para identificar os alelos S componentes do genótipo da macieira sugere-se a utilização marcadores de DNA alelo-específicos. Contudo, esses marcadores devem estar intimamente ligados aos respectivos alelos para que não haja resultados falsos, positivos ou negativos. O objetivo deste trabalho foi determinar a segregação dos alelos S utilizando marcadores de DNA, em populações segregantes previamente formadas, para avaliar a competência de segregação esperada dos marcadores conjuntamente aos respectivos alelos S com base na genealogia das populações. Para a identificação dos alelos S via PCR foram utilizados conjuntos de iniciadores específicos para 16 alelos S e duas populações segregantes resultantes do cruzamento entre Fred Hough vs. Monalisa e entre M-11/01 vs. M-13/91. As segregações esperadas foram: 1:1:1:1 para compatibilidade completa e 1:1 para semicompatibilidade, sendo comparadas com os dados obtidos utilizando o teste de χ^2 . A progênie do cruzamento totalmente compatível entre Fred Hough (S^5S^{19}) vs. Monalisa (S^2S^{10}) apresentou a proporção esperada de segregação para os alelos S de 1:1:1:1, identificando-se a presença de dois genótipos triploides. No cruzamento entre M-11/01 (S^3S^5) vs. M-13/91 (S^3S^5) não era esperada a formação de frutos pois ambos os genitores apresentaram o mesmo par de alelos S, caracterizando a incompatibilidade entre os genótipos. Entretanto, houve a formação de descendentes nesse cruzamento e sugere-se que isso tenha ocorrido pela quantidade elevada de pólen aplicado sobre o estigma do genitor feminino na polinização artificial, compensando a existência de incompatibilidade entre os genótipos. Considerando os resultados obtidos nas duas populações segregantes avaliadas, a segregação dos marcadores de DNA para os alelos S^2 , S^3 , S^5 , S^{10} e S^{19} ocorre conjuntamente com os seus respectivos alelos S, sendo considerados eficientes para identificação dos mesmos.

Palavras-chave: Série alélica S. *Malus domestica* Borkh. Segregação. Melhoramento genético de macieira.

ABSTRACT

Gametophytic self-incompatibility is a reproductive mechanism characteristic of several plant families, among them the Rosaceae that includes the species of the genus *Malus*. This mechanism requires cross-pollination between compatible plants for reproduction and is controlled by a single multiallelic loci called locus S. To identify the S alleles components of the apple genotype, it is suggested to use allele-specific DNA markers. However, these markers must be closely linked to the respective alleles. The objective of this work was to determine the segregation of the S alleles using DNA markers in previously formed segregant populations to evaluate the expected segregation competence of the markers together with the respective S alleles based on the genealogy of the populations. For the identification of the S

alleles via PCR, specific sets of primers were used for 16 S alleles and two segregating populations resulting from the crossing between Fred Hough vs. Monalisa and between M-11/01 Vs. M-13/91. The expected segregations were: 1: 1: 1: 1 for complete compatibility and 1: 1 for semi-compatibility, compared to data obtained using the X^2 test. The crossbred progeny fully compatible between Fred Hough (S^5S^{19}) vs. Monalisa (S^2S^{10}) presented the expected proportion of segregation for the S alleles of 1: 1: 1: 1, identifying the presence of two triploid genotypes. In the another crossing, between M-11/01 (S^3S^5) vs. M-13/91 (S^3S^5) fruit formation was not expected since both parents had the same pair of S alleles, characterizing the incompatibility between the genotypes. However, there was plant formation and it is suggested that this occurred due to the high amount of pollen applied on the stigma of the female parent in artificial pollination, compensating for the existence of the incompatibility among the genotypes. Considering the results obtained in the two segregating populations evaluated, the segregation of the DNA markers for the S^2 , S^3 , S^5 , S^{10} and S^{19} alleles occurs together with their respective S alleles, being considered efficient to identify them.

Key words: Allele S. *Malus domestica* Borkh. Segregation. Apple breeding.

2.1 INTRODUÇÃO

A autoincompatibilidade gametofítica está presente no processo reprodutivo de diversas espécies, entre elas na *Malus domestica* Borkh. (BROOHAERTS, 2003). O controle da autoincompatibilidade é feito pelos genes do loco multialélico S, localizado na porção terminal do cromossomo 17 (YAMAMOTO et al., 2002; DE FRANCESCHI et al., 2011; DE FRANCESCHI et al., 2016). Cada alelo é responsável pela produção de uma proteína, apresentando comportamento codominante (RAMALHO et al., 2012; BATLE, ALSTON e EVANS, 1995; LI et al., 2012).

O mecanismo da autoincompatibilidade é tão eficiente quanto a dioicia na obrigatoriedade da ocorrência de fecundação cruzada entre plantas, auxiliando na ampliação da variabilidade genética (ALLARD, 1971). A maior vantagem é permitir que todas as plantas produzam sementes e contribuam diretamente para a propagação da espécie, o que não acontece com plantas dioicas ou macho-estéreis (BATLE, ALSTON e EVANS, 1995; SCHIFINO-WITTMANN e DALL'AGNOL, 2002).

Atualmente, para a identificação dos alelos S das plantas utilizam-se marcadores de DNA alelo-específicos ou microssatélites. Contudo, tanto os marcadores alelo-específicos quanto os microssatélites devem estar ligados aos respectivos alelos S os quais identificam para serem considerados eficientes (FERREIRA e GRATTPAGLIA, 1995). Quando o marcador é adaptado a uma região distante do gene de interesse, podem ocorrer distorções na frequência esperada dos

alelos nas populações segregantes, ou até mesmo, o marcador pode não segregar junto com o respectivo alelo, ocasionando resultados falsos negativos ou positivos.

Em cruzamentos de indivíduos semicompatíveis, o padrão esperado de segregação dos alelos S nas progênies segue a proporção 1:1 (BATLE, ALSTON e EVANS, 1995; DE FRANCESCHI et al., 2016; CHOI, TAO e ANDERSEN, 2002). Isso ocorre pois, teoricamente, o grão de pólen portador do alelo S comum ao tecido diploide do pistilo sofre abortamento quando em contato com as S-RNases do pistilo (MATSUMOTO, 2014; DE FRANCESCHI et al. 2016). Já no cruzamento entre plantas que apresentem compatibilidade total, ou seja, todos os alelos S diferentes entre si, a expectativa do padrão de segregação nas progênies segue a proporção 1:1:1:1 (RAMALHO et al., 2012; BATLE, ALSTON e EVANS, 1995; AGAPITO-TENFEN et al., 2015). Em cruzamentos entre plantas incompatíveis, teoricamente, ocorre o abortamento de todos os grãos de pólen, não permitindo a formação de sementes viáveis.

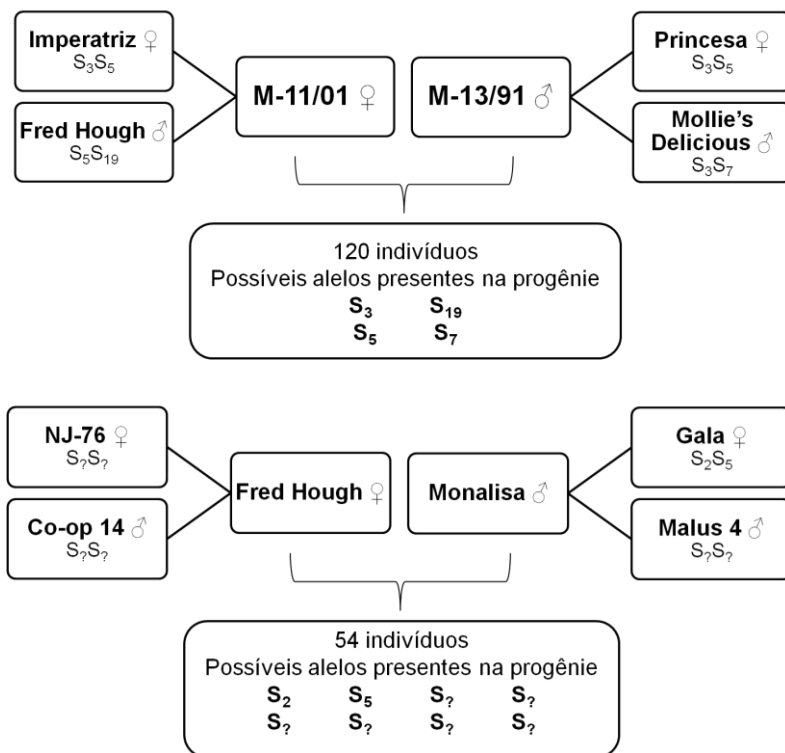
Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar a segregação dos alelos S via identificação por marcadores de DNA em populações segregantes previamente formadas, avaliando a competência de segregação dos marcadores juntamente com os respectivos alelos S esperados com base na genealogia dos respectivos genitores.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos genéticos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Epagri - Estação Experimental de Caçador (EECd), em Caçador-SC.

Para o estudo da segregação dos alelos S em macieira utilizou-se duas populações já estabelecidas em pomar experimental localizado na EECd da Epagri de Caçador. As duas populações foram originadas de cruzamentos dirigidos realizados no ano de 2007 entre as cultivares Fred Hough e Monalisa e entre as seleções M-11/01 e M-13/91, sendo que os genitores também constituíram o conjunto de genótipos avaliados (Figura 3).

Figura 3 - Populações avaliadas e possíveis alelos S presentes na progênie considerando as respectivas genealogias e o padrão de segregação característico no gênero *Malus* spp.



Fonte: Programa de Melhoramento Genético da Macieira, Epagri – Estação Experimental de Caçador-SC, 2016.

Levando em consideração a genealogia dos respectivos genitores das populações segregantes, alguns alelos possivelmente presentes nas duas progênes são apresentados na Figura 3. Os alelos S identificados nos genitores foram contrastados com o genótipo dos indivíduos componentes das respectivas populações segregantes, considerando a segregação teórica esperada: 1:1:1:1 para genótipos completamente compatíveis, 1:1 para genótipos semicompatíveis, e ausência de progênie no cruzamento incompatível.

Folhas jovens e sadias dos genitores e de cada genótipo das duas populações segregantes foram coletadas aleatoriamente, acondicionadas em pacotes plásticos e armazenadas em freezer a -20 °C até o momento da realização da extração de DNA. A extração de DNA foi realizada com o protocolo proposto por Lefort e Douglas (1999), com modificações propostas por Revers et al. (2005), utilizando 0,1 g de tecido vegetal macerado de cada amostra.

Cada reação padrão de PCR teve em sua concentração final 1 U de Taq DNA polimerase (Platinum® - Invitrogen); tampão da enzima 1x; 2,00 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs; 1 µM de cada iniciador (*forward* e *reverse*) e 50 ng de DNA genômico. Foram testados 18 iniciadores referentes aos 16 alelos mais comumente identificados em cultivares de macieiras desenvolvidas no Brasil (Tabela 3).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador T100™ BioRad® com a seguinte configuração: 3 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), seguido por 30 ciclos, compostos pelas etapas de desnaturação (94 °C por 1 minuto), pareamento (45-60 °C, dependendo das características dos iniciadores, conforme Tabela 3, por 1 minuto) e extensão (72 °C por 1 minuto), seguindo-se de uma etapa final de extensão (72 °C por 7 minutos), mantendo-se a temperatura fixa em 4 °C após a finalização do processo de amplificação. Para a discriminação dos alelos S⁴, S¹⁶ e S²², parte dos produtos amplificados na PCR (10 µL) foi digerida pela enzima de restrição Taq I (por 1 h, à 65 °C). Da mesma forma, para a discriminação do alelo S²⁰, 10 µL do produto amplificado na PCR foram digeridos pela enzima de restrição Nar I (por 4 h, à 37 °C). Para os iniciadores S¹⁰ modificado e S³/S⁵/S¹⁰ as configurações das reações de amplificação e a digestão por enzimas de restrição estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Sequência de nucleotídeos de cada iniciador e condições de PCR específicas para cada alelo S testado. (Continua)

Alelo	Iniciadores	Sequências (5' -> 3')	Temperatura de pareamento °C	Fragmento amplificado (pb)
S ¹	FTC168 FTC169	ATATTGTAAGGCACCGCCATATCA T GGTTCTGTATTGGGAAGACGCAC AA	60	530
S ²	OWB122 OWB123	GTTCAAACGTGACTTATGCG GGTTTGGTTCCTTACCATGG	60	449
S ³	FTC177 FTC226	CAAACGATAACAAATCTTAC TATATGGAAATCACCATTTCG	55	500
S ⁴	FCT5 OWB249	TCCCACAATACAGAACGAGA CAATCTATGAAATGTGCTCTG	60, Taq I	274 (194+77)
S ⁵	FTC10 FTC11	CAAACATGGCACCTGTGGGTCTCC TAATAATGGATATCATTGGTAGG	59	346
S ⁶	FTC141 FTC142	ATCAGCCGGCTGTCTGCCACTC AGCCGTGCTCTTAATACTGAATAC	58, E 45	850
S ⁷	FTC143 FTC144	ACTCGAATGGACATGACCCAGT TGTCGTTTATTATTGTGGGATGTC	60	302
S ⁹	OWB154 OWB155	CAGCCGGCTGTCTGCCACTT CGGTTTCGATCGAGTACGTTG	62	343
S ¹⁰	FTC12 FTC228	CCAAACGTAATCAATCGAAG ATGTCGTCCCGTGTCTGAATC	60	209
S ¹⁶	FTC5 OWB249	TCCCACAATACAGAACGAGA CAATCTATGAAATGTGCTCTG	60, Taq I	274 (243+31)

Tabela 3 - Sequência de nucleotídeos de cada iniciador e condições de PCR específicas para cada alelo S testado. (Conclusão)

Alelo	Iniciadores	Sequências (5' -> 3')	Temperatura de pareamento °C	Fragmento amplificado (pb)
S ¹⁹	FTC229 FTC230	TCTGGGAAAGAGAGTGGCTC TTTATGAACTTCGTTAAGTCTC	60	304
S ²⁰	FTC141 FTC142	ATCAGCCGGCTGTCTGCCACTC AGCCGTGCTCTTAATACTGAATAC	60, E 45, Nar I	920 (800+120)
S ²²	FTC5 OWB249	TCCCACAATACAGAACGAGA CAATCTATGAAATGTGCTCTG	60, Taq I	274 (199+44+31)
S ²³	FTC222 FTC224	CAATCGAACCAATCATTTGGT GGTGTCATATTGTTGGTACTAATG	60	237
S ²⁴	FTC231 FTC232	AAATATTGCAACGCACAGCA TTGAGAGGATTTCAGAGATG	60	580
S ²⁶	FCT14 FTC9	GAAGATGCCATACGCAATGG TTTAATACCGAATATTGGCG	54	194
* S ¹⁰ modificado		AACAAATCTTAAAGCCCAGC GGTTTCTTATAGTCGATCTTTG	60	-
** S ³ /S ⁵ /S ¹⁰		CAATTTACGCAGCARTATCAG TGTTTTGAATYGAAAATTARTTAGGA GT	58	-

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

NOTAS: E 45 = Extensão de 45 segundos.

Valores entre parênteses se referem ao tamanho de fragmento gerado após a digestão com as respectivas enzimas de restrição

* Iniciador proposto por Kitahara e Matsumoto (2002) para identificação do alelo S¹⁰. Reação de amplificação modificada para: 3 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), seguido por 30 ciclos, compostos pelas etapas de desnaturação (94 °C por 1 minuto), pareamento (60 °C por 1 minuto) e extensão (72 °C por 1 minuto), seguindo-se de uma etapa final de extensão (72 °C por 10 minutos), mantendo-se a temperatura fixa em 4 °C após a finalização do processo de amplificação. Tamanho do fragmento amplificado de 282 pb e quando tratado com a enzima Nar I gera dois fragmentos: 185 e 97 pb.

** Iniciador proposto por Larsen et al. (2016) para identificação dos alelos S³, S⁵ e S¹⁰. Reação de amplificação modificada para: 2 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), seguido por 33 ciclos, compostos pelas etapas de desnaturação (94 °C por 20 segundos), pareamento (58 °C por 20 segundos) e extensão (72 °C por 2 minutos), seguindo-se de uma etapa final de extensão (72 °C por 5 minutos), mantendo-se a temperatura fixa em 4 °C após a finalização do processo de amplificação. Tamanho dos fragmentos amplificados antes e depois do tratamento com a enzima Taq I, respectivamente: S³ = 423 pb, 264 pb; S⁵ = 399 pb, 273 pb; S¹⁰ = 382 pb, não fragmentado pela enzima de restrição.

Após a reação de PCR, os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3%, utilizando o marcador de peso molecular de 50 pb para auxiliar na identificação dos alelos. As amostras foram coradas com o fluoróforo intercalante GelRed®. A leitura do perfil dos fragmentos amplificados foi realizada mediante análise de imagem capturada em fotodocumentador Kodak Geologic 2012 Pró. Foram considerados como presentes os alelos S identificados em cada um dos genótipos quando ocorreram amplificações de fragmentos de tamanho conhecido conforme indicado na literatura, e coincidentes aos fragmentos amplificados em genótipos utilizados como controle padrão para a presença de cada

alelo S, conforme descrito nas Tabelas 3 e 4. A nomenclatura dos alelos S utilizada neste trabalho foi a proposta por Broothaerts, Van Nerum e Keulemans (2004).

Tabela 4 - Cultivares utilizadas como controle positivo para os respectivos alelos S caracterizados molecularmente, e respectivas referências de identificação.

Cultivar referência	Alelo	Nº GeneBank	Referências
Fuji (S^1S^9)	S^1	D50837	Sassa et al. (1996)
Golden Delicious (S^2S^3)	S^2	U12199	Broothaerts et al. (1995)
Golden Delicious (S^2S^3)	S^3	U12200	Broothaerts et al. (1995)
Gloster (S^4S^{19})	S^4	AF327223	Van Nerum et al. (2001)
Gala (S^2S^5)	S^5	U19791	Janssens et al. (1995)
Marubakaido (S^6S^{26})	S^6	-	Agapito-Tenfen et al. (2015)
Idared (S^3S^7)	S^7	AB032246	Janssens et al. (1995); Kitahara et al. (2000)
Fuji (S^1S^9)	S^9	D50836	Janssens et al. (1995); Sassa et al. (1996)
McIntosh ($S^{10}S^{22}$)	S^{10}	AB052683	Richman, Broothaerts e Kohn (1997); Kitahara e Matsumoto (2002); Van Nerum et al. (2001)
Baskatong ($S^{16}S^{26}$)	S^{16}	AF016919	Verdoodt et al. (1998)
Alkmene (S^5S^{22})	S^{22}	AF327222	Van Nerum et al. (2001)
Delicious (S^9S^{19})	S^{19}	AB035273	Matsumoto e Kitahara (2000)
Mutsu ($S^2S^3S^{20}$)	S^{20}	AB019184	Matsumoto et al. (1999)
Granny Smith (S^3S^{23})	S^{23}	AF239809	Schneider et al. (2001)
Braeburn (S^9S^{24})	S^{24}	AF016920	Kitahara et al. (2000); Verdoodt et al. (1998)
Marubakaido (S^6S^{26})	S^{26}	-	Agapito-Tenfen et al. (2015)

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

A segregação dos alelos S genotipados via marcadores de DNA foi avaliada com a aplicação do teste χ^2 , considerando os dados observados na genotipagem das populações segregantes em comparação com a segregação teórica esperada para os alelos S de autoincompatibilidade gametofítica: compatibilidade completa = 1:1:1:1 e semicompatibilidade = 1:1.

A soma total do desvio (valor estimado de χ^2) da proporção observada a partir da razão esperada foi calculada com a seguinte fórmula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(o - e)^2}{e}$$

Sendo:

χ^2 = valor estimado da discrepâncias entre proporções observadas e esperadas;

o = frequência observada para cada classe;

e = frequência esperada para a classe em questão.

O valor estimado de χ^2 foi comparado aos valores de referência críticos nos níveis de probabilidade de $p < 0,05$ (valor $\chi^2 = 3,84$ para semicompatibilidade e 7,82 para compatibilidade total).

Além disso, constatando-se a presença de alelos em comum entre os genitores, realizaram-se testes a campo para a obtenção da taxa de fertilização entre os genitores: autofecundação de ambos os genitores envolvidos e polinização cruzada com cruzamento recíproco dos mesmos, sendo polinizadas 200 flores em cada cruzamento. Após 40 dias de polinização foi avaliado o índice de fertilização de cada cruzamento (pegamento), em unidade.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população resultante do cruzamento entre Fred Hough (S^5S^{19}) e Monalisa (S^2S^{10}) foi composta por 54 plantas. Dessas 54 plantas, 49 apresentaram algum dos genótipos esperados para o cruzamento entre esses dois genitores (S^5S^2 , S^5S^{10} , S^2S^{19} e $S^{10}S^{19}$). Cinco plantas não apresentaram um genótipo esperado para o loco S e duas plantas apresentaram três alelos. A ocorrência de três alelos S sugere a triploidia dessas duas plantas, uma vez que os alelos S identificados foram comuns aos alelos S presentes nos genitores. Os outros três indivíduos apresentaram um alelo diferente aos alelos esperados para essa população: S^5S^9 , S^5S^{19} e $S^{19}S^?$, conforme Tabela 5.

Tabela 5 - Genótipos identificados na progênie de Fred Hough vs. Monalisa.

Fred Hough (S^5S^{19}) vs. Monalisa (S^2S^{10})	
Genótipo identificado na população segregante	Nº de plantas
S^5S^2	13
S^5S^{10}	15
S^2S^{19}	9
$S^{10}S^{19}$	12
$S^2S^5S^{19}$	1
$S^5S^{10}S^{19}$	1
S^5S^9	1
S^9S^{19}	1
$S^{19}S^?$	1
Total	54

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

A ocorrência de indivíduos triploides pode acontecer naturalmente na cultura da macieira, tanto no cruzamento entre híbridos interespecíficos quanto entre indivíduos diploides (BROWN, 2012). Ambos os indivíduos identificados como triploides apresentaram padrão de banda do produto amplificado com tamanho característico dos controles positivos para os três alelos S (Tabela 3). Sendo assim, aceitou-se a existência da triploidia identificada pelo uso de marcadores de DNA.

Para a confirmação, houve a tentativa de análise de ploidia pelo método de citometria (DE SCHEPPER et al., 2001), porém devido ao alto conteúdo fenólico das folhas da macieira há a rápida oxidação quando não mantidas abaixo de 4 °C, o que impossibilitou o envio dos materiais para análise. Outra opção para a confirmação da triploidia era a montagem do cariótipo dos indivíduos. Para a realização do cariótipo há a necessidade de células em plena divisão, podendo ser obtidas tanto de primórdios radiculares quanto de células em desenvolvimento na formação grãos de pólen (PARK et al., 2012; DAR, WANI e DHAR 2015). Entretanto, não se obteve êxito na análise das flores, pois nos diferentes estádios fenológicos testados os grãos de pólen já estavam formados, impossibilitando a contagem dos cromossomos. Já para a utilização de primórdios radiculares, não poderiam ser utilizadas radículas diretamente de sementes dos frutos das respectivas plantas pois esses já evidenciariam a segregação dos alelos S. Por esse motivo, realizou-se a tentativa de enraizamento das estacas da plantas por indução com ácido indolbutírico (2000 ppm) em substrato contendo vermiculita e areia 1:1, porém não houve desenvolvimento de raízes.

Outro fato importante a ser levado em consideração é que ambos os genótipos triploides herdaram os dois alelos do genitor feminino, ou seja, possivelmente o óvulo era um gameta $2n$. Esse resultado coincide com o encontrado por Sakurai, Brown e Weeden (2000), Janssens et al. (1995) e Sassa et al. (1994) que identificaram o genitor materno como doador do gameta $2n$ (gameta não reduzido) em diferentes cruzamentos realizados entre genitores diploides dos quais originaram-se descendentes triploides.

Quanto aos três demais genótipos (S^5S^9 , S^9S^{19} e S^1S^2), esses provavelmente são resultantes de contaminação cruzada durante o processo de desenvolvimento dos *seedlings*, por motivo de troca de sementes, ou contaminação por pólen não correspondente ao genitor do cruzamento.

Para as plantas que apresentaram genótipos esperados baseados nos alelos S presentes nos genitores Fred Hough e Monalisa, a frequência de cada genótipo e o teste de χ^2 estão apresentados na Tabela 6. A distribuição dos indivíduos entre os genótipos do loco S possíveis para essa população seguiu a proporção esperada para o cruzamento de genótipos completamente compatíveis: 1:1:1:1.

Tabela 6 - Segregação genotípica da progênie do cruzamento entre as cultivares Fred Hough (S^5S^{19}) e Monalisa (S^2S^{10}).

Fred Hough (S^5S^{19}) vs. Monalisa (S^2S^{10})			
Genótipo da progênie	Frequência observada	Frequência esperada 1:1:1:1	χ^2
S^5S^2	13	12,25	1.53 ^{ns}
S^5S^{10}	15	12,25	
S^2S^{19}	9	12,25	
$S^{10}S^{19}$	12	12,25	
Total	49		

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

No segundo cruzamento avaliado, entre as seleções M-11/01 e M-13/91, ambos os genitores foram caracterizados como S^3S^5 . Teoricamente, o cruzamento entre plantas que apresentem o mesmo par de alelos S não é possível devido ao mecanismo de autoincompatibilidade gametofítica (RAMALHO et al., 2012; BATLE, ALSTON e EVANS, 1995; BROOThAERTS et al., 1995; VAN NERUN et al., 2001; MATSUMOTO, 2014; DE FRANCESCHI et al., 2016). Contudo, o cruzamento entre M-11/01 e M-13-91 resultou na formação de descendentes, sendo identificados quatro genótipos diferentes na população: S^3S^5 , S^5S^{19} , S^5S^{10} e $S^5S^?$ (Tabela 7).

Tabela 7 - Segregação genotípica da progênie do cruzamento entre as cultivares M-11/01 (S^3S^5) e M-13/91 (S^3S^5).

Genótipo	Frequência observada
S^3S^5	66
S^5S^{19}	49
S^5S^{10}	2
$S^5S^?$	3
Total	120

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

Acredita-se que a presença dos genótipos S^5S^{19} , S^5S^{10} e $S^5S^?$ nessa população seja resultante de contaminação cruzada durante o processo de desenvolvimento dos híbridos, em função da possível contaminação com pólen indesejado, ou troca de sementes entre diferentes cruzamentos na semeadura, ou ainda troca de *seedlings* no momento do plantio. Mesmo com um número elevado de indivíduos apresentando alelos S adversos aos alelos S dos genitores do cruzamento (54 no total), há grande possibilidade de ter acontecido algum dos tipos de contaminação cruzada citados anteriormente devido ao alto número de populações segregantes que estavam sendo conduzidas no mesmo ano pela equipe do Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri: foram realizados aproximadamente 3300 cruzamentos, resultando em 23550 sementes e 11220 *seedlings* para transplantar para o campo.

O reconhecimento de plantas que não são descendentes do cruzamento inicialmente considerado por meio da identificação dos alelos S via marcadores de DNA e técnica de PCR corrobora com os resultados de Choi, Tao e Andersen (2002) e com Sakurai, Brown e Weeden (2000), indicando a possibilidade de utilizar os marcadores de DNA para os alelos S como uma forma de caracterização básica para confirmar a descendência de genótipos de macieira em relação aos possíveis pais.

Quanto aos 66 indivíduos identificados como S^3S^5 , era esperado inicialmente que o cruzamento entre genótipos que expressem o mesmo par de alelos S não apresentasse a formação de frutos (SAKURAI, BROWN e WEEDEN, 2000). Entretanto, como os cruzamentos são realizados manualmente, o volume (número) de grãos de pólen depositados sobre o estigma das plantas é maior do que ocorre naturalmente, podendo causar resultados adversos aos que são esperados teoricamente (YAMANE e TAO, 2009). Exemplo disso ocorre quando são realizados testes de polinização artificial e não são encontradas diferenças significativas na frutificação de cruzamentos entre indivíduos compatíveis e semicompatíveis, porém, quando levados em consideração testes realizados com genótipos de polinização aberta, há diminuição significativa da produção de frutos em casos de semicompatibilidade e ausência de formação de frutos na incompatibilidade (SCHNEIDER, STERN e GOLDWAY, 2005; HEO et al., 2012).

Todavia, para averiguar se o cruzamento entre M-11/01 vs. M-13/91 realmente resultou na formação de descendentes (já que ambos apresentaram o

mesmo genótipo do loco S e a formação de descendentes entre plantas portadoras do mesmo par de alelos S não é teoricamente possível) realizaram-se os cruzamentos teste a campo, como previamente descritos no item 2.2.

Na Tabela 8, estão apresentados os resultados dos quatro cruzamentos realizados: autofecundação das seleções M-11/01 e M-13/91, cruzamento entre ambas e seu recíproco.

Tabela 8 - Cruzamentos realizados entre as seleções M-13/91 e M-11/01, número de flores polinizadas e número de frutos formados após 40 dias.

Genitores		Nº de flores polinizadas	Nº de frutos formados	Pegamento (%)
Estigma ♀	Pólen ♂			
M-13/91	M-11/01	200	5	2,5
M-13/91	M-13/91	200	0	0
M-11/01	M-13/91	200	7	3,5
M-11/01	M-11/01	200	0	0

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

As duas autofecundações não resultaram na formação de frutos. Já no cruzamento entre M-13/91 (♀) vs. M-11/01 (♂) obteve-se cinco frutos (2,5 % de pegamento), sendo que o seu recíproco resultou na formação sete frutos (3,5 % de pegamento).

Como houve produção de frutos tanto no cruzamento entre M-13/91 (♀) vs. M-11/01 (♂) quanto em seu recíproco, a avaliação da formação de sementes nos mesmos é imprescindível para a verificação de ausência de partenocarpia. A partenocarpia é caracterizada pela formação de frutos sem fecundação dos óvulos, resultando na ausência de sementes ou na existência de sementes estéreis. Na macieira, há uma pequena possibilidade (~5 %) da formação de frutos ocorrer por partenocarpia em algumas cultivares, não havendo participação de pólen (HEGEDÜS, 2006). A formação de sementes viáveis nos frutos resultantes dos cruzamentos testes indica que houve fecundação do (s) óvulo (s) mesmo na presença de ambos os alelos S em comum ou a ocorrência de contaminação cruzada por pólen de outro genótipo.

Em caso de formação de sementes nos frutos, a genotipagem do loco S desses descendentes pode evidenciar a presença dos mesmos alelos S dos pais, o que teoricamente não seria possível devido ao mecanismo de autoincompatibilidade gametofítica. A formação de descendentes entre genitores portadores do mesmo par

de alelos S já foi evidenciada por Yamane e Tao (2009) em cruzamentos testes entre as cultivares Megumi vs. Kinsei e Megumi vs. Redogold, sendo que houve frutificação com formação de sementes nos dois cruzamentos e em seus recíprocos.

2.4 CONCLUSÃO

1. O cruzamento entre indivíduos compatíveis resultou na segregação teórica esperada para os alelos S dos genitores, formando genótipos diferentes na proporção 1:1:1:1.

2. O cruzamento entre indivíduos incompatíveis por meio de polinização artificial possibilitou a formação de frutos, indo de encontro ao esperado teoricamente, quando o cruzamento de indivíduos portadores do mesmo par de alelos não resultaria na formação de frutos.

3. Os respectivos marcadores de DNA para o loco S são eficientes para a genotipagem dos alelos S^2 , S^5 , S^{10} e S^{19} em macieira.

CAPÍTULO 3 - IDENTIFICAÇÃO DOS ALELOS S, CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E DISSIMILARIDADE ENTRE GENÓTIPOS ELITE DE MACIEIRA

RESUMO

O melhoramento genético de macieira é um processo difícil e demorado devido ao ciclo de desenvolvimento longo da cultura, ao grande número de avaliações realizadas e à autoincompatibilidade gametofítica característica do gênero *Malus*. A identificação dos alelos S determinantes da autoincompatibilidade pode ser realizada com a utilização de marcadores de DNA específicos via técnica de PCR. Já por meio da caracterização morfoagronômica baseada nos descritores necessários para proteção de novas cultivares, pode-se estimar a dissimilaridade entre os genótipos para que sejam utilizados com maior eficiência na formação de populações segregantes com maior variabilidade. Os objetivos desse trabalho foram caracterizar morfoagronomicamente os genótipos utilizados como genitores em cruzamentos dirigidos, constituintes da coleção de germoplasma elite de macieira da Epagri/Estação Experimental de Caçador, e identificar os alelos S do mesmo conjunto de genótipos por meio de marcadores de DNA. Para a caracterização morfoagronômica foram utilizados os 57 descritores mínimos determinados pelo MAPA para proteção de novas cultivares, sendo que a estimativa da matriz de distância genética foi gerada com o algoritmo de Gower e os agrupamentos dos acessos foram obtidos pelo método UPGMA. Para a identificação dos alelos S presentes nos genótipos via PCR, foram utilizados iniciadores para os 16 alelos S mais comumente encontrados em genótipos cultivados no Brasil. A dissimilaridade média dentro do conjunto de genótipos avaliados foi de 35 %, sendo gerados sete grupos, dos quais cinco apresentaram apenas um indivíduo, um grupo apresentou dois indivíduos e o sétimo grupo foi formado pelos demais 21 genótipos. Já na genotipagem do loco S, foram identificados nove alelos S diferentes no conjunto dos 28 genótipos avaliados, sendo que apenas dois genótipos (Kinkas - S⁹S⁷, e 141/38 - S²S⁷) não tiveram ambos os alelos caracterizados. Com base nas cinco maiores dissimilaridades estimadas entre os genótipos e na total compatibilidade entre os mesmos, foram sugeridos 15 cruzamentos a fim de ampliar a variabilidade genética no Programa de Melhoramento Genético da Epagri. Portanto, com a utilização de marcadores de DNA pode identificar o genótipo do loco S em macieira, possibilitando a determinação prévia de genitores contrastantes e completamente compatíveis para hibridações artificiais.

Palavras-chave: *Malus domestica* Borkh. Autoincompatibilidade gametofítica. S-RNases. Descritores morfoagronômicos. Melhoramento genético de macieira.

ABSTRACT

The apple breeding is a difficult and time-consuming process due to the long development cycle of the crop, the large number of evaluations performed and the gametophytic self-incompatibility characteristic of the genus *Malus*. The self-incompatibility is determinate by S alleles and they can be identification using specific DNA markers via the PCR technique. Already by the morfoagronomic characterization based on the descriptors necessary for protection of new cultivars, it is possible to estimate the dissimilarity among the genotypes to be used with greater

efficiency in the formation of segregating populations with greater variability. The objectives of this work were to characterize morphoagronomically the genotypes used as parents in hybridizations in the Epagri, and to identify the S alleles of the same set of genotypes by DNA markers. For the morphoagronomic characterization, the 57 minimum descriptors determined by MAPA to protect new cultivars were used, and the genetic distance matrix estimation was generated with the Gower algorithm and the groupings of the accessions were obtained by the UPGMA method. For the identification of the S alleles present in the genotypes, primers were used for the 16 S alleles most commonly found in genotypes grown in Brazil. The mean dissimilarity within the set of genotypes evaluated was 35 %, with seven groups being generated, of which five presented only one individual, one group presented two individuals and the seventh group was formed by the remaining 21 genotypes. In the locus S genotyping, nine different S alleles were identified in the set of 28 evaluated genotypes. Only two genotypes (Kinkas - S⁹S⁷, and 141/38 - S²S⁷) did not have both alleles characterized. Based on the five major dissimilarities estimated among the genotypes and the total compatibility between them, 15 crosses were suggested in order to increase the genetic variability in the Apple Breeding Program of Epagri. Therefore, with the use of DNA markers, it is possible to identify the genotype of loco S in apple tree, making possible the prior determination of contrasting and completely compatible genomes for artificial hybridizations.

Keywords: *Malus domestica* Borkh. Gametophytic self-incompatibility. S-RNases. Morphoagronomic descriptors. Apple breeding.

3.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas cultivares de macieira (*Malus domestica* Borkh.) requer pelo menos doze anos de pesquisas e avaliações seguindo os procedimentos característicos do melhoramento clássico, que partem da escolha de genitores e da realização de cruzamentos dirigidos (KVITSCHAL et al., 2013).

Os cruzamentos dirigidos são realizados de acordo com as características de interesse presentes nos genitores em relação à adaptação ao clima, tolerância à doenças, qualidade de frutos e produção. Contudo, os genótipos desenvolvidos nos últimos anos pelos programas de melhoramento descendem de um pequeno *pool* gênico e tendem a apresentar alto grau de parentesco entre si, o que tem restringido as possibilidades de combinações para hibridações, já que a macieira apresenta o sistema de autoincompatibilidade gametofítica (AIG) (KVITSCHAL e DENARDI, 2011; HANCOCK et al., 2008).

A AIG é a incapacidade de uma planta fértil, que apresenta gametas masculinos e femininos viáveis com flores aptas à fecundação, em produzir zigotos após a autofecundação ou polinização entre indivíduos que evidenciam alelos S em comum (ALLARD, 1971; DE NETTANCOURT, 1977). O loco S é o responsável pela

determinação da autoincompatibilidade, sendo que o tubo polínico só irá se formar e concretizar a fecundação se o alelo S presente no grão de pólen não estiver presente no tecido diploide do estilete (SCHIFINO-WITTMANN e DALL'AGNOL, 2002). Esse fator exige que sejam realizados cruzamentos entre indivíduos geneticamente distintos, ou mesmo interespecíficos, para se obter o máximo de indivíduos possíveis no cruzamento (KVITSCHAL e DENARDI, 2011).

Nos últimos anos, com a expansão das pesquisas em diversas áreas do melhoramento genético de macieira, desenvolveu-se um grande interesse por encontrar marcadores moleculares altamente polimórficos que abrangessem todo o genoma da macieira (PATOCCHI et al., 2009). Dentre esses marcadores, incluem-se os marcadores de DNA para o loco S. Nesse sentido, identificar o genótipo do loco S permite conhecer a distribuição dos alelos S entre os genótipos contemplados nos cruzamentos dirigidos e direcionar as hibridações para que sejam realizadas entre genótipos compatíveis (MATSUMOTO et al., 1999; YAMANE e TAO, 2009; HALÁSZ et al., 2011; TAMURA et al., 2000).

Todavia, a caracterização de cultivares de macieira e a distinção entre novas cultivares desenvolvidas pelo melhoramento genético é tradicionalmente baseada em descritores agronômicos, contemplando características morfológicas da planta que são avaliados por meio da comparação com cultivares padrões (JACKSON, 2003). No caso da legislação brasileira, os descritores necessários para a proteção de novas cultivares frutíferas de macieira e as cultivares padrões a serem adotadas nas comparações são definidas pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares - SNPC, as quais foram publicadas em 2000 e atualizadas em 2012 (MAPA, 2012). Esses descritores são utilizados para o estudo da diversidade genética entre os acessos de uma cultura, possibilitando a identificação de genótipos similares ou sobrepostos, ou aqueles mais distantes geneticamente. Os descritores também são importantes quando se busca a ampliação da variabilidade genética, pois os genótipos caracterizados como mais distantes geneticamente são recomendados para formação de populações segregantes (SCAPIM et al., 1999).

Grande parte dos estudos sobre a diversidade genética nas mais diversas espécies são possíveis com o uso de descritores morfoagronômicos qualitativos, tanto binários quanto multicategórico que geram medidas de dissimilaridade (CRUZ et al., 2011). Todavia, são poucos os trabalhos em que se analisam caracteres quantitativos conjuntamente com variáveis qualitativas, possibilitando o acréscimo

de informações para gerar uma única matriz de dissimilaridade representativa. Existem diversas opções para a análise de diversidade genética que geram uma única matriz de dissimilaridade, levando em consideração se as variáveis são quantitativas ou qualitativas de diferentes tipos, porém, atualmente o mais explorado é o algoritmo de Gower (GOWER, 1971). Com o uso do algoritmo de Gower, essa diferença entre os caracteres avaliados é levada em conta para a geração da matriz de dissimilaridade, possibilitando a inferência mais adequada para as análises.

Neste cenário, os objetivos desse trabalho foram caracterizar morfoagronomicamente e identificar os alelos S de genótipos constituintes da Coleção de Germoplasma Elite de Macieira da Epagri/Estação Experimental de Caçador e, considerando a dissimilaridade e a compatibilidade entre os genótipos, sugerir cruzamentos para o Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 DESCRITORES MORFOAGRONÔMICOS

Foram caracterizados 28 genótipos corriqueiramente utilizados no Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri, apresentados na Tabela 9, quanto aos 57 descritores morfoagronômicos determinados pelo MAPA para a proteção de novas cultivares de macieira frutíferas, conforme Tabela 10 e Anexo 1.

Esses genótipos fazem parte da Coleção de Germoplasma Elite de Macieira da Estação Experimental da Epagri de Caçador, localizada à 26°49'5" de latitude Sul, 50°59'12" de longitude Oeste, e altitude média de 940 m na região Meio-oeste de Santa Catarina. A precipitação pluvial média anual é de aproximadamente 1700 mm, com média histórica de acúmulo de frio hibernar ($< 7,2^{\circ}\text{C}$) de 529,9 horas ano⁻¹ (Epagri/Ciram, 2016).

As avaliações ocorreram durante o ciclo vegetativo 2015/2016. Exemplares de todos os genótipos avaliados se encontram em cultivo a campo na Estação Experimental de Caçador, em Caçador-SC, sobre porta-enxerto Marubakaido e interenxerto de M-9, com espaçamento de 3,5 m entre filas e 1,7 m entre plantas. Foram avaliadas cinco plantas de cada um dos genótipos, seguindo as

recomendações do MAPA para caracterização de plantas resultantes de cruzamentos.

Tabela 9 - Genótipos utilizados nos cruzamentos dirigidos do Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri, em Caçador-SC, e seus respectivos genitores e alelos S.

Genótipo	Genitor feminino ♀	Genitor masculino ♂	Genótipo	Genitor feminino ♀	Genitor masculino ♂
SCS426 Venice	Baronesa (S^3S^9)	Imperatriz (S^3S^5)	M-58/07	Imperatriz (S^3S^5)	Baronesa (S^3S^9)
M-21/08	M-47/94 (S^2S^2)	Princesa (S^3S^5)	M-10/09	Imperatriz (S^3S^5)	Cripps Pink (S^2S^{23})
M-1/07	M-47/94 (S^2S^2)	Princesa (S^3S^5)	M-13/00	Imperatriz (S^3S^5)	Fred Hough (S^5S^{19})
M-23/07	M-46/94 (S^5S^{19})	M-13/91 (S^3S^5)	M-11/00	Imperatriz (S^3S^5)	Fred Hough (S^5S^{19})
SCS425 Luiza	Imperatriz (S^3S^5)	Cripps Pink (S^2S^{23})	SCS416 Kinkas	Fuji (S^1S^9)	PWR37T133 (S^3S^5)
M-11/92	M-41 (S^2S^2)	Gala (S^2S^5)	SCS427 Elenise	Imperatriz (S^3S^5)	Cripps Pink (S^2S^{23})
M-13/91	Princesa (S^3S^5)	Mollie's Delicious (S^3S^7)	SciFresh	Braeburn (S^9S^{24})	Royal Gala (S^2S^5)
M-12/00	Imperatriz (S^3S^5)	Fred Hough (S^5S^{19})	M-44/08	Imperatriz (S^3S^5)	Catarina (S^1S^{19})
M-9/07	M-46/94 (S^5S^{19})	Imperatriz (S^3S^5)	M-1/02	Imperatriz (S^3S^5)	Fred Hough (S^5S^{19})
M-11/01	Imperatriz (S^3S^5)	Fred Hough (S^5S^{19})	M-4/09	Imperatriz (S^3S^5)	Catarina (S^1S^{19})
M-3/02	Imperatriz (S^3S^5)	Fred Hough (S^5S^{19})	141/38	Baronesa (S^3S^9)	Polinização livre (S^3S^5)
SCS417 Monalisa	Gala (S^2S^5)	Malus 4 (S^2S^2)	M-53/08	Imperatriz (S^3S^5)	Catarina (S^1S^{19})
M-8/01	Imperatriz (S^3S^5)	Fred Hough (S^5S^{19})	Fred Hough	NJ-76 (S^3S^5)	Coop-14 (S^3S^5)
M-15/01	Imperatriz (S^3S^5)	Fred Hough (S^5S^{19})	Cripps Pink	Golden Delicious (S^2S^3)	Lady William (S^3S^5)

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

Tabela 10 - Descritores morfoagronômicos determinados pelo MAPA para proteção de novas cultivares.

Característica	Característica	Característica
1. Planta: vigor	20. Flor: diâmetro com as pétalas estendidas e posicionadas horizontalmente	39. Fruto: distribuição da coloração superficial
2. Planta: tipo	21. Flor: arranjo das pétalas	40. Fruto: largura das estrias
3. Somente cultivares com plantas tipo ramificado: Planta: hábito	22. Flor: posição dos estigmas em relação às anteras	41. Fruto: área de "russeting" na cavidade peduncular
4. Planta: tipo de frutificação	23. Fruto jovem: extensão da coloração antocianínica	42. Fruto: área de "russeting" nas faces
5. Ramo de um ano: espessura	24. Fruto: tamanho	43. Fruto: área de "russeting" na cavidade pistilar
6. Ramo de um ano: comprimento do entrenó	25. Fruto: altura	44. Fruto: número de lenticelas
7. Ramo de um ano: coloração da parte exposta ao sol	26. Fruto: diâmetro	45. Fruto: tamanho das lenticelas
8. Ramo de um ano: pubescência (na metade distal do ramo)	27. Fruto: razão comprimento/diâmetro	46. Fruto: comprimento do pedúnculo
9. Ramo de um ano: número de lenticelas	28. Fruto: forma geral	47. Fruto: espessura do pedúnculo
10. Lâmina foliar: posição em relação ao ramo	29. Fruto: ondulação da epiderme	48. Fruto: profundidade da cavidade peduncular
11. Lâmina foliar: comprimento	30. Fruto: ondulação no final do cálice	49. Fruto: largura da cavidade peduncular
12. Lâmina foliar: largura	31. Fruto: tamanho do olho	50. Fruto: profundidade da cavidade pistilar
13. Lâmina foliar: razão comprimento/ largura	32. Fruto: comprimento da sépala	51. Fruto: largura da cavidade pistilar
14. Lâmina foliar: intensidade da coloração verde	33. Fruto: pruína na epiderme	52. Fruto: firmeza da polpa
15. Lâmina foliar: incisões da margem (metade superior)	34. Fruto: oleosidade da epiderme	53. Fruto: coloração da polpa
16. Lâmina foliar: pubescência na face inferior	35. Fruto: coloração de fundo	54. Fruto: abertura dos lóculos (na seção transversal)
17. Pecíolo: comprimento	36. Fruto: área relativa da coloração superficial	55. Época de início da floração
18. Pecíolo: extensão da coloração antocianínica a partir da base	37. Fruto: tonalidade da coloração superficial (com a retirada da camada de pruína)	56. Fruto: Época de colheita
19. Flor: coloração predominante na fase de balão floral	38. Fruto: intensidade da coloração superficial	57. Época da maturação para o consumo

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

A estimativa da matriz de distância genética foi realizada por meio da análise conjunta das variáveis qualitativas nominais e ordinais, obtidas com base no algoritmo de Gower (1971), expresso por:

$$S_{ijk} = \frac{\sum_{k=1}^p W_{ijk} S_{ijk}}{\sum_{k=1}^p W_{ijk}}$$

k = o número de variáveis (k = 1, 2,..., p); i e j = dois indivíduos que representem o acesso; W_{ijk} = peso dado à comparação ijk, atribuindo valor 1 para comparações válidas e valor 0 para comparações inválidas (quando o valor da variável está ausente em um ou ambos indivíduos); S_{ijk} = contribuição da variável k na similaridade entre os indivíduos i e j, com valores entre 0 e 1. Para uma variável qualitativa (nominal), se o valor da variável k é o mesmo para ambos os indivíduos, i e j, então S_{ijk} = 1, caso contrário, é igual a 0; para uma variável quantitativa (contínua) S_{ijk} = 1 - | x_{ik} - x_{jk} | / R_k onde x_{ik} e x_{jk} são os valores da variável k para os indivíduos i e j, respectivamente, e R_k é o intervalo (valor máximo menos valor mínimo), da variável k na amostra. A divisão por R_k elimina as diferenças entre escalas das variáveis, produzindo um valor dentro do intervalo [0, 1] e pesos iguais.

Os dados foram analisados pelo programa R (<http://www.r-project.org/>), utilizando o pacote clusters e o procedimento Daisy (MAECHLER et al., 2016). Com base na matriz de dissimilaridade genética gerada, os agrupamentos dos acessos foram obtidos pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*) fazendo uso do programa computacional NTSYS pc 2.1m (ROHLF, 2000). A validação dos agrupamentos foi determinada pelo coeficiente de correlação cofenético (SOKAL & ROLF, 1962). A significância da correlação cofenética foi calculada pelos testes t e de Mantel (1000 permutações).

3.2.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Os estudos genéticos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Epagri - Estação Experimental de Caçador, em Caçador-SC.

Foram utilizados os mesmos 28 genótipos avaliados na caracterização morfoagronômica para a identificação dos respectivos genótipos do loco S por meio

de marcadores de DNA. A nomenclatura dos alelos S utilizada no trabalho é a proposta por Broothaerts, Van Nerum e Keulemans (2004).

Com base na genealogia dos genótipos analisados, há a previsão de alguns dos alelos que podem estar presentes considerando a segregação esperada para os alelos S (Tabela 9). Do mesmo modo, cultivares com seus alelos S já identificados foram utilizadas como controles positivos para as reações de amplificação, além de terem sido utilizadas para a otimização dos iniciadores referentes a cada alelo (Tabela 11).

Tabela 11 - Cultivares utilizadas como controle positivo para os respectivos alelos caracterizados molecularmente e respectivas referências de identificação.

Cultivar referência	Alelo	Nº GeneBank	Referências
Fuji (S^1S^9)	S^1	D50837	Sassa et al. (1996)
Golden Delicious (S^2S^3)	S^2	U12199	Broothaerts et al. (1995)
Golden Delicious (S^2S^3)	S^3	U12200	Broothaerts et al. (1995)
Gloster (S^4S^{19})	S^4	AF327223	Van Nerum et al. (2001)
Gala (S^2S^5)	S^5	U19791	Janssens et al. (1995)
Marubakaido (S^6S^{26})	S^6	-	Agapito-Tenfen et al. (2015)
Idared (S^3S^7)	S^7	AB032246	Janssens et al. (1995); Kitahara et al. (2000)
Fuji (S^1S^9)	S^9	D50836	Janssens et al. (1995); Sassa et al. (1996)
McIntosh ($S^{10}S^{22}$)	S^{10}	AB052683	Richman, Broothaerts e Kohn (1997); Kitahara e Matsumoto (2002); Van Nerum et al. (2001)
Baskatong ($S^{16}S^{26}$)	S^{16}	AF016919	Verdoodt et al. (1998)
Alkmene (S^5S^{22})	S^{22}	AF327222	Van Nerum et al. (2001)
Delicious (S^9S^{19})	S^{19}	AB035273	Matsumoto e Kitahara (2000)
Mutsu ($S^2S^3S^{20}$)	S^{20}	AB019184	Matsumoto et al. (1999)
Granny Smith (S^3S^{23})	S^{23}	AF239809	Schneider et al. (2001)
Braeburn (S^9S^{24})	S^{24}	AF016920	Kitahara et al. (2000); Verdoodt et al. (1998)
Marubakaido (S^6S^{26})	S^{26}	-	Agapito-Tenfen et al. (2015)

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

Folhas jovens e sadias foram coletadas aleatoriamente de um conjunto de dez plantas de cada um dos 28 genótipos de macieira, sendo acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificados, em freezer a -20 °C até o momento da realização da extração de DNA.

A extração de DNA foi realizada por meio do protocolo proposto por Lefort e Douglas (1999), com as modificações realizadas por Revers et al. (2005), utilizando 0,1 g de tecido vegetal macerado de cada amostra.

Cada reação padrão de PCR teve em sua concentração final 1 U de Taq DNA polimerase (Platinum® - Invitrogen); tampão da enzima 1x; 2,00 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs; 1 µM de cada iniciador (*forward* e *reverse*); além de 50 ng de DNA genômico. Foram testados 18 iniciadores referentes aos 16 alelos mais comumente identificados em cultivares de macieira desenvolvidas no Brasil (Tabela 12).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador T100™ BioRad® com a seguinte configuração: 3 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), seguido por 30 ciclos, compostos pelas etapas de desnaturação (94 °C por 1 minuto), pareamento (45-60 °C, dependendo das características dos iniciadores, conforme Tabela 12, por 1 minuto) e extensão (72 °C por 1 minuto), seguindo-se de uma etapa final de extensão (72 °C por 7 minutos), mantendo-se a temperatura fixa em 4 °C após a finalização do processo de amplificação. Para a discriminação dos alelos S⁴, S¹⁶ e S²², parte dos produtos amplificados na PCR (10 µL) foram digeridos pela enzima de restrição Taq I (por 1 h, a 65 °C). Da mesma forma, para a discriminação do alelo S²⁰, 10 µL do produto da amplificação na PCR foram digeridos pela enzima de restrição Nar I (por 4 h, a 37 °C). Para os iniciadores S¹⁰ modificado e S³/S⁵/S¹⁰ as configurações das reações de amplificação e a digestão por enzimas de restrição estão apresentados na Tabela 12.

Após a reação de PCR e respectivas digestões dos produtos, os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3%, utilizando o marcador de peso molecular de 50 pb para auxiliar na identificação do alelo foco da análise. Os géis foram corados com fluoróforo intercalante GelRed®. A leitura do perfil dos fragmentos amplificados foi realizada mediante análise do gel por imagem capturada em fotodocumentador Kodak Geologic 2012 Pró. Foram considerados como presentes os alelos S identificados em cada um dos genótipos quando ocorreram amplificações de fragmentos de tamanho conhecido conforme indicado na literatura, e coincidentes aos fragmentos amplificados em genótipos utilizados

como controle padrão para a presença de cada alelo S, conforme descrito nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 12 - Sequência de nucleotídeos de cada iniciador e condições de PCR específicas para cada alelo S testado.

Alelo	Iniciadores	Sequências (5' -> 3')	Temperatura de pareamento °C	Fragmento amplificado (pb)
S ¹	FTC168 FTC169	ATATTGTAAGGCACCGCCATATCA T GGTTCTGTATTGGGGAAGACGCAC AA	60	530
S ²	OWB122 OWB123	GTTCAAACGTGACTTATGCG GGTTTGGTTCCTTACCATGG	60	449
S ³	FTC177 FTC226	CAAACGATAACAAATCTTAC TATATGGAAATCACCATTTCG	55	500
S ⁴	FCT5 OWB249	TCCCACAATACAGAACGAGA CAATCTATGAAATGTGCTCTG	60, Taq I	274 (194+77)
S ⁵	FTC10 FTC11	CAAACATGGCACCTGTGGGTCTCC TAATAATGGATATCATTGGTAGG	59	346
S ⁶	FTC141 FTC142	ATCAGCCGGCTGTCTGCCACTC AGCCGTGCTCTTAATACTGAATAC	58, E 45	850
S ⁷	FTC143 FTC144	ACTCGAATGGACATGACCCAGT TGTCGTTCAATTATTGTGGGATGTC	60	302
S ⁹	OWB154 OWB155	CAGCCGGCTGTCTGCCACTT CGGTTTCGATCGAGTACGTTG	62	343
S ¹⁰	FTC12 FTC228	CCAAACGTACTCAATCGAAG ATGTCGTCCCGTGTCTCTGAATC	60	209
S ¹⁶	FTC5 OWB249	TCCCACAATACAGAACGAGA CAATCTATGAAATGTGCTCTG	60, Taq I	274 (243+41)
S ¹⁹	FTC229 FTC230	TCTGGGAAAGAGAGTGGCTC TTTATGAACCTTCGTTAAGTCTC	60	304
S ²⁰	FTC141 FTC142	ATCAGCCGGCTGTCTGCCACTC AGCCGTGCTCTTAATACTGAATAC	60, E 45, Nar I	920 (800+120)
S ²²	FTC5 OWB249	TCCCACAATACAGAACGAGA CAATCTATGAAATGTGCTCTG	60, Taq I	274 (199+44+31)
S ²³	FTC222 FTC224	CAATCGAACCAATCATTTGGT GGTGTCAATTGTTGGTACTAATG	60	237
S ²⁴	FTC231 FTC232	AAATATTGCAACGCACAGCA TTGAGAGGATTTTCAGAGATG	60	580
S ²⁶	FCT14 FTC9	GAAGATGCCATACGCAATGG TTTAATACCGAATATTGGCG	54	194
* S ¹⁰ modificado		AACAAATCTTAAAGCCCAGC GGTTTCTTATAGTCGATACTTTG	60	-
** S ³ /S ⁵ /S ¹⁰		CAATTTACGCAGCARTATCAG TGTTTGAATYGAAAATTARTTAGGAGT	58	-

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

NOTAS: E 45 = Extensão de 45 segundos.

Valores entre parênteses se referem ao tamanho de fragmento gerado após a digestão com as respectivas enzimas de restrição

* Iniciador proposto por Kitahara e Matsumoto (2002) para identificação do alelo S¹⁰. Reação de amplificação modificada para: 3 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), seguido por 30 ciclos, compostos pelas etapas de desnaturação (94 °C por 1 minuto), pareamento (60 °C por 1 minuto) e extensão (72 °C por 1 minuto), seguindo-se de uma etapa final de extensão (72 °C por 10 minutos), mantendo-se a temperatura fixa em 4 °C após a finalização do processo de amplificação. Tamanho do fragmento amplificado de 282 pb e quando tratado com a enzima Nar I gera dois fragmentos: 185 e 97 pb. ** Iniciador proposto por Larsen et al. (2016) para identificação dos alelos S³, S⁵ e S¹⁰. Reação de amplificação modificada para: 2 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), seguido por 33

ciclos, compostos pelas etapas de desnaturação (94 °C por 20 segundos), pareamento (58 °C por 20 segundos) e extensão (72 °C por 2 minutos), seguindo-se de uma etapa final de extensão (72 °C por 5 minutos), mantendo-se a temperatura fixa em 4 °C após a finalização do processo de amplificação. Tamanho dos fragmentos amplificados antes e depois do tratamento com a enzima Taq I, respectivamente: S^3 = 423 pb, 264 pb; S^5 = 399 pb, 273 pb; S^{10} = 382 pb, não fragmentado pela enzima de restrição.

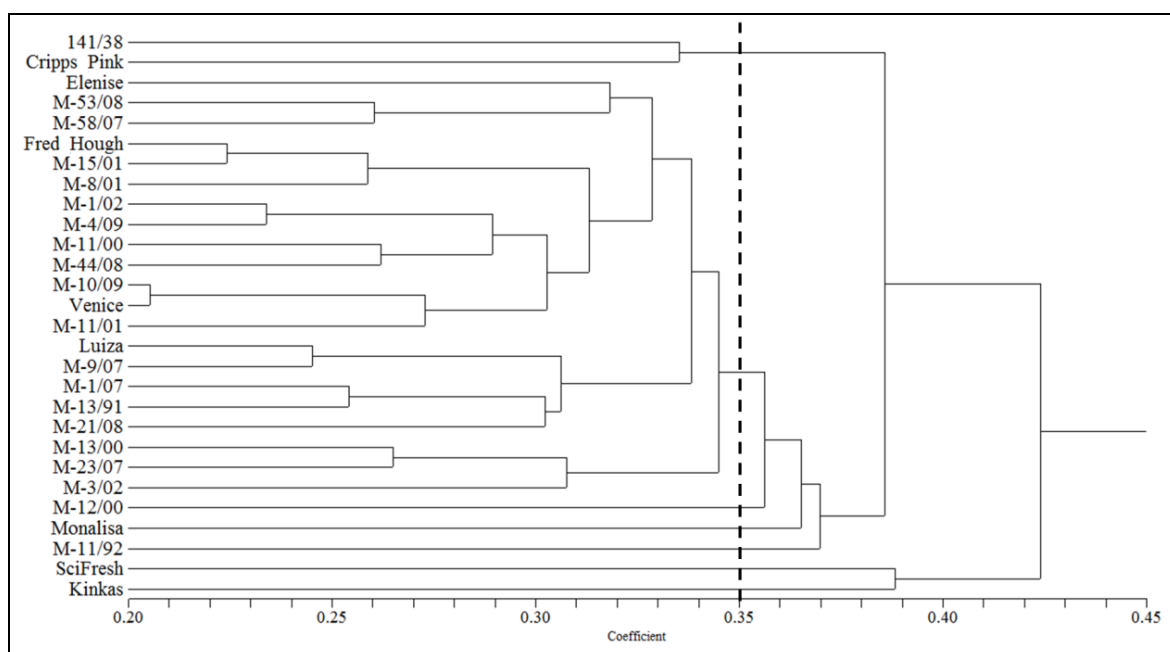
3.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.3.1 DESCRITORES MORFOAGRONÔMICOS

A matriz de dissimilaridade gerada pelo algoritmo de Gower resultou em uma dissimilaridade média de 0,35, indicando que, no geral, o conjunto de genótipos avaliados foram dissimilares em 35 % das classes possíveis para as características multicategóricas avaliadas (Figura 4).

O coeficiente de correlação cofenética (CCC) foi de 0,70, evidenciando consistência do agrupamento utilizado. O CCC é o coeficiente de correlação de Pearson entre a matriz de distâncias gerada utilizando o algoritmo de Gower e a matriz cofenética obtida a partir do dendrograma, e é utilizado para avaliar a consistência do padrão de agrupamento. Baseando-se na dissimilaridade média foram formados sete grupos por meio do método UPGMA, conforme a Figura 4.

Figura 4 - Dendrograma de agrupamento entre genótipos copa de macieira gerado com base no desempenho para 57 descritores mínimos (MAPA, 2012). Caçador-SC, safra 2015/2016 (dissimilaridade média = 0,35; coeficiente de correlação cofenética = 0,70).



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

O algoritmo de Gower tem sido utilizado para análises de descritores, tanto quantitativos e qualitativos quanto qualitativos de diferentes tipos, em trabalhos com as mais diversas culturas, como gérberas (COUTO, AGUILAR e ARAÚJO, 2015), pimenta (MOURA et al., 2010), soja (SILVA et al., 2016), feijão (GONÇALVES et al., 2014), tomate (ROCHA et al., 2010), braquiárias (TORRES et al., 2015), gabioba (ASSIS, 2011), abóbora (SOBREIRA, 2013), guaraná (OZÓRIO, 2013), mamão (PINTO et al., 2013), abacaxi (COSTA JUNIOR et al., 2016), coco (SOBRAL et al., 2012), mandioca (OLIVEIRA et al., 2009), e banana (PESTANANA et al., 2011).

Dos sete grupos formados, cinco deles foram compostos por apenas um genótipo, M-12/00, Monalisa, M-11/92, SciFresh e Kinkas. Entre esses, a seleção M-12/00 apresentou coloração de ramo marrom-clara, sendo a única dentre os 28 genótipos com essa característica. A cultivar SCS417 Monalisa foi o único genótipo que apresentou formato de fruto elipsóide. A seleção M-11/92 apresentou hábito de crescimento ereto, distribuição da coloração superficial no fruto uniforme e sem estrias, número muito baixo de lenticelas por fruto, e época de início de floração e maturação para consumo muito precoce, todas características particulares somente a ela. A cultivar SciFresh foi a única a apresentar incidência média de *russetting* na cavidade pistilar. Já a cultivar Kinkas apresentou cinco características únicas a ela entre os genótipos considerados: altura de fruto baixa (levando a razão comprimento/diâmetro pequena), diâmetro de pétalas entre muito pequeno e pequeno, e comprimento de sépala e lâmina foliar curto.

Com exceção da seleção M-12/00, que é originária do cruzamento entre Imperatriz (♀) e Fred Hough (♂), os genótipos que formaram grupos isolados apresentam como genitor uma seleção não desenvolvida no Brasil (PWR37T133 é genitor masculino da Kinkas e tem origem norte-americana, e Malus 4 é genitor masculino da cultivar Monalisa e também tem origem estrangeira) ou resultante do cruzamento entre cultivares estrangeiras (o genitor feminino M-41 da seleção M-11/92 é descendente do cruzamento de Anna vs. NJ-56). Já a cultivar SciFresh é originária da Nova Zelândia e descendente do cruzamento das cultivares Braeburn vs. Royal Gala, sendo que a cultivar Braeburn raramente é utilizada como genitor no programa de melhoramento da Epagri de Caçador, podendo ser esse o motivo da dissimilaridade identificada, já que os demais genótipos tem genitores com parentesco mais próximo.

O sexto grupo foi formado por dois genótipos: Cripps Pink e 141/38. Considerando a genealogia identificada para eles, ambos os genótipos não para ambos (a seleção 141/38 é resultante da polinização livre da cultivar Baronesa, sendo assim não há genitor masculino identificado) Os dois genótipos não apresentam genealogia comum, porém apresentam 22 das 57 características iguais entre si.

O sétimo grupo foi formado pelos 21 demais genótipos: M-3/02, M-13/00, M-1/02, M-21/08, M-1/07, M-13/91, M-9/07, M-11/01, M-8/01, SCS425 Luiza, M-10/09, SCS426 Venice, M-11/00, SCS427 Elenise, M-23/07, M-44/08, M-4/09, M-53/08, M-58/07, M-15/01 e Fred Hough. Todos esses genótipos foram desenvolvidos pela Epagri, sendo que apresentam grande semelhança em sua genealogia, compostos basicamente por descendentes diretos de Imperatriz, Baronesa, Cripps Pink e Fred Hough, com ascendência comum de Gala, Fuji e/ou Golden Delicious em alguma geração próxima.

A dissimilaridade entre os genótipos de macieira comparados dois a dois variou de 0,21 (SCS426 Venice e M-10/09), sendo dissimilares em 31 dos 57 descritores avaliados, à 0,50 entre M-58/07 e SciFresh e entre Kinkas e Elenise, dissimilares em 46 dos 57 descritores e 44 dos 57 descritores, respectivamente.

Os descritores morfoagronômicos exigidos pelo MAPA para proteção de novas cultivares são compostos por caracteres qualitativos avaliados por uma escala de notas. Alguns destes caracteres são qualitativos nominais, como coloração de fruto, formato de folha, época de florescimento, etc. e outros são qualitativos ordinais, sendo que de acordo com o aumento da nota aumenta a intensidade da expressão fenotípica do caráter. A recomendação do MAPA para a proteção de novas cultivares originárias de cruzamentos é realizar a avaliação em cinco plantas por um período de dois anos. Entretanto, a grande maioria das cultivares que servem como referência para caracterização das plantas não é cultivada no Brasil. Algumas cultivares nunca foram introduzidas no país e não estão disponíveis informações sobre cada uma delas. Contudo, como a lista de descritores e cultivares padrão foi desenvolvida em outro país, o comportamento fenotípico dessas cultivares é diferente ao comportamento expresso no Brasil, tornando a avaliação inconsistente mesmo que fosse realizada conjuntamente com as plantas referência sendo cultivadas no Brasil. Uma alternativa seria reformular a lista de descritores, sugerindo genótipos cultivados/desenvolvidos no Brasil para servirem como padrão

de referência na avaliação. Por outro lado, como os descritores são baseados em caracteres fenotípicos e os mesmos sofrem muita influência ambiental, a caracterização dos genótipos por meio de marcadores de DNA seria uma alternativa mais eficiente e recomendada para a diferenciação de novas cultivares de macieira, já que as diferenças seriam detectadas em nível de sequência de bases nitrogenadas, não sofrendo alterações por causas ambientais.

3.3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ALELOS S

Anteriormente às reações de amplificação para os 28 genótipos estudados, os iniciadores referentes a cada alelo S foram testados em suas respectivas cultivares padrão. Com exceção do alelo S^{16} , cujo padrão é a cultivar Baskatong, a qual não apresenta exemplares sendo cultivados na Epagri. Houve concordância entre o tamanho dos fragmentos amplificados e o tamanho dos fragmentos encontrados na literatura para os alelos testados.

Com base na similaridade dos produtos amplificados nas cultivares referência, foram identificados nove alelos S diferentes em oito cultivares de macieira e 20 seleções do programa de melhoramento genético da Epagri, foco deste estudo (Tabela 13).

Os genótipos M-12/00, M-11/01, M-3/02, M-8/01, M-15/01, M-13/00, M-11/00 e M-1/02 possuem os mesmos genitores, Imperatriz (S^3S^5) e Fred Hough (S^5S^{19}). Foram identificados apenas dois genótipos diferentes para o loco S: S^3S^5 para M-12/00, M-11/01, M-3/02 e M-11/00, e S^3S^{19} para M-8/01, M-15/01, M-13/00 e M-1/02.

A ocorrência de apenas duas conformações genotípicas em descendentes do cruzamento de genitores semicompatíveis já era esperada (1:1). Entretanto, neste caso a herança do alelo S^5 , originalmente presente no genitor masculino, contradiz o esperado teoricamente. Como relatado por Batlle et al. (1995), Broothaerts et al. (1995), Van Nerun et al. (2001), Matsumoto (2014) e De Franceschi et al. (2016), a semicompatibilidade entre os genitores causa o abortamento do grão de pólen portador do alelo comum quando em contato com o pistilo de uma planta semicompatível. Por esse motivo, o resultado esperado para o cruzamento entre os genitores S^3S^5 vs. S^5S^{19} seriam plantas S^3S^{19} e S^5S^{19} . Uma causa provável dessa divergência na herança dos alelos S esperados pode ser um erro nos registros do Programa de Melhoramento Genético da Epagri, havendo inversão do genitor

feminino e masculino. Nesse caso, sendo Fred Hough (S^5S^{19}) o genitor feminino e Imperatriz (S^3S^5) o genitor masculino, os genótipos possíveis nos descendentes desse cruzamento seriam S^3S^5 e S^3S^{19} , coincidindo com os genótipos encontrados nas seleções M-12/00, M-11/01, M-3/02 e M-11/00, e M-8/01, M-15/01, M-13/00 e M-1/02, respectivamente.

Tabela 13 - Alelos S identificados em genótipos de macieira, e respectivos tamanhos do fragmento amplificado via PCR.

Genótipo	Alelo	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Genótipo	Alelo	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
SCS426 Venice	S^3	500	M-58/07	S^5	346
	S^9	343		S^9	343
M-21/08	S^3	500	M-10/09	S^5	346
	S^5	346		S^{23}	237
M-1/07	S^3	500	M-13/00	S^3	500
	S^5	346		S^{19}	304
M-23/07	S^3	500	M-11/00	S^3	500
	S^5	346		S^5	346
SCS425 Luiza	S^5	346	Kinkas	S^9	343
	S^9	343		n.i.	-
M-11/92	S^2	449	SCS427 Elenise	S^3	500
	n.i.	-		S^{23}	237
M-13/91	S^3	500	SciFresh	S^2	449
	S^5	346		S^{24}	580
M-12/00	S^3	500	M-44/08	S^1	530
	S^5	346		S^5	346
M-9/07	S^3	500	M-1/02	S^3	500
	S^{19}	304		S^{19}	304
M-11/01	S^3	500	M-4/09	S^1	530
	S^5	346		S^3	500
M-3/02	S^3	500	141/38	S^2	449
	S^5	346		S^9	343
SCS417 Monalisa	S^2	449	M-53/08	S^3	500
	S^{10}	382		S^{19}	304
M-8/01	S^3	500	Fred Hough	S^5	346
	S^{19}	304		S^{19}	304
M-15/01	S^3	500	Cripps Pink	S^2	449
	S^{19}	304		S^{23}	237

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

NOTAS: n.i.: não identificado.

Os genótipos M-44/08 (S^1S^5), M-4/09 (S^1S^3) e M-53/08 (S^3S^{19}) são descendentes do cruzamento entre a cultivar Imperatriz (S^3S^5) e Catarina (S^1S^{19})

(ALBUQUERQUE JUNIOR, 2005), tendo em seus genitores todos os alelos S diferentes, ou seja, são totalmente compatíveis (DE FRANCESCHI et al., 2016) e, por isso, todos os alelos apresentam a mesma possibilidade de serem herdados.

Para os genótipos SCS425 Luiza (S^5S^9), SCS427 Elenise (S^3S^{23}) e M-10/09 (S^5S^{23}), todos originários do cruzamento entre Imperatriz (S^3S^5) e Cripps Pink (S^2S^{23}), houve divergência na herança do alelo S^9 da cultivar SCS425 Luiza. A presença desse alelo pode ser resultado de contaminação cruzada no decorrer do desenvolvimento da cultivar (contaminação com pólen indesejado, troca de sementes entre diferentes cruzamentos na semeadura ou de *seedlings* no momento do plantio, etc.). A causa mais provável dessa divergência pode ser a troca/mistura de sementes com as do cruzamento entre Baronesa (S^3S^9) e Imperatriz (S^3S^5), o que explicaria a presença do alelo S^9 na cultivar SCS425 Luiza. Dessa forma, faz-se necessário realizar uma análise de *fingerprinting* entre o genótipo foco e os respectivos possíveis genitores e/ou outros genótipos presentes na área aonde foram realizados os cruzamentos, utilizando marcadores moleculares específicos.

Resultados semelhantes sobre a presença de alelos diferentes aos dos seus supostos pais foram relatados em outros trabalhos com cultivares de macieira (CHOI, TAO e ANDERSEN, 2002; SAKURAI, BROWN e WEEDEN, 2000) e também foi admitida a possibilidade de contaminação cruzada. No trabalho de Sakurai, Brown e Weeden (2000), a cultivar Kent era tida como descendente do cruzamento entre as cultivares Cox's Orange Pippin (S^5S^9 - ♀) e Jonathan (S^7S^9 - ♀), porém os alelos identificados foram S^3 e S^9 , sugerindo que a cultivar Jonathan não seja a doadora de pólen. Nesse sentido, a genotipagem dos alelos do loco S gerou informações a respeito de erros na genealogia previamente informada, indicando a possibilidade de ser utilizado na caracterização básica para a confirmação da descendência de genótipos de macieira, levando em consideração a segregação esperada para os alelos S dos pais.

Outros dois genótipos, M-21/08 e M-1/07, compartilham os mesmos genitores (M-47/94 e Princesa) e apresentam a mesma constituição genética do loco S, sendo ambos genotipados como S^3S^5 . O genótipo do genitor feminino M-47/94 ainda não foi caracterizado, mas por ser filho do cruzamento entre Fred Hough (S^5S^{19}) e Gala (S^2S^5) (JANSSENS et al., 1995), espera-se que o alelo S^5 dos genótipos M-21/08 e do M-1/07 foi herdado da M-47/94, já que a cultivar Princesa apresenta o genótipo S^3S^5 (ALBUQUERQUE JUNIOR, 2005), e o pólen haploide contendo o alelo S^5

deveria ser abortado quando em contato com o tecido diploide do pistilo, devido a autoincompatibilidade gametofítica característica da espécie.

Para a seleção M-13/91, o genótipo do loco S identificado na seleção M-13/91 divergiu do genótipo encontrado por Albuquerque Junior (2005) em relação aos resultados obtidos no presente estudo. Esse autor identificou os alelos S^5S^{10} para a seleção M-13/91 utilizando os iniciadores FTC12 e FTC228. Porém, a seleção em questão é descendente do cruzamento entre a cultivar Princesa (S^3S^5) (ALBUQUERQUE JUNIOR, 2005) e a cultivar Mollie's Delicious (S^3S^7) (BROOHAERTS, VAN NERUM e KEULEMANS, 2004) e nenhuma delas apresenta o alelo S^{10} .

Em função dessa dúvida, no presente estudo foram utilizados dois pares de iniciadores adicionais (S^{10} modificado e $S^3/S^5/S^{10}$) além dos iniciadores FTC12 e FTC228 para identificação do alelo S^{10} e distinção do mesmo com os alelos S^3 e S^5 . Utilizando os iniciadores FTC12 e FTC228 ocorreu a amplificação do fragmento no tamanho característico para o alelo S^{10} (209 pb) na seleção M-13/91. Já utilizando o iniciador S^{10} modificado (KITAHARA e MATSUMOTO, 2002) não constatou-se amplificação de qualquer fragmento de DNA nessa seleção. Para a SCS417 Monalisa o produto de amplificação gerado pelo iniciador S^{10} modificado (282 pb) tratado com a enzima de restrição Nar I gerou dois fragmentos (185 e 97 pb), característicos da presença do alelo S^{10} . Quando utilizado o iniciador $S^3/S^5/S^{10}$ na seleção M-13/91, houve amplificação e o produto de PCR após tratamento com a enzima Taq I gerou fragmentos característicos para os alelos S^3 (423 pb e 264 pb) e S^5 (399 pb e 273 pb) e não para o S^{10} . Já na cultivar SCS417 Monalisa, utilizando-se o iniciador $S^3/S^5/S^{10}$ o produto amplificado foi formado por 382 pb, não sendo fragmentado após tratamento com a enzima Taq I, comportamento que é característico do alelo S^{10} . Baseando-se nas sequências dos alelos S disponíveis no GenBank (BENSON et al., 2013), os alelos S^3 e S^{10} apresentam 96 % de homologia entre sua sequência de bases nitrogenadas; os alelos S^3 e S^5 possuem 77 % de homologia e os alelos S^5 e S^{10} tem homologia de 97 % entre as suas sequências. Portanto, os iniciadores FTC12 e FTC228 pareiam com sequências homólogas nos três alelos (S^3 , S^5 e S^{10}), fazendo com que esses iniciadores não sejam efetivos para identificação do alelo S^{10} . Dos 20 genótipos que apresentaram amplificação com esse par de iniciadores, dois foram identificados posteriormente como contendo o alelo S^5 , um com o alelo S^{10} e os 17 demais com o alelo S^3 .

Segundo registros do Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri, a seleção M-13/91 é o genitor masculino da seleção M-23/07 (S^3S^5), sendo que o genitor feminino é a seleção M-46/94 (S^5S^{19}). A seleção M-46/94 também é genitor (♀) da seleção M-9/07 (S^3S^{19}), sendo a cultivar Imperatriz (S^3S^5 - ♂) o outro genitor do cruzamento.

Os genótipos das cultivares Fred Hough (S^5S^{19}) e Cripps Pink (S^2S^{23}) foram confirmados nesta avaliação conforme identificado inicialmente por Albuquerque Junior (2005) e Broothaerts, Van Nerum e Keulemans (2004), respectivamente. A cultivar SCS426 Venice foi caracterizada como S^3S^9 e a seleção M-58/07 (S^5S^9), sendo ambas filhas da cultivar Imperatriz (S^3S^5 - ♂) e Baronesa (S^3S^9 - ♂) (ALBUQUERQUE JUNIOR, 2005). A cultivar SciFresh apresentou genótipo S^2S^{24} , tendo herdado o alelo S^{24} do genitor feminino Braeburn (S^9S^{24}) (VERDOODT et al., 1998) e o alelo S^2 do genitor masculino Royal Gala (S^2S^5). Já para a cultivar SCS417 Monalisa foram identificados os alelos S^2S^{10} , sendo o alelo S^2 herdado da cultivar Gala (S^2S^5) e o alelo S^{10} possivelmente foi herdado da Malus 4, que ainda não apresenta seus dois alelos S caracterizados, mas é descendente do cruzamento entre Prima (S^2S^{10}) e Anna ($S^{29}S^?$). Para identificação do alelo S^{10} , todos os iniciadores citados relacionados à esse alelos foram testados e confirmaram a presença do alelo S^{10} via coincidência do tamanho de bandas esperados após eletrofores dos produtos de amplificação. A seleção 141/38, resultante da polinização livre da cultivar Baronesa (S^3S^9), apresentou os alelos S^2 e S^9 tendo herdado o S^9 da Baronesa e o S^2 do seu genitor masculino.

Para a cultivar Kinkas e para a seleção M-11/92, apenas um alelo foi identificado, S^9 e S^2 respectivamente. Eles alelos podem ter sido herdados da Fuji (S^1S^9) e da Gala (S^2S^5), genitores de Kinkas e M-11/92 respectivamente. Possivelmente, o segundo alelo de ambas esteja presente dentre os novos alelos identificados por Larsen et al. (2016) em diversas cultivares desenvolvidas em outros países. Se os respectivos alelos não identificados estiverem dentre os caracterizados por Larsen et al. (2016), os mesmos podem ser identificados utilizando o par de iniciadores desenvolvidos por esses autores, com o auxílio de enzimas de restrição para diferenciação dos alelos.

A herança de alguns alelos não seguiu o pressuposto de que o pólen contendo o alelo comum seja abortado no processo de fertilização, característico na ocorrência de autoincompatibilidade gametofítica. Algumas possibilidades para

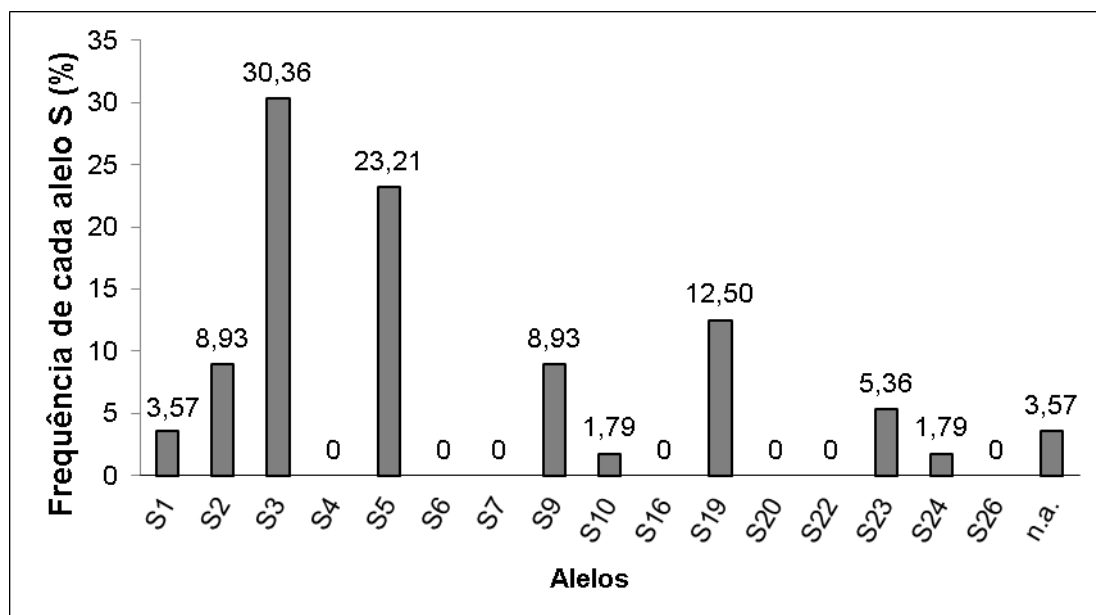
explicar esse fato já foram constatadas por outros autores. Li et al. (2016) sugerem a possibilidade de ocorrência de uma mutação (deleção ou inserção) no alelo S do grão de pólen, resultando em perda da função desse alelo, porém ambos os alelos do pistilo da planta se mantêm funcionais. Isso faz com que o alelo S em questão não seja reconhecido como incompatível pelo tecido diploide do pistilo e ocorra a formação normal do tubo polínico. A mutação pode ocorrer, também, no pistilo da planta, possibilitando a fertilização do óvulo mesmo que o grão de pólen apresente o mesmo alelo (ZUREK et al., 1997; MATSUMOTO et al., 1999). Outra possibilidade que já foi encontrada no gênero *Nicotiana*, que também apresenta a AIG, é a ação de moléculas proteicas não controladas pelo gene S, que interferem na ação das S-Rnases presentes no pistilo, possibilitando a fecundação do óvulo mesmo na ocorrência de semicompatibilidade (HEGEDÜS, 2006). O nível de expressão da S-Rnase também é um fator que pode alterar a compatibilidade entre os genótipos, e quando em níveis baixos e perante pólen com boa capacidade de germinação, torna-se possível o crescimento do tubo polínico (SANZOL e HERRERO, 2007).

Dos 16 alelos testados nesse estudo, nove alelos diferentes foram identificados entre os 28 genótipos estudados (Figura 5). Dois deles, os alelos S^3 e S^5 , foram identificados em maior frequência (30,36 % e 23,21 % respectivamente). A maior ocorrência desses dois alelos se deve a alta frequência de utilização da cultivar Imperatriz (S^3S^5) como genitor no programa de melhoramento genético de macieira da Epagri, principalmente em combinação com a cultivar Fred Hough (S^5S^{19}). A cultivar Imperatriz apresenta em sua genealogia a cultivar Golden Delicious (S^2S^3), que também já foi muito utilizada em cruzamentos em outros programas de melhoramento de macieira ao redor do mundo.

Segundo os autores Halász et al. (2011) e Melounová et al. (2005), a presença dos alelos S^2 , S^3 , S^5 está associada à diferentes níveis de resistência à sarna (*Venturia inaequalis*). Do mesmo modo, De Franceschi et al. (2016) constaram a distância de 3,16 - 4,28 cM entre o alelo S^{10} e o gene *Rvi5* de resistência a sarna. Nenhum desses genes é o gene de resistência vertical a sarna (*Rvi6*), porém são genes que, de alguma maneira, influenciam à diferentes níveis de resistência. Por esse motivo, mesmo que diversos melhoristas não saibam da ligação entre o loco S e os genes de resistência a sarna, há uma seleção indireta para a ocorrência desses alelos S já que grande parte dos genitores utilizados visando a formação de plantas resistentes à sarna possui pelo menos um desses alelos (S^2 , S^3 , S^5 e S^{10}). Logo, a

exploração da semicompatibilidade entre genitores portadores de algum desses alelos pode otimizar a formação de indivíduos com resistência a sarna (DE FRANCESCHI et al., 2016). Ou seja, em um cruzamento tendo como doadora de pólen uma planta de genótipo $S^{10}S^X$ e o genitor feminino como S^XS^Y , levando em consideração que haverá abortamento do grão pólen que carrega o alelo S^X devido a semicompatibilidade, toda a população segregante gerada carregaria o gene *Rvi5*, pois herdaria o alelo S^{10} do genitor masculino (genótipos formados: S^XS^{10} e S^YS^{10}). Esse fator é de grande importância ao melhoramento genético de macieira, pois além da identificação dos alelos do loco S, a utilização de marcadores de DNA pode gerar informações a respeito da possível presença desses genes de resistência em função da sua íntima ligação.

Figura 5 - Frequência de ocorrência de cada alelo S em genótipos de macieira componentes da Coleção de Germoplasma Elite do Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri, Caçador-SC.



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

Broothaerts, Van Nerum e Keulemans (2004) e Albuquerque Junior (2005) encontraram maior incidência dos alelos S^3 e S^5 em seus trabalhos. Larsen et al. (2016) evidenciaram a maior frequência do alelo S^3 (28 %) entre 432 genótipos do gênero *Malus* em seu estudo. Já Dreesen et al. (2010) encontraram os alelos S^2 , S^3 , S^5 e S^9 como os alelos mais frequentes em cultivares europeias, enquanto Hegedüs (2006) identificaram os alelos S^2 , S^3 , S^5 , S^7 e S^{10} como sendo os mais frequentes

entre diversas cultivares testadas. Esses resultados sugerem que os alelos S³ e S⁵ estão presentes na grande maioria dos genitores utilizados em hibridações de macieira nos programas de melhoramento genético de macieira, uma vez que a exploração de um conjunto reduzido de genótipos, com *pool* gênico restrito, é uma prática comum no melhoramento genético vegetal.

3.3.3 DISCUSSÃO GERAL

Das 378 combinações possíveis entre os 28 genótipos avaliados, 44 delas são entre genótipos incompatíveis geneticamente e 170 são entre genótipos semicompatíveis (Tabela 14).

A semicompatibilidade pode ser explorada em casos especiais, como a incorporação de resistência a sarna da macieira citada anteriormente, ou outro caráter de interesse específico porém para a geração de populações segregantes, a semicompatibilidade pode diminuir pela metade a variabilidade existente na população.

Considerando conjuntamente os cinco maiores valores de dissimilaridade gerados a partir da análise pelo algoritmo de Gower e a compatibilidade genética total dos genótipos identificada pela genotipagem dos alelos S, sugerem-se 15 cruzamentos para ampliação da chance de seleção dos genótipos idealizados no planejamento dos cruzamentos:

1. 46 % de dissimilaridade: SciFresh vs. Elenise; M-11/01 vs. SciFresh; M-12/00 vs. Kinkas; Cripps Pink vs. M-1/07.
2. 47 % de dissimilaridade: M-11/01 vs. Kinkas.
3. 48 % de dissimilaridade: Elenise vs. 141/38; M-1/07 vs. SciFresh; M-13/91 vs. Kinkas; M-21/08 vs. Kinkas.
4. 49 % de dissimilaridade: M-13/91 vs. SciFresh; M-9/07 vs. Kinkas; Monalisa vs. Kinkas; Cripps Pink vs. M-9/07.
5. 50 % de dissimilaridade: Kinkas vs. Elenise; M-58/07 vs. SciFresh.

A grande maioria dos cruzamentos sugeridos é composto por, ao menos, algum dos genótipos que formaram grupos isolados na análise de agrupamento (Kinkas, SciFresh, M-12/00, Monalisa) com exceção da seleção M-11/92.

A combinação de genótipos mais divergentes entre si e com complementaridade das características fenotípicas de interesse tende a aumentar a

probabilidade de seleção de genótipos com vantagens agronômicas e, portanto, aumenta as chances de êxito do melhorista. Todos os 15 cruzamentos tem a possibilidade de formar o número máximo possível de descendentes, que poderão ser utilizados nas etapas seguintes de seleção.

Tabela 14 - Nível de compatibilidade e dissimilaridade entre os genótipos de macieira avaliados estimada pelo algoritmo de Gower (continua).

	Elenise	Fred Hough	SciFresh	Kinkas	Luiza	M-1/02	M-1/07	M-10/09	M-11/00	M-11/01	M-11/92	M-12/00
141/38	C (0,48)	C (0,35)	SC (0,46)	SC (0,40)	SC (0,36)	C (0,35)	C (0,39)	C (0,42)	C (0,30)	C (0,36)	SC (0,39)	C (0,34)
Elenise	-	C (0,31)	C (0,46)	C (0,50)	C (0,33)	SC (0,36)	SC (0,34)	SC (0,32)	SC (0,37)	SC (0,39)	SC (0,39)	SC (0,46)
Fred Hough		-	C (0,34)	C (0,38)	SC (0,29)	SC (0,26)	SC (0,29)	SC (0,26)	SC (0,32)	SC (0,32)	C (0,36)	SC (0,33)
SciFresh			-	C (0,39)	C (0,44)	C (0,31)	C (0,48)	C (0,40)	C (0,36)	C (0,46)	SC (0,48)	C (0,37)
Kinkas				-	SC (0,48)	C (0,37)	C (0,44)	C (0,41)	C (0,39)	C (0,47)	SC (0,46) *	C (0,46)
Luiza					-	C (0,26)	SC (0,25)	SC (0,32)	SC (0,34)	SC (0,34)	C (0,31)	SC (0,37)
M-1/02						-	SC (0,27)	C (0,32)	SC (0,27)	SC (0,34)	C (0,35)	SC (0,33)
M-1/07							-	SC (0,35)	I (0,37)	I (0,27)	C (0,31)	I (0,35)
M-10/09								-	SC (0,31)	SC (0,29)	C (0,41)	SC (0,38)
M-11/00									-	I (0,29)	C (0,36)	I (0,28)
M-11/01										-	C (0,39)	I (0,29)
M-11/92											-	C (0,43)

	M-13/00	M-13/91	M-15/01	M-21/08	M-23/07	M-3/02	M-4/09	M-44/08	M-53/08	M-58/07	M-8/01
141/38	C (0,42)	C (0,40)	C (0,36)	C (0,43)	C (0,43)	C (0,39)	C (0,31)	C (0,32)	C (0,42)	SC (0,37)	C (0,36)
Elenise	SC (0,37)	SC (0,43)	SC (0,39)	SC (0,37)	SC (0,35)	SC (0,38)	SC (0,38)	C (0,32)	SC (0,31)	C (0,33)	SC (0,29)
Fred Hough	SC (0,24)	SC (0,34)	SC (0,22)	SC (0,34)	SC (0,28)	SC (0,29)	C (0,30)	SC (0,32)	SC (0,35)	SC (0,30)	SC (0,23)
SciFresh	C (0,36)	C (0,49)	C (0,38)	C (0,44)	C (0,43)	C (0,36)	C (0,44)	C (0,40)	C (0,44)	C (0,50)	C (0,39)
Kinkas	C (0,35)	C (0,48)	C (0,42)	C (0,48)	C (0,45)	SC (0,34)	C (0,40)	C (0,43)	C (0,44)	SC (0,40)	C (0,43)
Luiza	C (0,36)	SC (0,35)	C (0,37)	SC (0,29)	SC (0,34)	SC (0,41)	C (0,31)	SC (0,32)	C (0,32)	I (0,29)	C (0,27)
M-1/02	I (0,25)	SC (0,36)	I (0,32)	SC (0,34)	SC (0,30)	SC (0,31)	SC (0,23)	C (0,34)	I (0,29)	C (0,30)	I (0,26)
M-1/07	SC (0,32)	I (0,25)	SC (0,36)	I (0,28)	I (0,27)	I (0,33)	SC (0,27)	SC (0,32)	SC (0,36)	SC (0,30)	SC (0,32)
M-10/09	C (0,37)	SC (0,38)	C (0,32)	SC (0,32)	SC (0,37)	SC (0,35)	C (0,30)	SC (0,32)	C (0,32)	SC (0,34)	C (0,30)
M-11/00	SC (0,31)	I (0,38)	SC (0,35)	I (0,36)	I (0,39)	I (0,33)	SC (0,27)	SC (0,26)	SC (0,32)	SC (0,30)	SC (0,35)
M-11/01	SC (0,38)	I (0,32)	SC (0,33)	I (0,28)	I (0,35)	I (0,36)	SC (0,30)	SC (0,27)	SC (0,38)	SC (0,30)	SC (0,38)
M-11/92	C (0,42)	C (0,41)	C (0,36)	C (0,39)	C (0,36)	C (0,42)	C (0,39)	C (0,33)	C (0,37)	C (0,32)	C (0,36)
M-12/00	SC (0,34)	I (0,36)	SC (0,30)	I (0,35)	I (0,38)	I (0,34)	SC (0,34)	SC (0,36)	SC (0,41)	SC (0,33)	SC (0,38)
M-13/00	-	SC (0,36)	I (0,30)	SC (0,42)	SC (0,27)	SC (0,28)	SC (0,34)	C (0,36)	I (0,37)	C (0,29)	I (0,35)
M-13/91		-	SC (0,33)	I (0,33)	I (0,31)	I (0,29)	SC (0,27)	SC (0,35)	SC (0,41)	SC (0,34)	SC (0,37)
M-15/01			-	SC (0,39)	SC (0,39)	SC (0,31)	SC (0,31)	C (0,36)	I (0,40)	C (0,25)	I (0,29)
M-21/08				-	I (0,35)	I (0,39)	SC (0,32)	SC (0,33)	SC (0,42)	SC (0,37)	SC (0,38)
M-23/07					-	I (0,34)	SC (0,40)	SC (0,38)	SC (0,39)	SC (0,34)	SC (0,30)
M-3/02						-	SC (0,33)	SC (0,39)	SC (0,42)	SC (0,34)	SC (0,38)
M-4/09							-	SC (0,28)	SC (0,30)	C (0,28)	SC (0,34)
M-44/08								-	C (0,38)	SC (0,34)	C (0,33)
M-53/08									-	C (0,26)	I (0,34)
M-58/07										-	C (0,31)

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

NOTAS: C - Compatível. SC - Semicompatível. I - Incompatível. Dissimilaridade se encontra entre parênteses. * Ambos os genótipos não tiveram um dos seus alelos S identificados, sendo considerados semicompatíveis.

Tabela 14 – Nível de compatibilidade e dissimilaridade entre os genótipos de macieira avaliados estimada pelo algoritmo de Gower (Conclusão).

	M-9/07	Monalisa	Cripps Pink	Venice
141/38	C (0.36)	SC (0.38)	SC (0.34)	SC (0.38)
Elenise	SC (0.39)	C (0.36)	SC (0.34)	SC (0.28)
Fred Hough	SC (0.34)	C (0.31)	C (0.37)	C (0.25)
SciFresh	C (0.42)	SC (0.39)	SC (0.47)	C (0.34)
Kinkas	C (0.49)	C (0.49)	C (0.42)	SC (0.46)
Luiza	C (0.25)	C (0.36)	C (0.42)	SC (0.28)
M-1/02	I (0.30)	C (0.31)	C (0.39)	SC (0.29)
M-1/07	SC (0.28)	C (0.40)	C (0.46)	SC (0.32)
M-10/09	C (0.40)	C (0.37)	SC (0.33)	C (0.21)
M-11/00	SC (0.40)	C (0.39)	C (0.36)	SC (0.3)
M-11/01	SC (0.40)	C (0.40)	C (0.42)	SC (0.26)
M-11/92	C (0.33)	SC (0.39)	SC (0.44)	C (0.36)
M-12/00	SC (0.44)	C (0.41)	C (0.37)	SC (0.35)
M-13/00	I (0.40)	C (0.36)	C (0.39)	SC (0.29)
M-13/91	SC (0.34)	C (0.38)	C (0.45)	SC (0.30)
M-15/01	I (0.36)	C (0.34)	C (0.32)	SC (0.30)
M-21/08	SC (0.32)	C (0.40)	C (0.45)	SC (0.36)
M-23/07	SC (0.30)	C (0.33)	C (0.44)	SC (0.32)
M-3/02	SC (0.45)	C (0.38)	C (0.43)	SC (0.36)
M-4/09	SC (0.32)	C (0.38)	C (0.39)	SC (0.32)
M-44/08	C (0.32)	C (0.40)	C (0.39)	C (0.28)
M-53/08	I (0.33)	C (0.37)	C (0.38)	SC (0.31)
M-58/07	C (0.38)	C (0.40)	C (0.32)	SC (0.30)
M-8/01	I (0.35)	C (0.30)	C (0.34)	SC (0.30)
M-9/07	-	C (0.36)	C (0.49)	SC (0.37)
Monalisa		-	C (0.36)	SC (0.33)
Cripps Pink			-	C (0.35)

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

NOTAS: C - Compatível. SC - Semicompatível. I - Incompatível. Dissimilaridade se encontra entre parênteses

3.4 CONCLUSÃO

1. Com base na caracterização para os descritores mínimos da macieira, o conjunto dos genótipos avaliados apresentou dissimilaridade média de 35 %, formando sete grupos pelo método de agrupamento UPGMA, sendo cinco deles com apenas um genótipo.

2. Os marcadores de DNA descritos na literatura são eficientes para a identificação do genótipo do loco S em macieira, sendo que a grande maioria dos alelos S foram identificados neste trabalho.

3. A utilização dos marcadores de DNA é ainda mais útil se utilizada em conjunto com a caracterização morfoagronômica das seleções e cultivares a serem utilizadas em cruzamentos dirigidos, possibilitando e ao mesmo tempo facilitando a previsão de combinações para cruzamentos dirigidos visando a geração de populações segregantes para seleção.

CAPÍTULO 4 - Utilização de marcadores de DNA como ferramenta auxiliar na seleção de genótipos polinizadores de macieira

RESUMO

Os pomares de macieira exigem a presença de uma cultivar ou genótipo diferente da cultivar copa para que haja a produção de frutos devido a autoincompatibilidade gametofítica presente no gênero *Malus*. A cultivar copa e a polinizadora devem apresentar total compatibilidade genética a fim de assegurar a formação simétrica e adequada dos frutos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da utilização de marcadores de DNA para a série alélica S na escolha indireta de genótipos polinizadores. Para isso, foram avaliadas três novas cultivares de macieira desenvolvidas pela Epagri e suas respectivas seleções polinizadoras. Os testes de polinização a campo foram conduzidos em delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições constituídas por 25 inflorescências de duas flores cada, polinizadas artificialmente com distintas seleções polinizadoras. Foram mensurados o número de frutos formados por inflorescência, o número de sementes por frutos, o número de sementes viáveis por fruto e a porcentagem de sementes viáveis por fruto. A identificação dos alelos S foi realizada via PCR, com a utilização de conjuntos de iniciadores específicos para os 16 alelos S mais comumente encontrados em cultivares desenvolvidas no Brasil. Os resultados obtidos pelos testes de polinização a campo não demonstraram diferença significativa na frutificação entre quaisquer das cultivares copas e suas respectivas seleções polinizadoras testadas. Porém, levando em consideração os genótipos do loco S, identificou-se seleções semicompatíveis com as cultivares copa. Diante disso, sugere-se que a determinação das seleções polinizadoras deve basear-se, também, na compatibilidade genética entre a cultivar copa e a (s) possível (s) polinizadora (s), para que, quando as combinações forem utilizadas em pomares comerciais, não evidenciem riscos de diminuição ou perda de produção pelo nível parcial de compatibilidade.

Palavras-chave: *Malus domestica* Borkh. Alelos S. Cultivares copa. Polinizadoras de macieira. Autoincompatibilidade gametofítica.

ABSTRACT

The apple orchards require the presence of a different genotype or cultivar of the producing plant due to gametophytic self-incompatibility present in the genus *Malus*. The producing plant and the pollinator should be fully genetically compatible to ensure symmetrical and adequate fruit formation. The objective of this work was to evaluate the efficiency of the use of DNA markers for the S alleles identification in the indirect choice of pollinator genotypes. For this, three new apple cultivars developed by Epagri and their respective pollinating selections were evaluated. The pollination tests were conducted in a randomized block design with four replicates consisting of 25 inflorescences of two flowers each, artificially pollinated with different pollinator selections. The number of fruits formed per inflorescence, the number of seeds per fruit, the number of viable seeds per fruit and the percentage of viable seeds per fruit were measured. The identification of the S alleles was performed using specific sets of primers for the 16 S alleles most commonly found in cultivars developed in Brazil. The results obtained by field pollination tests did not show a significant difference in

fruit yield between any of the cultivars and their respective pollinator selections tested. However, taking into account the loco S genotypes, semi-compatible selections with the producing plant cultivars were identified. Therefore, it is suggested that the determination of the pollinator selections should also be based on the genetic compatibility between the cultivar and the possible pollinator (s), so that when the combinations are used in Commercial orchards, do not show risks of decrease or loss of production by the partial level of compatibility.

Keywords: *Malus domestica* Borkh. Alleles S. Cultivars. Pollinators of apple trees. Gametophytic self-incompatibility.

4.1 INTRODUÇÃO

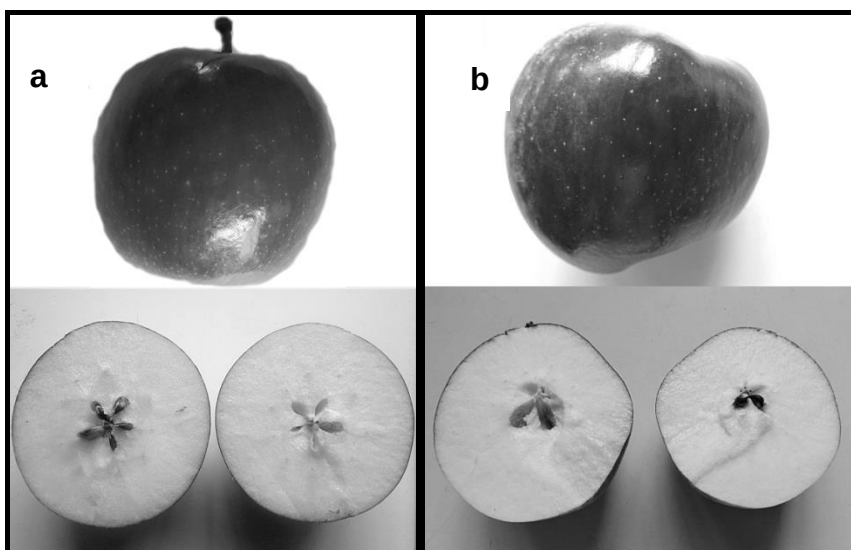
Embora apresente flores hermafroditas, a macieira (*Malus domestica* Borkh.) depende de polinização cruzada para a fertilização das flores e, consequente formação de frutos. Essa necessidade ocorre devido ao mecanismo de autoincompatibilidade gametofítica, que consiste na incapacidade de uma planta fértil produzir descendentes por autofecundação ou por cruzamentos com genótipos que apresentem os mesmos alelos no loco S (ALLARD, 1971).

O processo de polinização inicia quando o grão de pólen maduro é liberado pelas anteras e termina com a fertilização do óvulo (ZIMMER, 2006; NEDEL, 2003). Contudo, no intervalo entre esses acontecimentos existem vários fatores que interferem na efetividade da polinização, uma vez que a viabilidade dos gametas femininos e masculinos, desde o momento da sua síntese até o momento da fertilização e formação do zigoto, é dependente da constituição genética e das condições de ambiente que interagem durante todo esse processo.

Todos os pomares comerciais de macieira são compostos pelas cultivares produtoras dos frutos (cultivares copa) e por outro genótipo utilizado como planta polinizadora. As plantas polinizadoras devem apresentar épocas de floração coincidentes com as plantas produtoras dos frutos e exigências edafoclimáticas similares para possibilitar o manejo o mais próximo possível ao adotado para as cultivares copa (MATSUMOTO, 2014; SCHIFINO-WITTMANN e DALL'AGNOL, 2002; ALBUQUERQUE JUNIOR, 2005). Além disso, as plantas necessitam ser geneticamente compatíveis (MOTA, TAVARES e OLIVEIRA, 2006; MATSUMOTO, 2014), pois o crescimento do tubo polínico na flor polinizada é inibido quando o alelo S presente na célula haploide do grão de pólen depositado for igual à um dos alelos S expressos no pistilo da flor polinizada (MATSUMOTO et al., 1999).

Para assegurar a formação de frutos com formato simétrico e com desenvolvimento normal é necessária a formação de pelo menos uma semente em cada um dos cinco carpelos que normalmente formam as flores no gênero *Malus* (DENARDI e STUKER, 2008). A formação das maçãs é induzida por hormônios liberados pelos embriões em desenvolvimento, por isso há a necessidade de fecundação dos óvulos e, conseqüente, formação de sementes em todos os carpelos para garantir o formato adequado dos frutos (EPAGRI, 2006). Na Figura 6 estão apresentados exemplos de frutos com formação de sementes em todos os carpelos (a), e frutos com a formação de sementes em apenas alguns carpelos (b). A quantidade de sementes formadas ou não em cada carpelo é um dos parâmetros utilizados na avaliação a campo do grau de compatibilidade genética entre plantas de macieira.

Figura 6 - Frutos de macieiras apresentando diferentes formas. a) fruto de formato e desenvolvimento normais, com formação de sementes em todos os carpelos; b) fruto apresentando má formação, com desenvolvimento de sementes em apenas três dos cinco carpelos.



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

Na autoincompatibilidade gametofítica, teoricamente, quando existirem alelos comuns entre genitores masculinos e femininos ocorrerá aborto do grão de pólen, ou seja, quando houver autofecundação ou quando os genitores possuírem o mesmo par de alelos, haverá 100 % de aborto de pólen e, por conseqüência, nenhum descendente (semente) será formado. Já na presença de um alelo em comum entre os genitores, ocorrerá a semicompatibilidade. Entretanto, algumas vezes a semi-

incompatibilidade causa má formação de frutos, o que é indesejado por depreciar a aparência e, conseqüentemente, o valor comercial das maçãs. Quando todos os alelos envolvidos no cruzamento são diferentes, há possibilidade de formação de 100 % das sementes potenciais em cada lóculo da cavidade carpelar e, garantia de adequado desenvolvimento dos frutos em função da presença de sementes (RAMALHO et al., 2012; BATLLE et al., 1995; BROOThAERTS et al., 1995; VAN NERUN et al. 2001; MATSUMOTO, 2014; YAMANE e TAO, 2009).

O conhecimento do genótipo do loco S permite a seleção e uso de polinizadoras geneticamente compatíveis com as cultivares frutíferas, o que pode auxiliar no sucesso da produção de maçãs. A compatibilidade entre plantas de macieira ainda é, na grande maioria das vezes, exclusivamente determinada por meio de experimentos a campo, que são muito demorados, de difícil interpretação e com resultados variáveis (HEO et al., 2012; MATSUMOTO, 2014). A utilização de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar ao melhoramento clássico pode dinamizar a avaliação de algumas características específicas, bem como, proporcionar maior rapidez ao processo de avaliação. Nesse sentido a caracterização genética dos alelos S via marcadores de DNA representa uma alternativa viável visando a diminuição dos recursos gastos para a realização dos testes a campo (ALBUQUERQUE JUNIOR, 2005; HEGEDÜS, 2006 YAMANE e TAO, 2009; HALÁSZ et al., 2011). Além disso, apresentam elevada importância no sentido de gerar informações prévias para a escolha de possíveis genótipos polinizadores de novas cultivares, tanto em nível experimental quanto para a implantação de pomares comerciais.

Os objetivos desse trabalho foram identificar os alelos do loco S de seleções polinizadoras para três novas cultivares de macieira da Epagri, SCS425 Luiza, SCS426 Venice e SCS427 Elenise, determinando o nível de compatibilidade gametofítica entre as mesmas; avaliar a capacidade de fertilização das seleções polinizadoras em suas respectivas cultivares copa por meio de cruzamentos testes a campo; e, utilizando o nível de compatibilidade e as informações geradas nos testes a campo, sugerir quais são as polinizadoras mais adequadas para cada cultivar avaliada.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para análise da compatibilidade entre as cultivares produtoras de frutos e as plantas polinizadoras foram avaliadas as cultivares SCS425 Luiza, a SCS426 Venice e a SCS427 Elenise, e sete seleções polinizadoras, todas desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri (Tabela 15).

Tabela 15 - Cultivares copa de macieira e respectivas seleções polinizadoras em teste.

Cultivares copa	Polinizadoras
SCS425 Luiza	135/114
	135/140
	140/191
	140/228
	SCS426 Venice
SCS426 Venice	135/140
	140/126
	140/191
	140/228
SCS427 Elenise	SCS425 Luiza
	140/494
	140/144
	140/191
	140/228

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

As combinações propostas foram definidas pelo Programa de Melhoramento Genético da Epagri a partir de dados históricos de fenologia (Tabela 16, Tabela 17 e Tabela 18), visando garantir principalmente a coincidência do período de floração entre a cultivar e a seleção polinizadora, associado ao histórico de produção e germinação dos grãos de pólen (viabilidade), testados em condições de laboratório.

Tabela 16 - Época de florescimento da cultivar SCS425 Luiza e respectivas polinizadoras em avaliação ao longo de diversos ciclos de cultivo.

Genótipo	Ciclo	Época de florescimento - meses																											
		Setembro														Outubro													
		1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21		
SCS425 Luiza	2012/2013																												
	2013/2014																												
	2014/2015																												
135/114	2007-2008																												
	2008-2009																												
	2010-2011																												
	2011-2012																												
	2013-2014																												
	2014-2015																												
	2014-2015																												
135/140	2007-2008																												
	2008-2009																												
	2010-2011																												
	2011-2012																												
	2013-2014																												
	2014-2015																												
140/191	2007-2008																												
	2008-2009																												
	2011-2012																												
	2013-2014																												
	2014-2015																												
140/228	2007-2008																												
	2008-2009																												
	2010-2011																												
	2011-2012																												
	2013-2014																												
	2014-2015																												
SCS426 Venice	2012/2013																												
	2013/2014																												
	2014/2015																												

Fonte: Elaborada pela autora, 2016, com base nos dados disponibilizados pela Epagri, 2016.

Tabela 17 - Época de florescimento da cultivar SCS426 Venice e respectivas polinizadoras em avaliação ao longo de diversos ciclos de cultivo.

Genótipo	Ciclo	Época de florescimento - meses																											
		Setembro														Outubro													
		1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21		
SCS426 Venice	2012/2013																												
	2013/2014																												
	2014/2015																												
135/140	2007-2008																												
	2008-2009																												
	2010-2011																												
	2011-2012																												
	2013-2014																												
	2014-2015																												
140/126	2010-2011																												
	2011-2012																												
	2013-2014																												
	2014-2015																												
140/191	2007-2008																												
	2008-2009																												
	2011-2012																												
	2013-2014																												
	2014-2015																												
140/228	2007-2008																												
	2008-2009																												
	2010-2011																												
	2011-2012																												
	2013-2014																												
	2014-2015																												
SCS425 Luiza	2012/2013																												
	2013/2014																												
	2014/2015																												

Fonte: Elaborada pela autora, 2016, com base nos dados disponibilizados pela Epagri, 2016.

Tabela 18 - Época de florescimento da cultivar SCS427 Elenise e respectivas polinizadoras em avaliação ao longo de diversos ciclos de cultivo.

Genótipo	Ciclo	Época de florescimento - meses																											
		Setembro														Outubro													
		1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21		
SCS427 Elenise	2012/2013															26/set à 6/out													
	2013/2014															26/set à 12/out													
140/144	2011-2012							11/set à 18/set																					
	2012-2013															26/set à 19/out													
	2014-2015			2/set à 14/set																									
140/191	2007-2008														18/set à 9/out														
	2008-2009							11/set à 6/out																					
	2011-2012			1/set à 24/set																									
	2013-2014															26/set à 19/out													
	2014-2015			4/set à 16/set																									
140/228	2007-2008														21/set à 15/out														
	2008-2009														16/set à 12/out														
	2010-2011														14/set à 10/out														
	2011-2012														11/set à 5/out														
	2013-2014															26/set à 19/out													
	2014-2015							8/set à 16/set																					
140/494	2007-2008														25/set à 9/out														
	2008-2009															24/set à 20/out													
	2011-2012														18/set à 28/set														
	2013-2014															26/set à 15/out													
	2014-2015			2/set à 14/set																									

Fonte: Elaborada pela autora, 2016, com base nos dados disponibilizados pela Epagri, 2016.

4.2.1 TESTES DE COMPATIBILIDADE A CAMPO

O experimento para avaliação da frutificação efetiva das cultivares copa polinizadas por diferentes seleções polinizadoras foi conduzido na Epagri - Estação Experimental de Caçador - SC, durante a estação de cultivo 2014/2015, em delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições. Cada repetição foi formada por 25 inflorescências, nas quais foram selecionadas duas flores por inflorescência em estágio de balão rosado, que foram emasculadas e polinizadas artificialmente. Após as polinizações, cada inflorescência foi protegida com embalagem de papel craft por pelo menos 72 horas, para evitar possível contaminação por pólen de outras origens.

Para avaliação do potencial de polinização de cada uma das respectivas seleções polinizadoras foram mensurados: o número de frutos formados por

inflorescência (NFPI, em unidade); o número de sementes por fruto (NSPF, em unidade); o número de sementes viáveis por fruto (NSVPF, em unidade); e a porcentagem de sementes viáveis por fruto (PSVPF). Aceitou-se como sementes viáveis as sementes que apresentaram o tegumento íntegro e o endosperma formado.

Conjuntamente com a polinização de cada cultivar pelas suas respectivas seleções polinizadoras, foi avaliado um tratamento controle composto pela emasculação das flores das cultivares copa e proteção com embalagem de papel craft por pelo menos 72 horas, sem a realização de polinização artificial.

Para a cultivar SCS425 Luiza, visando atender as pressuposições da análise de variância para a variável número de frutos por inflorescência, foram realizadas as transformações dos dados por raiz quadrada de $x + 1$ [$\sqrt{(x+1)}$], sendo 'x' os valores originais observados. Os dados foram submetidos à análise de variância e à análise de médias pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

4.2.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

As cultivares produtoras e as seleções polinizadoras tiveram seu genótipo do loco S identificado via técnica de PCR, utilizando marcadores de DNA específicos. Na reação de amplificação, cultivares padrões foram utilizadas como controle positivo para o uso de cada conjunto de iniciadores associados aos 16 alelos S mais frequentes nas cultivares desenvolvidas no Brasil, conforme Tabelas 19 e 20, respectivamente. A nomenclatura dos alelos S utilizada no trabalho é a proposta por Broothaerts, Van Nerum e Keulemans (2004).

Folhas jovens e sadias de cada genótipo de macieira foram coletadas aleatoriamente, acondicionadas em pacotes plásticos e armazenadas em freezer a -20 °C, até o momento da realização da extração de DNA. A extração de DNA foi realizada utilizando protocolo proposto por Lefort e Douglas (1999), com modificações propostas por Revers et al. (2005), utilizando 0,1 g de tecido vegetal macerado de cada amostra.

Cada reação padrão de PCR teve em sua concentração final 1 U de Taq DNA polimerase (Platinum® - Invitrogen); tampão da enzima 1x; 2,00 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs; 1 µM de cada iniciador (*forward* e *reverse*); e 50 ng de DNA genômico.

Tabela 19 - Cultivares utilizadas como controle positivo para os respectivos alelos caracterizados molecularmente e respectivas referências de identificação.

Cultivar referência	Alelo	Nº GeneBank	Referências
Fuji (S^1S^9)	S^1	D50837	Sassa et al. (1996)
Golden Delicious (S^2S^3)	S^2	U12199	Broothaerts et al. (1995)
Golden Delicious (S^2S^3)	S^3	U12200	Broothaerts et al. (1995)
Gloster (S^4S^{19})	S^4	AF327223	Van Nerum et al. (2001)
Gala (S^2S^5)	S^5	U19791	Janssens et al. (1995)
Marubakaido (S^6S^{26})	S^6	-	Agapito-Tenfen et al. (2015)
Idared (S^3S^7)	S^7	AB032246	Janssens et al. (1995); Kitahara et al. (2000)
Fuji (S^1S^9)	S^9	D50836	Janssens et al. (1995); Sassa et al. (1996)
McIntosh ($S^{10}S^{22}$)	S^{10}	AB052683	Richman, Broothaerts e Kohn (1997); Kitahara e Matsumoto (2002); Van Nerum et al. (2001)
Baskatong ($S^{16}S^{26}$)	S^{16}	AF016919	Verdoodt et al. (1998)
Alkmene (S^5S^{22})	S^{22}	AF327222	Van Nerum et al. (2001)
Delicious (S^9S^{19})	S^{19}	AB035273	Matsumoto e Kitahara (2000)
Mutsu ($S^2S^3S^{20}$)	S^{20}	AB019184	Matsumoto et al. (1999)
Granny Smith (S^3S^{23})	S^{23}	AF239809	Schneider et al. (2001)
Braeburn (S^9S^{24})	S^{24}	AF016920	Kitahara et al. (2000); Verdoodt et al. (1998)
Marubakaido (S^6S^{26})	S^{26}	-	Agapito-Tenfen et al. (2015)

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador T100™ BioRad® com a seguinte configuração: 3 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), seguido por 30 ciclos, compostos pelas etapas de desnaturação (94 °C por 1 minuto), pareamento (45-60 °C, dependendo das características dos iniciadores, conforme Tabela 20, por 1 minuto) e extensão (72 °C por 1 minuto), seguindo-se de uma etapa final de extensão (72 °C por 7 minutos), e mantendo a temperatura fixa em 4 °C após a finalização do processo de amplificação. Para a discriminação dos alelos S^4 , S^{16} e S^{22} , parte do produto amplificado na PCR (10 µL) foi digerido pela enzima de restrição Taq I (por 1 h, à 65 °C). Da mesma forma, para a discriminação do alelo S^{20} , 10 µL do produto amplificado na PCR foram digeridos pela enzima de restrição Nar I (por 4 h, à 37 °C). Para os iniciadores S^{10} modificado e $S^3/S^5/S^{10}$ as configurações das reações de amplificação e a digestão por enzimas de restrição estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 - Sequência de nucleotídeos de cada iniciador e condições de PCR específicas para cada alelo S testado.

Alelo	Iniciadores	Sequências (5' -> 3')	Temperatura de pareamento °C	Fragmento amplificado (pb)
S ¹	FTC168 FTC169	ATATTGTAAGGCACCGCCATATCA T GGTTCTGTATTGGGGAAGACGCAC AA	60	530
S ²	OWB122 OWB123	GTTCAAACGTGACTTATGCG GGTTTGGTTCCTTACCATGG	60	449
S ³	FTC177 FTC226	CAAACGATAACAAATCTTAC TATATGGAAATCACCATTCTG	55	500
S ⁴	FCT5 OWB249	TCCCACAATACAGAACGAGA CAATCTATGAAATGTGCTCTG	60, Taq I	274 (194+77)
S ⁵	FTC10 FTC11	CAAACATGGCACCTGTGGGTCTCC TAATAATGGATATCATTGGTAGG	59	346
S ⁶	FTC141 FTC142	ATCAGCCGGCTGTCTGCCACTC AGCCGTGCTCTTAATACTGAATAC	58, E 45	850
S ⁷	FTC143 FTC144	ACTCGAATGGACATGACCCAGT TGTCGTTTATTATTGTTGGGATGTC	60	302
S ⁹	OWB154 OWB155	CAGCCGGCTGTCTGCCACTT CGGTTTCGATCGAGTACGTTG	62	343
S ¹⁰	FTC12 FTC228	CCAAACGTAATCAATCGAAG ATGTCGTCCCGTGTCTGAATC	60	209
S ¹⁶	FTC5 OWB249	TCCCACAATACAGAACGAGA CAATCTATGAAATGTGCTCTG	60, Taq I	274 (243+31)
S ¹⁹	FTC229 FTC230	TCTGGGAAAGAGAGTGGCTC TTTATGAACTTCGTTAAGTCTC	60	304
S ²⁰	FTC141 FTC142	ATCAGCCGGCTGTCTGCCACTC AGCCGTGCTCTTAATACTGAATAC	60, E 45, Nar I	920 (800+120)
S ²²	FTC5 OWB249	TCCCACAATACAGAACGAGA CAATCTATGAAATGTGCTCTG	60, Taq I	274 (199+44+31)
S ²³	FTC222 FTC224	CAATCGAACCAATCATTGGT GGTGTCATATTGTTGGTACTAATG	60	237
S ²⁴	FTC231 FTC232	AAATATTGCAACGCACAGCA TTGAGAGGATTTCAGAGATG	60	580
S ²⁶	FCT14 FTC9	GAAGATGCCATACGCAATGG TTTAATACCGAATATTGGCG	54	194
* S ¹⁰ modificado		AACAAATCTTAAAGCCAGC GGTTTCTTATAGTCGATACTTTG	60	-
** S ³ /S ⁵ /S ¹⁰		CAATTTACGCAGCARTATCAG TGTTTTGAATYGAAAATTARTTAGGAGT	58	-

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

NOTAS: E 45 = Extensão de 45 segundos.

Valores entre parênteses se referem ao tamanho de fragmento gerado após a digestão com as respectivas enzimas de restrição

* Iniciador proposto por Kitahara e Matsumoto (2002) para identificação do alelo S¹⁰. Reação de amplificação modificada para: 3 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), seguido por 30 ciclos, compostos pelas etapas de desnaturação (94 °C por 1 minuto), pareamento (60 °C por 1 minuto) e extensão (72 °C por 1 minuto), seguindo-se de uma etapa final de extensão (72 °C por 10 minutos), mantendo-se a temperatura fixa em 4 °C após a finalização do processo de amplificação. Tamanho do fragmento amplificado de 282 pb e quando tratado com a enzima Nar I gera dois fragmentos: 185 e 97 pb.

** Iniciador proposto por Larsen et al. (2016) para identificação dos alelos S³, S⁵ e S¹⁰. Reação de amplificação modificada para: 2 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), seguido por 33 ciclos, compostos pelas etapas de desnaturação (94 °C por 20 segundos), pareamento (58 °C por 20 segundos) e extensão (72 °C por 2 minutos), seguindo-se de uma etapa final de extensão (72 °C por 5 minutos), mantendo-se a temperatura fixa em 4 °C após a finalização do processo de amplificação. Tamanho dos fragmentos amplificados antes e depois do tratamento com a enzima Taq I, respectivamente: S³ = 423 pb, 264 pb; S⁵ = 399 pb, 273 pb; S¹⁰ = 382 pb, não fragmentado pela enzima de restrição.

Após a reação de PCR, os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3%, utilizando o marcador de peso molecular de 50 pb para auxiliar na identificação de cada alelo S. As amostras foram coradas com o fluoróforo intercalante GelRed®. A leitura do perfil dos fragmentos amplificados foi realizada mediante análise de imagem capturada em fotodocumentador Kodak Geologic 2012 Pró.

Foram considerados como presentes os alelos S identificados em cada um dos genótipos quando ocorreram amplificações de fragmentos de tamanho conhecido, conforme indicado na literatura, e coincidentes aos fragmentos amplificados nas cultivares utilizadas como controle positivo para a presença de cada alelo S.

Considerando a segregação esperada para os alelos S e a caracterização prévia do loco S de um dos genitores de cada seleção polinizadora, realizada por Albuquerque Junior (2005), alguns alelos S seriam passíveis de estarem presentes nas seleções polinizadoras e estão apresentados na Tabela 21. As seleções polinizadoras com identificação 135/___ são resultantes da polinização aberta da cultivar Imperatriz (S^3S^5) e as seleções identificadas por 140/___ são descendentes da cultivar Baronesa (S^3S^9) com polinização aberta.

Tabela 21 - Possíveis alelos S em seleções polinizadoras de cultivares de macieira com base na genealogia dos respectivos genitores, realizada por Albuquerque Junior (2005).

SCS425 Luiza (S ⁵ S ⁹)		Possíveis alelos			
		Genitor feminino		Genitor masculino	
135/114	S ³	S ⁵	S [?]	S [?]	
135/140	S ³	S ⁵	S [?]	S [?]	
140/191	S ³	S ⁹	S [?]	S [?]	
140/228	S ³	S ⁹	S [?]	S [?]	
SCS426 Venice		S ⁹		S ³	
SCS426 Venice (S ³ S ⁹)		Possíveis alelos			
		Genitor feminino		Genitor masculino	
135/140	S ³	S ⁵	S [?]	S [?]	
140/126	S ³	S ⁹	S [?]	S [?]	
140/191	S ³	S ⁹	S [?]	S [?]	
140/228	S ³	S ⁹	S [?]	S [?]	
SCS425 Luiza		S ⁵		S ⁹	
SCS427 Elenise (S ³ S ²³)		Possíveis alelos			
		Genitor feminino		Genitor masculino	
140/494	S ³	S ⁵	S [?]	S [?]	
140/144	S ³	S ⁹	S [?]	S [?]	
140/191	S ³	S ⁹	S [?]	S [?]	
140/228	S ³	S ⁹	S [?]	S [?]	

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

NOTAS: $S^?$: alelo S não identificado.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 TESTES DE COMPATIBILIDADE A CAMPO

Baseando-se apenas nas épocas de floração das cultivares e suas respectivas seleções polinizadoras (Tabelas 16, 17 e 18), algumas seleções se mostram mais adequadas para serem utilizadas como polinizadoras das respectivas cultivares copa devido ao maior período de coincidência da floração entre ambas. São elas: 135/114, 140/228 e SCS426 Venice para a cultivar SCS425 Luiza; 140/126, 140/228 e SCS425 Luiza para a cultivar SCS426 Venice; e a seleção 140/228 para a cultivar SCS427 Elenise. Desconsiderando o ciclo vegetativo de 2014-2015, que apresentou período de floração atípico na grande maioria dos genótipos avaliados, as seleções citadas anteriormente seriam as mais adequadas para a polinização das cultivares com base nos demais anos de avaliação do período de floração. Porém, além do período de floração coincidente, as plantas polinizadoras devem ser capazes de fertilizar as flores de suas respectivas cultivares copa.

Todas as seleções polinizadoras testadas foram eficientes em promover a fecundação das flores da cultivar SCS425 Luiza via polinização artificial, não diferindo entre si quanto ao NFPI. Em média, verificou-se a formação de pelo menos um fruto por inflorescência polinizada, sendo que os genótipos 135/114 e SCS426 Venice proporcionaram a formação de maior número de sementes por fruto que a seleção 140/191 e que o tratamento controle, mas o número de sementes formadas por elas não diferiu das seleções 135/140 e 140/228. Não houve diferença no número de sementes viáveis por fruto e na porcentagem de sementes viáveis por fruto entre as cinco seleções polinizadoras testadas (Tabela 22).

No tratamento controle da cultivar SCS425 Luiza, o qual é constituído de flores emasculadas e ausência de polinização artificial, houve a produção média de 0,06 frutos por inflorescência emasculada, porém não houve formação de sementes nesses frutos. No gênero *Malus* há uma pequena possibilidade (~5 %) da formação de frutos ocorrer por partenocarpia, que é caracterizada pela formação de frutos sem fecundação dos óvulos, o que resulta na ausência de sementes ou na existência de sementes estéreis (HEGEDÜS, 2006). Por esse motivo, sugere-se que a cultivar

SCS425 Luiza apresenta uma pequena taxa de produção de frutos por partenocarpia, já que nos frutos avaliados não havia produção de sementes.

Tabela 22 - Análise de variância e desempenho médio de genótipos de macieira utilizados como doadores de pólen para a cultivar SCS425 Luiza.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio			
		NFPI	NSPF	NSVPF	PSVPF
		----- unidade -----			----- % -----
Bloco	3	0,01	1,51	1,64	240,63
Polinizadora	5	0,17**	28,85**	18,11**	4081,04**
Erro	15	0,00	0,22	0,40	39,60
Média geral	--	1,44	5,39	4,22	64,70
CV (%)	--	3,14	8,62	14,92	9,73

Genótipo da planta polinizadora	Desempenho médio			
	NFPI	NSPF	NSVPF	PSVPF
	----- unidade -----			----- % -----
135/114	1,33 a	7,01 a	5,56 a	79,60 a
135/140	1,40 a	6,18 ab	4,37 a	70,00 a
140/191	1,21 a	5,79 b	4,73 a	81,17 a
140/228	1,32 a	6,28 ab	4,93 a	77,94 a
Venice	1,36 a	7,06 a	5,71 a	79,49 a
Controle	0,06 b	0,00 c	0,00 b	0,00 b

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

NOTAS: ** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F. Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. NFPI = Número de frutos formados por inflorescência; NSPF = Número de sementes por fruto; NSVPF = Número de sementes viáveis por fruto; PSVPF = Porcentagem de sementes viáveis por fruto.

Na cultivar SCS426 Venice, houve diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis NFPI, NSPF e NSVPF, porém todos os genótipos polinizadores testados apresentaram o mesmo comportamento para esses caracteres, diferindo apenas do tratamento controle (Tabela 23).

O número de sementes viáveis por fruto na cultivar SCS426 Venice foi maior que sete para todas seleções testadas, representando mais que 90 % do total de sementes formadas em cada fruto. Não houve diferença significativa entre a porcentagem de sementes viáveis por fruto das diferentes seleções polinizadoras e do tratamento controle.

Em relação ao tratamento controle da SCS426 Venice, houve formação de frutos (0,03 frutos por inflorescência) com sementes viáveis (0,15 sementes viáveis por fruto). Devido a formação de sementes nos frutos, descarta-se a partenocarpia e sugere-se a contaminação cruzada por pólen exógeno ou, até mesmo, a possibilidade de que os frutos formados sejam resultantes de autofecundação. Para a diferenciação dessas duas possibilidades pode ser realizada a genotipagem dos

alelos S das plântulas provenientes da germinação das sementes produzidas pelos frutos do tratamento controle. Se forem identificados alelos S iguais aos alelos S da cultivar SCS426 Venice, há grande probabilidade ter ocorrido autofecundação.

Tabela 23 - Análise de variância e desempenho médio de genótipos de macieira utilizados como doadores de pólen para a cultivar SCS426 Venice.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio			
		NFPI	NSPF	NSVF	PSVF
		----- unidade -----			----- % -----
Bloco	3	0,38	0,43	0,10	470,26
Polinizadora	5	0,77**	44,56**	39,72**	1299,12 ^{ns}
Erro	15	0,05	0,23	0,24	590,53
Média geral	--	0,90	6,95	6,56	86,67
CV (%)	--	23,72	6,91	7,53	28,04

Genótipo da planta polinizadora	Desempenho médio			
	NFPI	NSPF	NSVF	PSVF
	----- unidade -----			----- % -----
135/140	0,89 a	8,05 a	7,57 a	93,84
140/126	1,23 a	8,27 a	7,98 a	96,36
140/191	1,05 a	8,57 a	8,06 a	93,14
140/228	1,08 a	8,58 a	8,08 a	94,52
Luiza	1,10 a	8,06 a	7,54 a	92,19
Controle	0,03 b	0,15 b	0,15 b	100,00

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

NOTAS: ** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F. Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. NFPI = Número de frutos formados por inflorescência; NSPF = Número de sementes por fruto; NSVPF = Número de sementes viáveis por fruto; PSVPF = Porcentagem de sementes viáveis por fruto.

Em média, verificou-se a formação de pelo menos um fruto por inflorescência polinizado na cultivar SCS427 Elenise por todas as seleções polinizadoras testadas e 0,08 frutos no tratamento controle, conforme Tabela 24. Houve a formação de, ao menos, seis sementes por fruto nos tratamentos envolvendo as seleções polinizadoras, das quais mais de 80 % do total de sementes formadas nesses frutos eram sementes viáveis. Não foi identificada diferença significativa entre a porcentagem de sementes viáveis por frutos dentre todos os tratamentos avaliados.

Da mesma forma que ocorreu com a SCS426 Venice, houve produção de frutos com desenvolvimento de sementes no tratamento controle da cultivar SCS427 Elenise. Todavia, o número de sementes formadas teve menor proporção em comparação ao número de frutos formados nessa cultivar. Por esse motivo, sugere-se que os frutos sejam resultantes de autofecundação ou que sejam decorrentes da contaminação cruzada por pólen de um genótipo semicompatível, devido ao baixo número de sementes formadas por fruto.

Tabela 24 - Análise de variância e desempenho médio de genótipos de macieira utilizados como doadores de pólen para SCS427 Elenise.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio			
		NFPI	NSPF	NSVF	PSVF
		----- unidade -----			
Bloco	3	0,14	0,88	1,93	950,74
Polinizadora	4	1,17**	37,83**	29,97**	175,75 ^{ns}
Erro	12	0,03	0,19	0,32	426,21
Média geral	--	1,03	5,52	4,90	85,62
CV (%)	--	17,58	7,82	11,54	24,11
Genótipo da planta polinizadora		Desempenho médio			
		NFPI	NSPF	NSVF	PSVF
		----- unidade -----			
140/494		1,09a	6,53a	5,51a	83,32
140/144		1,40a	7,12a	6,44a	90,42
140/191		1,23a	6,79a	6,20a	90,58
140/228		1,33a	7,13a	6,29a	88,79
Controle		0,08b	0,04b	0,04b	100,00

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

NOTAS: ** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F. Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. NFPI = Número de frutos formados por inflorescência; NSPF = Número de sementes por fruto; NSVPF = Número de sementes viáveis por fruto; PSVPF = Porcentagem de sementes viáveis por fruto.

4.3.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ALELOS S EM SELEÇÕES DE MACIEIRA TESTADAS COMO POLINIZADORAS

Levando em conta o padrão de banda formado pelos produtos da PCR amplificados em cultivares de referência (controles positivos) utilizando os iniciadores específicos para 16 alelos S, o genótipo completo do loco S das polinizadoras 135/114, 140/126, 140/228 e 140/494 pode ser identificado, sendo que para as outras três seleções (135/140, 140/144 e 140/191) apenas um alelo foi identificado, conforme Tabela 25.

As seleções 135/114 e 135/140 são descendentes da cultivar Imperatriz (S^3S^5), sendo que nas duas foi identificado o alelo S^3 , herdado dessa cultivar. Porém, como ambas são resultado de polinização aberta, não existia nenhuma referência para auxiliar na identificação do segundo alelo. No entanto, para a seleção 135/114 foi identificado o alelo S^{19} , mas para a seleção 135/140 não foi possível identificar o segundo alelo com o uso dos 16 conjuntos de iniciadores.

As demais seleções polinizadoras testadas são descendentes da cultivar Baronesa (S^3S^9), sendo que as seleções 140/191 e 140/494 apresentaram o alelo S^3 , herdados do genitor feminino. O segundo alelo da seleção 140/494 foi identificado como alelos S^4 , formando o genótipo S^3S^4 no loco S. A identificação do

segundo alelo da seleção 140/144 não foi possível com a utilização do conjunto de iniciadores empregado.

Tabela 25 - Alelos S identificados em seleções polinizadoras de macieira, desenvolvidas pela Epagri.

Seleção polinizadora	Genótipo							
	----- Primeiro alelo -----				----- Segundo alelo -----			
	Alelo	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Cultivar referência	Iniciadores	Alelo	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Cultivar referência	Iniciadores
135/114	S ³	500	Golden Delicious	FTC177 FTC226	S ¹⁹	304	Gloster	FTC229 FTC230
135/140	S ³	500	Golden Delicious	FTC177 FTC226	S [?]	-	-	-
140/126	S ⁵	346	Gala	FTC10 FTC11	S ²²	274 (199+31+44)	Alkemene	FTC5 OWB249
140/144	S ⁵	346	Gala	FTC10 FTC11	S [?]	-	-	-
140/191	S ³	500	Golden Delicious	FTC177 FTC226	S [?]	-	-	-
140/228	S ⁵	346	Gala	FTC10 FTC11	S ²²	274 (199+31+44)	Alkemene	FTC5 OWB249
140/494	S ³	500	Golden Delicious	FTC177 FTC226	S ⁴	274 (194+77)	Gloster	FTC5 OWB249

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

NOTAS: Números entre parênteses correspondem ao tamanho do fragmento após a digestão com a enzima Taq I. S[?]: alelo S não identificado.

Nas seleções polinizadoras 140/126, 140/144 e 140/228 os genótipos identificados foram S⁵S²², S⁵S[?] e S⁵S²², respectivamente. As três seleções apresentaram alelos S adversos aos alelos possíveis de serem herdados do genitor feminino (S³ e S⁹). Por este motivo, sugere-se que o genitor feminino não é a cultivar Baronesa como acreditava-se anteriormente.

Os alelos S²² e S⁴, identificados nas seleções 140/126 e 140/228 (S²²) e 140/494 (S⁴), juntamente com os alelos S⁶, S¹⁶, S²³ e S²⁶, fazem parte de um conjunto de alelos raros, sendo caracterizados apenas em cultivares antigas e silvestres (BROOHAERTS et al. 2003, 2004).

Levando em consideração os genótipos das cultivares copa e os genótipos identificados para as seleções polinizadoras, determinou-se o nível de compatibilidade genética entre cada uma delas, apresentado na Tabela 26. Para as seleções polinizadoras que não tiveram o segundo alelo S caracterizado, aceitou-se

que o alelo em questão não é nenhum daqueles identificados pelo conjunto de iniciadores testados, ou seja, é um alelo diferente dos encontrados nas cultivares copa. Por esse motivo, quando o único alelo identificado na polinizadora for diferente dos alelos presentes na cultivar copa considerou-se a compatibilidade completa entre ambos. Já quando o alelo identificado foi igual a um dos alelos da cultivar copa, definiu-se a ocorrência de semicompatibilidade entre os genótipos em questão (Tabela 26).

Para a cultivar SCS425 Luiza, três polinizadoras se mostraram completamente compatíveis (135/114, 135/140 e 140/191) e duas semicompatíveis (140/228 e SCS426 Venice). Já para a cultivar SCS426 Venice, apenas duas seleções são completamente compatíveis (140/126 e 140/228), sendo três genótipos considerados semicompatíveis (135/140, 140/191 e SCS425 Luiza). Para a cultivar SCS427 Elenise, que apresenta somente quatro possíveis seleções polinizadoras, duas delas se mostraram completamente compatíveis (140/144 e 140/228) e duas semicompatíveis (140/494 e 140/191).

Tabela 26 - Compatibilidade genética entre cultivares copa e respectivas polinizadoras com base nos alelos S identificados via marcadores moleculares.

Cultivar copa	Polinizadora		Nível de compatibilidade
	Seleção	Alelos S	
SCS425 Luiza (S ⁵ S ⁹)	135/114	S ³ S ¹⁹	Completamente compatível
	135/140	S ³ S [?]	Completamente compatível
	140/191	S ³ S [?]	Completamente compatível
	140/228	S ⁵ S ²²	Semicompatível
	SCS426 Venice	S ³ S ⁹	Semicompatível
SCS426 Venice (S ³ S ⁹)	135/140	S ³ S [?]	Semicompatível
	140/126	S ⁵ S ²²	Completamente compatível
	140/191	S ³ S [?]	Semicompatível
	140/228	S ⁵ S ²²	Completamente compatível
	SCS425 Luiza	S ⁵ S ⁹	Semicompatível
SCS427 Elenise (S ³ S ²³)	140/494	S ³ S ⁴	Semicompatível
	140/144	S ⁵ S [?]	Completamente compatível
	140/191	S ³ S [?]	Semicompatível
	140/228	S ⁵ S ²²	Completamente compatível

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

NOTAS: S[?]: alelo S não identificado.

Considerando apenas o nível de compatibilidade entre cultivar copa e polinizadora, os genótipos que apresentaram compatibilidade completa são os mais indicados para compor pomares das cultivares avaliadas

4.3.3 DISCUSSÃO GERAL

Entre as combinações cultivar copa vs. polinizadora que foram testadas a campo identificou-se pelo menos dois genótipos polinizadores semicompatíveis geneticamente com cada cultivar copa. Em relação a cultivar SCS426 Venice, verificou-se a presença de semicompatibilidade em três dos cinco genótipos testados. Teoricamente, a formação de frutos e sementes seria maior entre genótipos completamente compatíveis. Porém não foi identificado comportamento diferente para as cultivares SCS426 Venice e SCS427 Elenise quando cruzados tanto com os genótipos considerados completamente compatíveis quanto para genótipos semicompatíveis. Já para a cultivar SCS425 Luiza, mesmo que a formação de frutos por inflorescência não tenha sido diferente entre as seleções polinizadoras, o número de sementes formadas chegou a ser maior no cruzamento semicompatível entre SCS425 Luiza vs. SCS426 Venice do que no cruzamento envolvendo a seleção polinizadora completamente compatível 140/191.

Esse resultado corrobora com Schneider, Stern e Goldway (2005), os quais reportam o desempenho de diversos cruzamentos envolvendo cultivares completamente compatíveis, semicompatíveis e incompatíveis, não observando diferença significativa na produção de frutos e de sementes por fruto entre os cruzamentos compatíveis e semicompatíveis via polinização artificial. Porém, os mesmos autores constataram que, quando é levado em conta o comportamento das cultivares submetidas à polinização aberta, há maior formação de frutos e sementes por fruto em cruzamentos entre cultivares completamente compatíveis, e diminuição da produção de frutos em cruzamentos entre cultivares semicompatíveis.

Heo et al. (2012) não encontraram diferença significativa em cruzamentos testes a campo realizados via polinização artificial utilizando a cultivar Fuji (S^1S^9) em combinação com genótipos totalmente compatíveis [Seowang (S^3S^5) = 90,6% de frutificação e média de 8,9 sementes por fruto; Tsugaru (S^3S^7) = 89,4% de frutificação e média de 8,7 sementes] e semicompatíveis [Hongro (S^1S^3) = 87% de frutificação e média de 7,4 sementes por fruto; Chukwang (S^3S^5) = 86,2% de

frutificação e média de 7,2 sementes por fruto]. Baseando-se nesses resultados, sugere-se que a semicompatibilidade entre os genótipos seja compensada pela alta quantidade de pólen depositada sobre os estigmas na polinização artificial. Isso gerou quantidade de frutos e sementes similares às encontradas quando envolvidos genótipos com compatibilidade total. Além disso, existem casos especiais em que a combinação específica de alguns genótipos pode resultar em diminuição da produção de frutos mesmo com genótipos compatíveis devido a características adversas à compatibilidade (SAPIR et al., 2008). Todavia, além dos fatores citados acima, os testes de polinização a campo são altamente influenciados pelas condições ambientais e manejo cultural adotado no pomar onde são realizados os testes, podendo haver alteração no número de frutos produzidos e número de sementes formadas de um ano para outro (YAMANE e TAO, 2009).

Por esse motivo, a determinação dos melhores genótipos polinizadores deve levar em consideração a genotipagem do loco S dos indivíduos envolvidos e também, a realização dos testes de polinização artificial por, pelo menos, dois anos para que os resultados representem com maior exatidão o comportamento real da polinização das cultivares copa. Assim, torna-se possível utilizar os genótipos totalmente compatíveis nos pomares comerciais, pois, mesmo apresentando resultado satisfatório na produção de frutos nos testes de polinização artificial, a polinização nos pomares comerciais é realizada naturalmente pelos insetos, e situações de semicompatibilidade podem afetar a produção dos frutos, tanto em quantidade como em qualidade.

Existem casos em que genótipos semicompatíveis podem ser empregados em pomares comerciais, como é o caso das cultivares SCS425 Luiza e SCS426 Venice. Ambas apresentam produção e liberação de pólen adequadas para realizar a fertilização cruzada e, por esse motivo, seu plantio alternado para formação de pomares comerciais é possível, já que as duas são cultivares produtoras de frutos de interesse comercial.

Quanto a genotipagem dos alelos S, outro fator a ser levado em consideração para a adoção de marcadores de DNA na identificação do nível de compatibilidade entre as cultivares, é que a caracterização pode ser realizada em qualquer época do ano e com plantas de qualquer idade (YAMANE e TAO, 2009).

4.4 CONCLUSÃO

1. Todas as seleções polinizadoras testadas não apresentaram diferença significativa entre sim na frutificação e no número de sementes viáveis por fruto de suas respectivas cultivares copa nos testes de polinização a campo, diferindo apenas dos respectivos tratamento controle. Quanto ao número de sementes totais produzidas por fruto, na cultivar SCS425 Luiza as seleções polinizadoras 135/114 e SCS426 Venice proporcionaram a formação de maior número de sementes por fruto do que a seleção 140/191. Nas demais cultivares, o número de sementes por fruto não diferiu estatisticamente entre as seleções polinizadoras avaliadas.

2. Foram identificados os seguintes genótipos para o loco S das seleções polinizadoras: 135/114 = S^3S^{19} , 140/126 = S^5S^{22} , 140/228 = S^5S^{22} , 140/494 = S^3S^4 , 135/140 = $S^3S^?$, 140/144 = $S^5S^?$ e 140/191 = $S^3S^?$.

3. Levando em consideração os genótipos do loco S identificados nas cultivares e respectivas polinizadoras, identificou-se seleções semicompatíveis com as cultivares copa que não apresentaram diferença na produção de frutos em comparação com seleções totalmente compatíveis.

4. Sugerem-se os seguintes genótipos para serem adotados como polinizadoras em pomares comerciais: 135/114, SCS426 Venice e 135/140 para a cultivar SCS425 Luiza; 140/126 SCS425 Luiza e 140/228 para a cultivar SCS426 Venice; e 140/144 e 140/228 para a cultivar SCS427 Elenise.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os principais resultados gerados com a execução dos trabalhos propostos nessa dissertação, alguns pontos importantes podem ser destacados:

1. Os marcadores de DNA utilizados para os alelos S^2 , S^3 , S^5 , S^{10} e S^{19} segregam conjuntamente aos seus respectivos alelos, possibilitando a identificação correta dos diferentes genótipos para esse caráter;

2. A genotipagem do loco S em macieira por meio do conjunto de marcadores de DNA utilizados nesse trabalho é eficiente, com exceção dos iniciadores FTC12 e FTC228 para identificação do alelo S^{10} que não se mostraram capazes de caracterizar o mesmo;

3. Considerando a codominância e a herança dos alelos S, os marcadores de DNA podem ser utilizados para a identificação de possíveis contaminações em populações segregantes;

4. Como a seleção de polinizadoras por meio de testes a campo é demorada e apresenta resultados variáveis, tanto por ser um procedimento artificial quanto por ser potencialmente influenciada pelas condições de ambiente, a identificação via marcadores de DNA se torna uma ferramenta importante para a validação dos cruzamentos para a seleção de polinizadoras ou, até mesmo, pode ser adotada como técnica básica para a determinação dos possíveis genótipos polinizadores com compatibilidade completa e já apresentando características agrônomicas semelhantes, para posterior realização dos testes a campo;

5. Da mesma forma que agiliza o processo de seleção de polinizadoras, a identificação dos alelos S por meio de marcadores de DNA elimina a avaliação de características indiretas como forma de mensuração da compatibilidade genética;

6. A utilização dos marcadores de DNA para a série alélica S pode ser aplicada como uma ferramenta indireta para a identificação de possíveis erros nas genealogias previamente informadas, sendo um método de caracterização básica da descendência das plantas, já que podem identificar a presença ou não dos alelos dos possíveis respectivos genitores.

REFERÊNCIAS

- AGAPITO-TENFEN, S. Z. et al. Identification of the Er1 resistance gene and RNase S-alleles in *Malus prunifolia* var. ringo rootstock. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 1, p. 62-68, 2015.
- ALBUQUERQUE JUNIOR, C. L. **Caracterização molecular e morfo-fisiológica da incompatibilidade alélica entre cultivares de macieira**. 2005. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005. 96p.
- ALLARD, R. W. Sistemas de controle da polinização em plantas cultivadas. In: **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda. p.189-203, 1971.
- ASSIS, E. S. **Diversidade genética de gabirobeiras (*Campomanesia* spp.) por meio de caracteres morfológicos e marcadores moleculares RAPD**. 2011. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2011. 100p.
- BATLLE, I.; ALSTON, F.H.; EVANS, K.M. The use of the isoenzymic marker gene Got1 in the recognition of incompatibility S alleles in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 90, p. 303-306, 1995.
- BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D36-D42, 2013.
- BLEICHER, J. História da Macieira. In: EPAGRI. **A cultura da Macieira**. Florianópolis: Empresa de Pesquisa e Extensão Rural de Santa Catarina-EPAGRI, v. 11, p. 29-35, 2006.
- BONETI, J.I.S. et al. Epagri 402 Catarina - Nova cultivar de macieira resistente à sarna. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 9, n. 2, p. 51-54, 1996.
- BONETI, J.I.D.S.; PEREIRA, A.J.; BRIGHENTI, E. Joaquina: nova cultivar de macieira resistente à sarna e de maturação precoce. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 16, n. 3, p. 70-73, 2003.
- BOSKOVIC, R.; TOBUTT, K. R. Correlation of stylar ribonuclease isoenzymes with incompatibility alleles in apple. **Euphytica**, v. 107, n. 1, p. 29-43, 1999.

BROWN, S. Apple. In: **Fruit Breeding**. Springer: Estados Unidos, p. 329-367, 2012.

BROWN, S. K.; MALONEY, K. E. Genetic improvement of apple: breeding, markers, mapping and biotechnology. In **Apples: botany, production, and uses**. FERRE, G.; WARRINGTON, I. J.; WALLINGFORD, O. CAB, p. 31-59, 2003.

BROOHAERTS, W. New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, n. 4, p. 703-714, 2003.

BROOHAERTS, W. et al. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. **Plant Molecular Biology**, v. 27, p. 499-511, 1995.

BROOHAERTS, W.; VAN NERUM, I.; KEULEMANS, J.. Update on and review of the incompatibility (S-) genotypes of apple cultivars. **HortScience**, v. 39, n. 5, p. 943-947, 2004.

CEPA. Maça. In: **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina** (1976 – Atual), v.1. Florianópolis: Epagri/Cepa, p. 51-58, 2013.

CHOI, C.; TAO, R.; ANDERSEN, R. L.. Identification of self-incompatibility alleles and pollen incompatibility groups in sweet cherry by PCR based S-allele typing and controlled pollination. **Euphytica**, v. 123, n. 1, p. 9-20, 2002.

COSTA JUNIOR, D. S. et al. Clonal evaluation of new ornamental pineapple hybrids to use as cut flowers. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n. 4, p. 475-483, 2016.

COUTO, T. R.; AGUILAR, J. P. L.; ARAUJO, J. S. P. **Diversidade genética de gérbas provenientes da região serrana do estado do Rio de Janeiro**. 20º Congresso brasileiro de floricultura e plantas ornamentais; 7º Congresso brasileiro de cultura de tecidos de plantas. Piracicaba, 2015.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco-MG: Suprema, 2011. 620p.

DAR, J. A.; WANI, A. A.; DHAR, M. K. Morphological, biochemical and male-meiotic characterization of apple (*Malus× domestica* Borkh.) germplasm of Kashmir Valley. **Chromosome Botany**, v. 10, n. 2, p. 39-49, 2015.

DE FRANCESCHI, P. et al. Cloning and mapping multiple S-locus F-box genes in European pear (*Pyrus communis* L.). **Tree Genetics and Genomes**, v. 7, n. 2, p. 231-240, 2011.

DE FRANCESCHI, P. et al. Characterization of a new apple S-RNase allele and its linkage with the Rvi5 gene for scab resistance. **Molecular Breeding**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2016.

DE NETTANCOURT, D. Incompatibility in angiosperms. **Sexual Plant Reproduction**, v. 10, n. 4, p. 185-199, 1997

DENARDI, F. Novas cultivares de macieira e perspectivas para futuros lançamentos. In: XI Enfrute, **Anais XI Enfrute**, Fraiburgo: Epagri, p.11-22, 2009.

DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Fred Hough - Nova cultivar de macieira com imunidade à sarna. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 1994.

DENARDI, F.; BERTON, O.; SPENGLER, M.M. Resistência genética à podridão amarga em maçãs, determinada pela taxa de desenvolvimento da doença em frutos com e sem ferimentos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 3, p. 494-497, 2003.

DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Epagri 404 Imperatriz: Nova cultivar de macieira. In: XIV Congresso Brasileiro De Fruticultura. **Anais**. Curitiba: SBF, p. 270, 1996.

DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Epagri 406 Baronesa: Nova cultivar de macieira de maturação tardia para o sul do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 19, n. 2, p. 185-189, 1997.

DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Daiane: Nova cultivar de macieira para colheita em março. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 11, n. 3, p. 6-8, 1998a.

DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Duquesa: nova cultivar de macieira de baixa exigência em frio hibernal e alta resistência à sarna. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 11, n. 4, p. 19-21, 1998b.

DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Epagri 408 Condessa: nova cultivar de macieira de baixa exigência em frio hibernal. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 2, n. 2, p. 12-15, 1998c.

DENARDI, F.; CAMILO, A. P.; PETRI, J. L. Epagri 407 Lisgala: mutação da cultivar de macieira Gala com epiderme mais colorida. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 10, n. 1, p. 55-56, 1997.

DENARDI, F.; HOUGH, L. F. Apple breeding in Brazil. **HortScience**, v. 22, n. 6, p. 1231-1233, 1987.

DENARDI, F.; HOUGH, L. F.; CAMILO, A. P. 'Primícia' Apple. **HortScience**, v. 23, n. 3, p. 632, 1988a.

DENARDI, F.; HOUGH, L. F.; CAMILO, A. P. 'Princesa' Apple. **HortScience**, v. 23, n. 4, p. 787, 1988b.

DENARDI, F.; KVITSCHAL, M. V.; HAWERROTH, M. C. SCS425 Luiza, SCS426 Venice e SCS427 Elenise: Novas cultivares de macieira da Epagri para o sul do Brasil. In: XIV Enfrute. **Anais**, v. 1, p. 96-101, 2015.

DENARDI, F.; STUKER, H. Eficiência de diferentes cultivares de macieira como polinizadoras da 'Castel Gala' e da 'Condessa'. **Agropecuária Catarinense**, v. 21, p. 79-83, 2008.

DE SCHEPPER, S. et al. Somatic polyploidy and its consequences for flower coloration and flower morphology in azalea. **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 7, p. 583-590, 2001.

DREESEN, R. S. G. et al. Analysis of *Malus* S-RNase gene diversity based on a comparative study of old and modern apple cultivars and European wild apple. **Molecular breeding**, v. 26, n. 4, p. 693-709, 2010.

EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **A cultura da macieira**. Florianópolis: Epagri. 2006. 743p.

Epagri/Ciram. **Monitoramento do frio**. Florianópolis: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, 2016. Disponível em: <http://ciram.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=510&Itemid=480>. Acesso em 15 dez. 2016.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Faostat database gateway**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 20 abr. 2015.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. ed. 2, Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 1995. 220p.

GRATTAPAGLIA, D. et al. Mapping in woody plants with rapd markers: applications to breeding in forestry and horticulture. In: Symposium Applications of RAPD Technology to Plant Breeding. Minneapolis - EUA. **Anais do Symposium Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**, p. 37-40, 1992.

GOULART JUNIOR, R. et al. **Relatório de projeto: Fruticultura Catarinense – Valor da produção comercial na safra 2014/15** (Boletim Didático n.135). Florianópolis: Epagri, 2016. 36p.

GONÇALVES, D. L. et al. Divergência genética de acessos tradicionais de feijoeiros através de características da semente. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 6, p. 1671-1681, 2014.

GOWER, J. C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**, v. 27, p. 857-871, 1971.

HALÁSZ, J. et al. S-genotyping of old apple cultivars from the Carpathian basin: methodological, breeding and evolutionary aspects. **Tree Genetics and Genomes**, v. 7, n. 6, p. 1135-1145, 2011.

HANCOCK, J. F., LUBY, J. J., BROWN, S. K.; LOBOS, G. A.. Apples. In: **Temperate Fruit Crop Breeding - germplasm to genomics**. Springer Países Baixos, p. 1-37, 2008.

HAUAGGE, R.; BRUCKNER, C. H. Macieira. In: BRUCKNER, C. H. **Melhoramento de Fruteiras de Clima Temperado**, ed. 1, Viçosa: UFV. p. 27-88, 2002.

HEGEDUS, A. Review of the self-incompatibility in apple (*Malus × domestica* Borkh., syn.: *Malus pumila* Mill.). **International Journal of Horticultural Science**, v. 12, n. 2, p. 31-36, 2006.

HENG, W. et al. Recognition specificity of self-incompatibility in *Pyrus* and *Malus*. **Molecular breeding**, v. 28, n. 4, p. 549-557, 2011.

HEO, S. et al. Distribution of S-alleles among Korean Apples by PCR and Cross-pollination. **Korean Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 757-763, 2012.

HUANG, S. et al. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. **The Plant Cell**, v. 6, n. 7, p. 1021-1028, 1994.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro. v. 29, n. 1, p. 59, 2015.

IOERGER, T. R.; CLARK, A. G.; KAO, T.. Polymorphism at the self-incompatibility locus in Solanaceae predates speciation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 24, p. 9732-9735, 1990.

ISHIMIZU, T. et al. PCR-based method for identifying the S-genotypes of Japanese pear cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p. 968-967, 1999.

IUCHI, V.L. Botânica e fisiologia. In: **A cultura da macieira**. Epagri:Florianópolis: Epagri, p. 59-102, 2002.

JACKSON, J. E. **The biology of apples and pears**. Nova York: Universidade de Cambridge. 2003. 502p.

JANSSENS, G.A. et al. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, p. 691-698, 1995.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. ed. 13. São Paulo: Nacional, 2002. 777p.

KATO, M.; KATO, S.; SASSA, H.. Polyacrylamide gel electrophoresis of S-RNase fragments for identification of S-genotypes of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). **Breeding science**, v. 62, n. 4, p. 348-351, 2012.

KIM, H. et al. Determination of self-compatibility genotypes of Korean apple cultivars based on S-RNase PCR. **Journal of Plant Biology**, v. 49, p. 448-454, 2006.

KITAHARA, K. et al. Complete sequences of the S-genes 'Sd' and 'Sh-RNase' cDNA in apple. **HortScience**, v. 35, p. 712-715, 2000.

KITAHARA, K.; MATSUMOTO, S. Sequence of the S10 cDNA from "McIntosh" Apple and a PCR-digestion identification method. **HortScience**, v. 37, p. 187-190, 2002.

KOBEL, F., STEINEGGER, P., ANLIKER, J. Weitere Untersuchungen über die Befruchtungsverhältnisse der Apfel- und Birnsorten. **Landw Jb Schweiz**, v. 53, p. 160-191, 1939.

KOMORI, S. et al. Analysis of S-allele genotypes and genetic diversity in the apple. *Acta Horticulturae*, n. 538, v. 1, p. 83-86, 2000.

KVITSCHAL, M. V.; DENARDI, F. Diversificação de cultivares de macieira: O desafio brasileiro. In: LEITE, Gabriel Berenhauser, et al. **Encontro Nacional sobre Fruticultura de Clima Temperado**, ed. 12, v.1, p. 151-165, 2011.

KVITSCHAL, M. V. et al. Melhoramento genético e Biotecnologia. In: FIORAVANÇO, J. C.; SANTOS, R. S. S. **Maçã - o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa, p. 29-40, 2013.

LARSEN, B. et al. A high-throughput method for genotyping S-RNase alleles in apple. **Molecular Breeding**, v. 36, n. 3, p. 1-10, 2016.

LEFORT, F.; DOUGLAS, G.C. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. **Annals of Forest Science**, v. 56, p. 259-263, 1999.

LIEBHARD, R. et al. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Molecular Breeding**, v. 10, p. 217-241, 2002.

LI, T. et al. Determination S-genotypes and identification of five novel S-Rnase alleles in wild *Malus* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, n. 2, p. 453-461, 2012.

LI, W. et al. Molecular and genetic characterization of a self-compatible apple cultivar, 'CAU-1'. **Plant Science**, v. 252, p. 162-175, 2016.

MA, R. C.; OLIVEIRA, M. Evolutionary analysis of S-RNase genes from Rosaceae species. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 267, n. 1, p. 71-78, 2002.

MAECHLER, M. et al. **The cluster package**. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/cluster/cluster.pdf>>. 2016. Acesso em 10 out. 2016.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cenário da cadeia produtiva da maçã**, Ano 6, v. 54. mar. 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/politica-agricola/publicacoes/cenario-da-cadeia-produtiva>>. Acesso em: 10 abr. 2015.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Macieira frutífera (*Malus spp*) NOVO FORMULÁRIO DESCRITOR**. out. 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/protecao-cultivares/formularios-protecao-cultivares>>. Acesso em: 12 maio 2015.

MATSUMOTO, S. et al. A new S-allele in apple, 'Sg', and its similarity to the 'Sf' allele from 'Fuji'. **HortScience**, v. 34, p. 708-710, 1999.

MATSUMOTO, S.; KITAHARA, K. Discovery of a new self-incompatibility allele in apple. **HortScience**, v. 35, p. 1329-1332, 2000.

MATSUMOTO, S. M. et al. A functional S-allele, 'Sg', in the wild apple possessing a single amino acid, S-RNase 'Sg'-RNase', different from 'Sg-RNase' in *Malus domestica* cultivars. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 76, n. 2, p. 163-166, 2001.

MATSUMOTO, S. Apple pollination biology for stable and novel fruit production: search system for apple cultivar combination showing incompatibility, semicompatibility, and full-compatibility based on the S-RNase allele database. **International Journal of Agronomy**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

McCLURE, B. A. et al. Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. **Nature**, v. 347, n. 6295, p. 757-760, 1990.

McCUBBIN, A. G.; KAO, T.. Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 16, n. 1, p. 333-364, 2000.

MELLO, L. M. R. **Produção e mercado da maçã brasileira** – panorama 2005. EMBRAPA Uva e Vinho (Circular técnico, 64). 2006. 5p.

MELOUNOVÁ, M. et al. Alleles controlling apple skin colour and incompatibility in new Czech apple varieties with different degrees of resistance against *Venturia inaequalis* CKE. **Plant Soil Environ**, v. 51, n. 2, p. 65-73, 2005.

MOURA, M. C. C. L. et al. Algoritmo de Gower na estimativa da divergência genética em germoplasma de pimenta. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 2, 2010.

MORIMOTO, T.; AKAGI, T.; TAO, R. Evolutionary analysis of genes for S-RNase-based self-incompatibility reveals S locus duplications in the ancestral Rosaceae. **The Horticulture Journal**, v. 84, n. 3, p. 233-242, 2015.

MOTA, M., TAVARES, L., OLIVEIRA, C. M. Identificação de alelos S em diferentes cultivares de pereira e avaliação da sua compatibilidade gametofítica com a 'Rocha'. **Actas Portuguesas de Horticultura**, n. 11, p. 37-41, 2009.

NEDEL, P.D. Fundamentos da qualidade de sementes. In: PESKE, S.T.; ROSENTHAL, M. D.; ROTA, G.R.M. (Ed.). **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. Pelotas: Ed. Universitária UFPel, ed. 1, p.94-136, 2003.

OLIVEIRA, M. M. et al. Uso do algoritmo de Gower no estudo da diversidade genética em híbridos interespecíficos de mandioca. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 5, n. 1, p. 967-968, 2009.

ORTEGA, E. et al. Analysis of S-RNase alleles of almond (*Prunus dulcis*): characterization of new sequences, resolution of synonyms and evidence of intragenic recombination. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 276, n. 5, p. 413-426, 2006.

OZÓRIO, P. R. S. **Caracterização e divergência genética entre 18 cultivares de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical: Produção Vegetal). Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, 2013. 50p.

PATOCCHI, A. et al. Development and test of 21 multiplex PCRs composed of SSRs spanning most of the apple genome. **Tree Genetics and Genomes**, v. 5, n. 1, p. 211-223, 2009.

PARK, S. M. et al. Frequencies of aneuploid seedlings obtained from aneuploid apple accessions (*Malus× domestica*) pollinated with diploid 'Hongro'. **Journal of the Faculty of Agriculture**, v. 57, n. 1, p. 67-72, 2012.

PESTANANA, R. K. N. et al. Agronomic and molecular characterization of gamma ray induced banana (*Musa* sp.) mutants using a multivariate statistical algorithm. **Euphytica**, v. 178, n. 2, p. 151-158, 2011.

PETRI, J. L. Fatores edafoclimáticos. In: Epagri. **A cultura da macieira**. Florianópolis, p.105-112, 2002.

PETRI, J.L.; DENARDI, F.; SUZUKI, A.; Epagri 405 Fuji Suprema: Nova cultivar de macieira. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 10, n. 3, p. 48-50, 1997.

PINTO, F. O. et al. Development of papaya genotypes (*Carica papaya* L.) tolerant to skin freckles. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 1101-1115, 2013.

RAMALHO, M.A.P. et al. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFLA. 5 ed., 2012. 566p.

REVERS, L. F. et al. Uso prático de marcadores moleculares para seleção assistida no melhoramento de uvas de mesa apirênicas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 104-108, 2006.

RICHMAN, A.D.; BROOHAERTS, W.; KOHN, J.R. Self-incompatibility RNases from three plant families: homology or convergence? **American Journal of Botany**, v. 84, n. 8, p. 912-917, 1997.

ROCHA, M. C. et al. Uso do algoritmo de Gower na determinação da divergência genética entre acessos de tomateiro do grupo cereja. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 423-431, 2010.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system** (versão 2.1m). Nova York, 2000.

SAKURAI, K.; BROWN, S. K.; WEEDEN, N. Self-incompatibility alleles of apple cultivars and advanced selections. **HortScience**, v. 35, n. 1, p. 116-119, 2000.

SAITO, A. et al. Self-compatibility of 3 apple cultivars and identification of S-allele genotypes in their self-pollinated progenies. **Horticultural Science**, v. 6, n. 1, p. 27-32, 2007.

SAKURAI, K.; BROWN, S. K.; WEEDEN, N. Self-incompatibility alleles of apple cultivars and advanced selections. **HortScience**, v. 35, n. 1, p. 116-119, 2000.

SANZOL, J.; HERRERO, M. Self-incompatibility and self-fruitfulness in pear cv. Agua de Aranjuez. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 132, n. 2, p. 166-171, 2007.

SASSA, H. et al. Identification of self-incompatibility related glycoproteins in styles of apple (*Malus × domestica*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 201-205, 1994.

SASSA, H. et al. Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 250, n. 5, p. 547-557, 1996.

SAPIR, G. et al. Full compatibility is superior to semi-compatibility for fruit set in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) cultivars. **Scientia horticulturae**, v. 116, n. 4, p. 394-398, 2008.

SCAPIM, C. A. et al. Avaliação da diversidade genética em *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, por meio da análise multivariada. **Revista Ceres**, v.46, p. 347-356, 1999.

SCHIFINO-WITTMANN, M. D.; DALL'AGNOL, M. Autoincompatibilidade em plantas. **Ciência Rural**, v. 32, p. 1083-1090, 2002.

SCHNEIDER, D. et al. Analysis of S-alleles by PCR for determination of compatibility in the 'Red Delicious' apple orchard. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 76, n. 5, p. 596-600, 2001.

SCHNEIDER, D.; STERN, R. A.; GOLDWAY, M.. A comparison between semi-and fully compatible apple pollinators grown under suboptimal pollination conditions. **HortScience**, v. 40, n. 5, p. 1280-1282, 2005.

SILVA, F. C. S. et al. Identification of new descriptors for differentiation of soybean genotypes by Gower algorithm. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 11, p. 961-966, 2016.

SOBRAL, K. M. B. et al. Variabilidade genética entre acessos de coqueiro-anão utilizando técnicas de análise multivariada. **Magistra**, v. 24, p. 348-359, 2012.

SOBREIRA, F. M. **Divergência genética entre acessos de abóbora para estabelecimento de coleção nuclear e pré-melhoramento para óleo funcional**. 2013. Tese de Doutorado (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2013. 89p.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v. 11, n. 2, p. 33-40, 1962.

TAMURA, M. et al. Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, n. 3, p. 344-349, 2000.

TORRES, F. E. et al. Estimativa da divergência entre ecótipos de braquiária baseada em descritores quantitativos e qualitativos. **Ciência Rural**, v. 45, n. 3, p. 485-491, 2015.

TAO, R. et al. Identification of stilar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). **Plant and cell physiology**, v. 38, n. 3, p. 304-311, 1997.

USHIJIMA, K. et al. Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. **The Plant Cell**, v. 15, n. 3, p. 771-781, 2003.

VAN NERUN, I. et al. Re-examination of the self-incompatibility genotype of apple cultivars containing putative 'new' S-alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 584-591, 2001.

VERDOODT, L. et al. Use of the multi-allelic self-incompatibility gene in apple to assess homozygosity in shoots obtained through haploid induction. **Theoretical and applied genetics**, v. 96, n. 2, p. 294-300, 1998.

YAEGAKI, H. et al.. Molecular characterization of S-RNase genes and S-genotypes in the japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). **Sexual Plant Reproduction**, v. 13, p. 251-257, 2001.

YAMAMOTO, T. Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 9-18, 2002.

YAMANE, H.; TAO, R. Molecular basis of self-(in) compatibility and current status of S-genotyping in Rosaceous fruit trees. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 78, n. 2, p. 137-157, 2009.

ZIMMER, P.D. Fundamentos da qualidade de sementes. In: PESKE, S.T.; LUCCA FILHO, O.A.; BARROS, A.C.S (Ed.). **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. Pelotas: Ed. Universitária UFPel, 2 ed., p. 97-158, 2006.

ZUREK, D. M. et al. Exchanging sequence domains between S-RNases from *Nicotiana glauca* disrupts pollen recognition. **The Plant Journal**, v. 11, n. 4, p. 797-808, 1997.

ANEXOS

Anexo 1. Quadro de descritores de macieira (*Malus domestica* Borkh.) (continua).

Característica	Identificação da característica	Código de cada descrição	Cultivares Exemplo
1. Planta: vigor QO	muito fraco fraco médio forte	1 3 5 7	Nield's Drooper Akane Golden Delicious Bramley's Seedling
2. Planta: tipo QN	colunar ramificado	1 2	Mac Excel, Wijcik Elstar, Golden Delicious
3. Somente cultivares com plantas tipo ramificado: Planta: hábito QN	ereto aberto pendente muito pendente	1 2 3 4	Benoni, Gloster Bramley's Seedling, Jonagold Jonathan Nield's Drooper, Rome Beauty
4. Planta: tipo de frutificação QN	unicamente nos esporões nos esporões e hastes longas unicamente nas hastes longas	1 2 3	Starkrimson Delicious Jonagold Cortland, Rome Beauty
5. Ramo de um ano: espessura QO	finha média grossa muito grossa	3 5 7 9	Laxton's Fortune, Remo Jonagold Bramley's Seedling Charlotte, Wijcik
6. Ramo de um ano: comprimento do entrenó QO	muito curto curto médio longo	1 3 5 7	MacExcel, Wijcik Alkmene, Florina Jonagold, Redaphough Auralia
7. Ramo de um ano: coloração da parte exposta ao sol QN	marrom-esverdeada marrom-avermelhada marrom-clara marrom marrom-escura	1 2 3 4 5	Granny Smith Vicking Arkcharm Golden Delicious Ingrid Marie
8. Ramo de um ano: pubescência (na metade distal do ramo) QO	ausente ou muito fraca fraca média forte muito forte	1 3 5 7 9	Laxton's Fortune, Rewena Golden Delicious Cox's Orange Pippin Bramley's Seedling Rambour d'Hiver

QO: Característica quantitativa ordinal; QN: Característica quantitativa nominal.

Anexo 1. Quadro de descritores de macieira (*Malus domestica* Borkh.)
(continuação).

9. Ramo de um ano: número de lenticelas QO	baixo	3	Alkmene, Bramley's Seedling
	médio	5	Cox's Orange Pippin
	alto	7	Mutsu
10. Lâmina foliar: posição em relação ao ramo QN	ascendente	1	Katja, Redsleeves
	horizontal	2	Bramley's Seedling
	descendente	3	Granny Smith, Schone van Boskoop
11. Lâmina foliar: comprimento QO	muito curto	1	Reanda
	curto	3	Court Pendu Plat
	médio	5	Florina
	longo	7	Bramley's Seedling
12. Lâmina foliar: largura QO	estreita	3	Cox's Orange Pippin
	média	5	Jonagold
	larga	7	Bramley's Seedling
13. Lâmina foliar: razão comprimento/ largura QO	pequena	3	Bramley's Seedling
	média	5	Jonagold
	grande	7	Granny Smith
14. Lâmina foliar: intensidade da coloração verde QO	fraca	3	Golden Delicious, Sansa
	média	5	James Grieve
	forte	7	Mutsu
15. Lâmina foliar: incisões da margem (metade superior) QN	crenadas	1	Summerred
	bicrenadas	2	Alkmene, Jim Brian
	serrilhadas tipo 1	3	Elstar, Gala
	serrilhadas tipo 2	4	Sirprize
	biserrilhadas	5	Freedom, Mutsu, Schone van Boskoop
16. Lâmina foliar: pubescência na face inferior QO	ausente ou fraca	1	Golden Delicious
	média	2	Cox's Orange Pippin, Elstar
	forte	3	James Grieve, Jonathan
17. Pecíolo: comprimento QO	curto	3	Jonagold
	médio	5	Granny Smith
	longo	7	Falstaff
18. Pecíolo: extensão da coloração antocianínica a partir da base QO	pequena	3	Golden Delicious, Jonagold
	média	5	Cox's Orange Pippin, Gala
	grande	7	Discovery Richared Delicious

Anexo 1. Quadro de descritores de macieira (*Malus domestica* Borkh.) (continuação).

19. Flor: coloração predominante na fase de balão floral QN	branca	1	Norhey Schoner aus Herrenhut, Worcester Pearmain Gravensteiner, Jonathan Elstar, Sylvia Kidd's Orange Red Weirouge Rafzubin
	rosa-amarelada	2	
	rosa-clara	3	
	rosa-escura	4	
	vermelha-média	5	
	vermelha-escura	6	
	roxa	7	
20. Flor: diâmetro com as pétalas estendidas e posicionadas horizontalmente QO	muito pequeno	1	Freedom, Spatbluhender Taffettapfel Jonafree Cox's Orange Pippin Schone van Boskoop
	pequeno	3	
	médio	5	
	grande	7	
21. Flor: arranjo das pétalas QN	separadas	1	Worcester Pearmain Golden Delicious, Jonagold, Topaz Schone van Boskoop
	intermediárias	2	
	sobrepostas	3	
22. Flor: posição dos estigmas em relação às anteras QN	abaixo	1	Alkmene Cox's Orange Pippin Golden Delicious
	no mesmo nível	2	
	acima	3	
23. Fruto jovem: extensão da coloração antocianínica QO	muito pequena	1	Grenadier, Norhey Fuji Idared Elise Weirouge
	pequena	3	
	média	5	
	grande	7	
	muito grande	9	
24. Fruto: tamanho QO	muito pequeno	1	Api Noir Golden Harvey Akane, Miller's Seedling Alkmene Cox's Orange Pippin Gravensteiner Mutsu Bramley's Seedling Howgate Wonder
	muito pequeno a	2	
	pequeno	3	
	pequeno a médio	4	
	médio	5	
	médio a grande	6	
	grande	7	
	grande a muito grande	8	
	muito grande	9	
25. Fruto: altura QO	baixa	3	Auralia James Grieve Cadel, Iduna
	media	5	
	alta	7	
26. Fruto: diâmetro QO	pequeno	3	Orei Golden Delicious Melrose
	médio	5	
	grande	7	

Anexo 1. Quadro de descritores de macieira (*Malus domestica* Borkh.)
(continuação).

27. Fruto: razão comprimento/diâmetro QO	muito pequena pequena média grande muito grande	1 3 5 7 9	Court Pendu Plat, Ingol Idared, Ontario Jonagold Golden Delicious Iduna, Priam
28. Fruto: forma geral QN	cilíndrica-truncada cônica ovóide cilíndrica elipsóide globosa oblóide (achatada)	1 2 3 4 5 6 7	Starkrimson Jonagold Summerred Gravensteiner, Mutsu Spencer Golden Noble, Resi Bramley's Seedling, Idared
29. Fruto: ondulação da epiderme QO	ausente ou fraca moderada forte	1 2 3	Charles Ross, Discovery Golden Delicious Red Delicious, Reinette Russet
30. Fruto: ondulação no final do cálice QO	ausente ou fraca moderada forte	1 2 3	Charles Ross, Discovery, Granny Smith Cox's Orange Pippin, Jonagold Red Delicious
31. Fruto: tamanho do olho QO	pequeno médio grande	3 5 7	McIntosh Cox's Orange Pippin Ingol, Monarch
32. Fruto: comprimento da sépala QO	Curto medio longo	3 5 7	McIntosh Alkmene Gala
33. Fruto: pruína na epiderme QO	ausente ou fraca moderada forte	1 2 3	Golden Delicious James Grieve, Jonathan Vicking, Vista Bella
34. Fruto: oleosidade da epiderme QO	ausente ou fraca moderada forte	1 2 3	Schone van Boskoop James Grieve Arlet, Jonagold
35. Fruto: coloração de fundo QN	não visível amarela esbranquiçada amarela verde esbranquiçada verde-amarelada verde	1 2 3 4 5 6	Red Jonaprince Silken Delorgue, Gala, Transparent Croncels Angold, Lodi, Lena, White Transparent Cox's Orange Pippin Granny Smith

Anexo 1. Quadro de descritores de macieira (*Malus domestica* Borkh.) (continuação).

36. Fruto: área relativa da coloração superficial QO	ausente ou muito pequena	1	Granny Smith Auralia, Cox's Orange Pippin Gala Spartan Red Jonaprice
	pequena	3	
	média	5	
	grande	7	
	muito grande	9	Cox's Orange Pippin, Egremont Russet
	vermelha-alaranjada	1	
	vermelha-rosada	2	
	Vermelha	3	
37. Fruto: tonalidade da coloração superficial (com a retirada da camada de pruína) QN	vermelha-arroxeadada	4	Akane, Galaxy, Red Elstar, Regal Prince
	vermelha-amarronzada	5	
38. Fruto: intensidade da coloração superficial QO	clara	3	
	média	5	
	escura	7	
39. Fruto: distribuição da coloração superficial QN	uniforme sem estrias	1	Red Jonaprice, Richared Delicious
	uniforme com estrias levemente definidas	2	
	uniforme com estrias claramente definidas	3	
	levemente uniforme com estrias claramente definidas	4	
	somente com estrias	5	
	uniforme e variegado	6	
	uniforme com estrias e variegado	7	
40. Fruto: largura das estrias QO	estreitas	3	Éden, Pinova, Pirella Rubinola, Tenroy Baigent, Caudle
	médias	5	
	largas	7	
41. Fruto: área de "russeting" na cavidade peduncular QO	ausente ou pequena	1	Elstar Granny Smith, Piros Alkmene Egremont Russet, Kaiser Wilhelm
	média	2	
	grande	3	

Anexo 1. Quadro de descritores de macieira (*Malus domestica* Borkh.)
(continuação).

42. Fruto: área de "russeting" nas faces QO	ausente ou pequena média grande	1 2 3	Golden Noble Karmijn de Sonnaville Egremont Russet, Zabergäu, Reinette
43. Fruto: área de "russeting" na cavidade pistilar QO	ausente ou pequena média grande	1 2 3	Golden Noble Cox's Orange Pippin Arlet
44. Fruto: número de lenticelas QO	Baixo médio alto	3 5 7	James Grieve Golden Delicious Granny Smith
45. Fruto: tamanho das lenticelas QO	pequenas médias grandes	3 5 7	Idared, Jonathan Elstar Florina, Reine de Reinettes
46. Fruto: comprimento do pedúnculo QO	muito curto curto médio longo muito longo	1 3 5 7 9	Egremont Russet Cox's Orange Pippin Worcester Pearmain Richared Delicious Pinova, Rewena, Sirprize
47. Fruto: espessura do pedúnculo QO	fina média grossa	3 5 7	Golden Delicious Cox's Orange Pippin Schone van Boskoop
48. Fruto: profundidade da cavidade peduncular QO	rasa média profunda	3 5 7	Edward VII Golden Delicious Jonagold, Schone van Boskoop
49. Fruto: largura da cavidade peduncular QO	estreita média larga	3 5 7	Beauty of Bath, Gala Golden Delicious Jonagold
50. Fruto: profundidade da cavidade pistilar QO	rasa média profunda	3 5 7	Worcester Pearmain Golden Delicious Bramley's Seedling, Delcorf
51. Fruto: largura da cavidade pistilar QO	estreita média larga	3 5 7	Pinova, Worcester Pearmain Golden Delicious Bramley's Seedling
52. Fruto: firmeza da polpa QO	muito macia macia média firme muito firme	1 3 5 7 9	Astrachan Jonagold Cox's Orange Pippin Kent Pilot, Scifresh

Anexo 1. Quadro de descritores de macieira (*Malus domestica* Borkh.) (continuação).

53. Fruto: coloração da polpa QN	branca	1	Akane, Spartan Jonagold Delorina, Topaz Gloster, Granny Smith Pomfit Weirouge
	creme	2	
	amarelada	3	
	esverdeada	4	
	rosada	5	
	avermelhada	6	
54. Fruto: abertura dos lóculos (na seção transversal) QN	fechados ou ligeiramente abertos	1	Idared, Worcester Pearmain
	moderadamente abertos	2	Reine de Reinettes, Sampion
	completamente abertos	3	McIntosh
55. Época de início da floração QO	muito precoce	1	Anna, Ein-Shemer
	Precoce	3	Idared
	Média	5	Cox's Orange Pippin, Jonagold
	Tardia	7	Court Pendu Plat
	muito tardia	9	Feuilmorte, Spätbluhender Taffetapfel
56. Fruto: Época de colheita QO	muito precoce	1	Vista Bella
	Precoce	3	Discovery, Jersey mac, Sunrise
	Média	5	Cox's Orange Pippin, Elstar, Gala
	Tardia	7	Golden Delicious, Jonagold
	muito tardia	9	Granny Smith, Cripps Pink

Anexo 1. Quadro de descritores de macieira (*Malus domestica* Borkh.) (conclusão).

57. Época da maturação para o consumo QO	muito precoce	1	Vista Bella
	muito precoce a precoce	2	White Transparent
	precoce	3	Discovery, Jerseymac, Moutain Cove, Sunrise
	precoce a intermediária	4	Akane, James Grieve, Summerred
	intermediária	5	Elstar, Gala, Honeycrisp
	intermediária a tardia	6	Ambrosia, Spartan, Sampion
	tardia	7	Golden Delicious
	tardia a muito tardia	8	Fuji
	muito tardia	9	Cripps Pink, Granny Smith

VITAE

Thyana Lays Brancher nasceu em 19 de setembro de 1992, filha de Armando Brancher e Dirce Faita Brancher, natural do município de Caçador/SC. Em 2010, ingressou no curso superior de Biotecnologia Industrial da Universidade do Oeste do Estado de Santa Catarina (Unoesc), em Videira-SC. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica Pibiti/Unoesc no período de setembro de 2010 à julho de 2011, e bolsista de Iniciação Científica FUMDES/Unoesc, ambos sob orientação do MSc. Rodrigo Nogueira Giovanni. Realizou estágios extracurriculares na Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina/Estação Experimental de Videira (Epagri-EeV) com enfoque na implantação de cultivares de uva italianas no Brasil, e na BRF na área de diagnóstico microbiológico de doenças em aves e suínos. No ano de 2014, atendendo os requisitos do curso de graduação, realizou o estágio de conclusão de curso na Universidade Federal do Paraná, desenvolvendo trabalho de indução de formação de calos embriogênicos em cana-de-açúcar, sob orientação dos professores Dr. João Carlos Bernal Filho (UFPR), Dra. Giovana Bomfim de Alcântara (UFPR) e MSc. Rodrigo Nogueira Giovanni (Unoesc). Ao final do primeiro semestre de 2014 obteve o título de bacharel em Biotecnologia Industrial, sendo agraciada com o prêmio de Mérito Estudantil pela primeira colocação no curso de Biotecnologia Industrial turma 2014/1, promovido pelo Conselho Regional de Química. Em março de 2015 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), em nível de mestrado na área de Melhoramento e Genética Vegetal, sob orientação do Dr. Altamir Frederico Guidolin, realizando trabalhos na linha de pesquisa de melhoramento genético de macieira, resultando na confecção da dissertação intitulada "Genotipagem de alelos S em macieira e sua utilização como ferramenta auxiliar ao melhoramento genético".