

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL

CARLA REGINA COSTA FURLAN

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E DA RESISTÊNCIA A
MANCHA FOLIAR DA GALA EM ACESSOS DE MACIEIRA DO
BANCO DE GERMOPLASMA DE MACIEIRAS DA E.E.EPAGRI/
CAÇADOR

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Adelar Mantovani

LAGES-SC

2008

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária

Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Furlan, Carla Regina Costa

Avaliação da diversidade genética e da resistência a
mancha foliar da gala em acessos de macieira do banco de
germoplasma de macieiras da E.E.EPAGRI/ Caçador /
Carla Regina Costa Furlan – Lages, 2008.

97 p.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências
Agroveterinárias / UDESC.

1. Maçã .2. Maçã – Doenças e pragas. 3.
Melhoramento genético. 4. Resistência a
doenças e pragas. I.Título.

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E DA RESISTÊNCIA A
MANCHA FOLIAR DA GALA EM ACESSOS DE MACIEIRA DO
BANCO DE GERMOPLASMA DE MACIEIRAS DA E.E.EPAGRI/
CAÇADOR**

CARLA REGINA COSTA FURLAN
Bióloga

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovado em:

Pela Banca Examinadora:

Homologado em:

Dr. Adelar Mantovani
Orientador – UDESC/Lages – SC

Dr. Ricardo Trezzi Casa
Coordenador do Programa de Mestrado em
Produção Vegetal – UDESC/Lages - SC

Dra. Adriana Cibele de Mesquita Dantas
UERGS/Bento Gonçalves-RS

Dr. Osmar Klauberg Filho
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Ciências Agrárias
UDESC/ Lages – SC

Dr. Altamir Frederico Guidolin
UDESC/Lages – SC

Dr. Adil Knackfuss Vaz
Diretor Geral do Centro de Ciências
Agroveterinárias – UDESC/Lages - SC

Dra. Jaqueline Battilana
UDESC/Lages- SC

LAGES
Santa Catarina - Brasil
2008

A minha família que sempre me
apoiou em tudo com carinho!
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por ter me permitido chegar até aqui.

Aos meus pais por tudo que sou e principalmente pelo amor e incentivo que sempre me deram, nunca medindo esforços para o que eu precisasse.

Ao meu marido pelo apoio moral, paciência e acima de tudo ao amor dedicado a mim em todas as horas.

Ao meu filho que apoiou meu trabalho, me dando força e me compreendendo pela ausência em tantas horas.

Aos meus irmãos, César e Cíntia pelo privilégio de tê-los como irmãos.

Aos meus orientadores Adelar Mantovani e Adriana Dantas pelo carinho, compreensão e conhecimentos que me passaram durante este período.

Aos pesquisadores Frederico Denardi e Walter Becker (EPAGRI-Caçador) pela doação do material vegetal e apoio à pesquisa.

A oportunidade de participar do projeto GenoMalus, onde recebi o suporte financeiro que precisava para realização do trabalho.

Aos colegas de mestrado que tive oportunidade de conhecer e conviver durante as aulas.

A minha amiga Tamara, que tantas vezes estudamos juntas até altas horas, compai de laboratório e também das horas de descontração.

A minha amiga Diorvania, pela troca de experiência e pelo coração enorme que possui, nossa amizade vai ficar para sempre.

Aos amigos que fiz: Alinne, Daiana, Jaqueline, Fabrício, Rodrigo, Tatiana Pagani, Tati, Elaine, Juliano, Amanda, Biffi, Audrey e Cláudia que com certeza vão ficar para sempre no meu coração mesmo estando longe.

Um agradecimento especial também a minha amiga Jaqueline Battilana que sempre se mostrou disponível para me ajudar e dar uma força.

Aos professores do curso de mestrado em Produção Vegetal, Altamir, Rose, Jefferson, Cassandro, Cileide e Clóvis pela atenção e colaboração.

A UDESC, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Enfim, agradeço a todos que de uma forma ou de outra colaboraram para que eu pudesse realizar meu trabalho.

Obrigada!

“Para enxergar o infinito, debaixo dos meus pés, não basta olhar de cima, e buscar no escuro, no obscuro a sombra que me segue todo dia.”

Falcão - O Rappa

RESUMO

No presente trabalho foram utilizados 245 genótipos pertencentes ao Banco de Germoplasma de macieira – BGM, da Epagri / Estação Experimental de Caçador - EECd, SC. Para identificar os genótipos portadores de resistência à mancha foliar de glomerela - MFG, doença essa causada principalmente pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. Os genótipos foram inoculados com 3 isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de diferentes regiões produtoras de maçã. Entre os genótipos testados, 187 (76,3%) manifestaram resistência e 58 (23,7%) manifestaram suscetibilidade à MFG. Entre as cultivares suscetíveis, não houve diferença no grau de severidade de ataque da MFG. Os resultados obtidos neste estudo têm, dentre outras, a finalidade de subsidiar os programas de melhoramento genético da macieira na seleção de parentais, objetivando a incorporação de resistência genética à MFG nas futuras novas cultivares. Para caracterizar os genótipos do Banco de Germoplasma de macieiras foram utilizados 12 primers de SSR. A análise de diversidade genética foi realizada através da extração do DNA de 169 genótipos, utilizando-se folhas jovens. O método de extração utilizado foi CTAB e a estimativa da concentração de DNA extraído foi feita em gel de agarose 0,8% com brometo de etídeo (0,3 µg/ml), tendo como padrão DNA Fago Lambda (20, 50, 100 e 200 ng/µl). Foi obtido um total de 197 alelos, sendo que o número médio de alelos por loco SSR foi de 16,4. A expectativa média de heterozigidade foi de 84%, o polimorfismo revelado pelo número de alelos por loco teve uma percentagem alta de 82%. Pela análise de similaridade genética foram observados dois grupos. Os resultados obtidos demonstraram a existência de alta variabilidade genética no banco de germoplasma de macieiras, ressaltado pelo elevado número de alelos por loco e alto nível de heterozigidade. Esse conhecimento contribuirá com a melhora na eficiência da identificação de combinações que servirão de base para o melhoramento genético da macieira.

Palavras-chave: Maçã. Melhoramento genético. Resistência a doenças. Mancha foliar de glomerela.

ABSTRACT

In this work were used 3 isolates of *C. gloeosporioides* from different apple producer places, and 245 access belong to the Active Germoplasm Banc Apple Tree “Estação Experimental da EPAGRI de Caçador, Santa Catarina”. Among the tested access, 185 were resistant and 32 susceptible. From those susceptible, there was not difference in the severity degree of the MFG attack. The data obtained in this study can help in the choice of resistant access, what could be used like parentage in the genetic breeding programs of the apple tree, in order to obtain the resistance to this pathogen. The genetic diversity characterization of the access by means of molecular marker studies, has been used like an important tool to maximize the maintenance work of the germoplasm banks. In this way, the objective of this study was characterize genetically the active germoplasm bank of the apple tree making use of 12 primers of SSR. The analysis of genetic diversity was realized through the DNA extraction of the 169 access, using young leafs. The extraction protocol used was the CTAB, and the estimation of the DNA concentration was done in agarose gel 0,8% coloured with bromide ethidium (0,3 µg/ml), with DNA Fago Lambda (20, 50, 100 e 200 ng/µl) like pattern. A total of 197 alleles were encountered, and the medium number of alleles by locus of SSR was 16,4. The medium heterozigosity expectation was 84%, and the revealed polimorphism by number of the alleles by locus had a high percentage (82%). The genetic similarity analysis showed two distinct groups. The gotten results had demonstrated the existence of high genetic variability in the bank of germoplasma of apple trees, salient for the raised number of alelos for I lease and high level of heterozigosidade. This knowledge will contribute with the improvement in the efficiency of the identification of combinations that will serve of base for the genetic improvement of the apple tree.

Keywords: Apple. Breeding. Resistant disease. Apple leaf spot.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01- Produção de maçã no Brasil no período de 1973 a 2007.....19
- Figura 02 - Banco de Germoplasma de Macieiras EPAGRI/Caçador.....26
- Figura 03 - A) Ramos dos genótipos de macieira na câmara de inoculação. B) Ramos dos genótipos de macieira após a inoculação, envoltos com sacos plásticos.....36
- Figura 04 -A) Foto do genótipo Akagui 72 horas após inoculação apresentando sintoma e B) genótipo Sungold 72 horas após inoculação, sem sintoma.....37
- Figura 05 - Diferença de severidade (%) dos genótipos suscetíveis a Mancha Foliar de Glomerela do Banco de Germoplasma de Maçã (BGM) da Epagri / Estação Experimental de Caçador - EECd, SC, 2008.....39
- Figura 06 - Perfil de bandas amplificadas no iniciador NZ02b1 em 42 genótipos de macieira do Banco de Germoplasma de Macieira da EPAGRI/Caçador-SC . M = 10 pb...49
- Figura 07 - Perfil de bandas amplificadas no iniciador CH03a09 em 46 genótipos de macieira do Banco de Germoplasma da EPAGRI/Caçador-SC. M= 10 pb.....49
- Figura 08 - Dendograma baseado em análise de UPGMA de 169 genótipos de macieira do Banco de Germoplasma da EPAGRI/caçador, usando 12 marcadores microsatélites.....51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01 - Genótipos resistentes do BGM da Epagri / Estação Experimental de Caçador - EECd, SC, 2008..... 38
- Tabela 02 - Microsatélites (SSR) e temperaturas de anelamento utilizadas nas reações de PCR com os genótipos do Banco de Germoplasma da Epagri-Caçador-SC..... 47
- Tabela 03 - Tamanho, número de alelos e frequência observada (H_o) e esperada (H_e) de heterozigotos de cada primer microsatélite..... 48

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPM- Associação Brasileira dos Produtores de maçã

BGM- Banco de Germoplasma de Macieira

cv- cultivar

EDTA – Ethylene DiamineTetracetic Acid- Ácido Etileno Diamino Tetracético

Epagri - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A.

PCR - Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia de Polimerase

SSR - Simple Sequence Repeat - Sequências Únicas Repetidas (microsatélites)

TBE - Tampão tris - ácido bórico – EDTA

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	14
1 CAPÍTULO I.....	17
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
1.2 A MACIEIRA.....	17
1.2.1 Melhoramento vegetal.....	20
1.2.2 Mancha foliar de glomerela.....	23
1.2.3 Bancos de germoplasma.....	25
1.2.4 Marcadores moleculares.....	28
2 CAPÍTULO II – ESTUDOS DA RESISTÊNCIA GENÉTICA DOS GENÓTIPOS DO BANCO DE GERMOPLASMA DE MACIEIRA DA EPAGRI À MANCHA FOLIAR DE GLOMERELA (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>).....	31
2.1 RESUMO.....	31
2.2 ABSTRACT.....	32
2.3 INTRODUÇÃO.....	32
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.4.1 Material vegetal.....	34
2.4.2 Preparo do inóculo e inoculação dos ramos.....	35
2.4.3 Incubação e avaliação do grau de severidade de ataque do <i>C. gloeosporioides</i>	35
2.4.4. Delineamento experimental e análise estatística.....	36
2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37

3 CAPÍTULO III – CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE MACIEIRA DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DA EPAGRI VIA SSR.....	42
3.1 RESUMO.....	42
3.2 ABSTRACT.....	42
3.3 INTRODUÇÃO.....	43
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.4.1 Coleta de amostras.....	44
3.4.2 Extração de DNA.....	45
3.4.3 Reações de amplificação, separação dos fragmentos por eletroforese e detecção das bandas polimórficas.....	46
3.4.4 Análise de diversidade genética entre os genótipos.....	46
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
5 ANEXOS.....	64

APRESENTAÇÃO

A macieira é uma das principais culturas agrícolas para o Estado de Santa Catarina, sendo o principal produtor, respondendo com 52% da área dos hectares plantados, e por 52% da produção nacional. O Estado do Rio Grande do Sul responde por 42% da área plantada e por 44% da produção, enquanto que o Estado do Paraná possui 6% da área plantada no país e responde por 4% da produção (BONETI et al., 2002).

No Brasil esta cultura apresentou expansão rápida a partir do final da década de 1960, devido ao interesse de algumas empresas privadas localizadas em Fraiburgo, SC; ao incentivo federal para o reflorestamento existente na época; à implantação do Programa de Fruticultura de Clima Temperado para o Estado de Santa Catarina em 1969 (Profit), e a cooperação técnica firmada entre o governo de Santa Catarina e Japão, em 1970 (KATSURAYAMA, 2005).

O cultivo da macieira é uma atividade relativamente recente no Brasil. No início da década de 70, a produção anual de maçãs era de cerca de 1.000 toneladas. Com incentivos fiscais e apoio à pesquisa e extensão rural, o Sul do Brasil aumentou a produção de maçãs em quantidade e em qualidade, fazendo com que o país passasse de importador a auto suficiente e com potencial de exportação. Em levantamentos feitos pela Associação Brasileira de Produtores de Maçãs (ABPM), verificou-se que na safra de 2001, aproximadamente 2700 produtores estiveram envolvidos na cultura e a área plantada foi de cerca de 30.000 ha, com produção estimada de 800.000 t. A maçã brasileira já conquistou os consumidores de outros países, especialmente os europeus, onde 10 a 20 % da fruta são exportados para a Europa (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2003).

Devido a grande importância sócio-econômica que a macieira representa para este Estado, desenvolve-se desde 1973 o programa de melhoramento genético da macieira, trabalho efetuado pela EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina), sendo que o objetivo principal do programa é introduzir variedades adaptáveis e resistentes as principais doenças e pragas existentes no Estado de Santa Catarina (DENARDI & HOUGH, 1987).

A conservação de germoplasma de raças locais, cultivares domésticas e parentes silvestres de espécies agronômicas tem sido uma das mais importantes áreas de pesquisa na Botânica. Seu principal objetivo é o desenvolvimento de técnicas para a conservação em longo prazo da variabilidade genética de espécies vegetais com a máxima integridade genética e biológica possível (BAJAJ, 1995).

Pesquisas envolvendo prospecção, conservação, caracterização e uso do germoplasma são fundamentais para subsidiar a incorporação de novas macieiras com características agronômicas de interesse em programas de melhoramento genético. Já que a cultura da macieira está sujeita ao ataque de doenças típicas de clima temperado como no caso da Sarna causada por *Venturia inaequalis* e a Mancha foliar de glomerela (MFG), causada por *Colletotrichum spp* (KATSURAYAMA & BONETI, 2001).

A Mancha foliar de glomerela, causada pelo fungo *Colletotrichum spp*, é uma doença da macieira tipicamente brasileira. Em Santa Catarina ela se estabeleceu no ciclo 1988/89. A origem do patógeno não é conhecida, e afeta as cultivares de macieiras derivadas da ‘Golden Delicious’. A Gala apresenta alta suscetibilidade, enquanto a Fuji, não derivada da ‘Golden Delicious’ não é afetada (BECKER *et al.*, 2000).

O controle da MFG é realizado exclusivamente com aplicações de fungicidas, aumentando o custo de produção e a probabilidade de resíduos. Por isso a obtenção de cultivares resistentes à mancha foliar de glomerela é uma das medidas mais importantes para a sustentabilidade da cultura da macieira no Sul do Brasil. Com a inclusão da resistência, pode-se retardar o progresso da epidemia e, com isso, reduzir o uso de fungicidas, principalmente no período que antecede a colheita (KATSURAYAMA, 2001). Além disso, a partir destas seleções pode-se obter material cada vez mais resistente (MASUDA *et al.*, 1999), sem perda da qualidade agronômica inerente a Gala.

As espécies de maçãs selvagens que levam genes responsáveis pela resistência a estes agentes são muito importantes, e podem ser usados como material original para desenvolvimento de variedades novas. Conseqüentemente, a avaliação do polimorfismo genético e também a análise da diversidade entre espécies selvagens e cultivadas podem ser úteis para desenvolver novas formas de resistência.

Entre os métodos usados para avaliar a diversidade genética, destacam-se os marcadores bioquímicos e moleculares. Tais marcadores representam o resultado direto da expressão de um gene ou ainda frações do próprio genoma, além de não estarem sujeitos à influência do ambiente (GRATTAPAGLIA *et al.*, 1992).

Microsatélites são considerados apropriados para identificar variedades, por causa da sua habilidade para descobrir grandes números de alelos repetidamente, com precisão, e eficazmente (McCouch, 2006). E também pela alta taxa de mutação existente neste marcador.

O uso de cultivares resistentes, bem como o de outras técnicas de manejo integrado tem sido a medida mais eficaz, econômica e ecológica de controle de doenças. O desenvolvimento de variedades resistentes a doenças é básico para todas as culturas agrícolas visando: diminuir custos de produção, garantir a segurança de trabalhadores agrícolas e de consumidores e a qualidade mercadológica, a preservação do ambiente e a sustentabilidade do agronegócio (QUIRINO, 1998). O trabalho teve como objetivo identificar genótipos resistentes a Mancha foliar de glomerela e a diversidade genética nos genótipos do BGM da EPAGRI-Caçador.

1 CAPÍTULO I

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2 A MACIEIRA

A evolução da macieira deve ter iniciado há 25 milhões de anos, tendo como centro de origem a região do Cáucaso, cadeia de montanhas da Ásia entre o mar Negro e Cáspio com 1200 km de extensão e altitude de 2000 metros, a leste da China. O início do desenvolvimento das espécies de macieira atuais provavelmente ocorreu após o final da última era glacial, há 20 mil anos (BLEICHER, 2006). O centro de origem da macieira (*Malus X domestica*) está dentro das gamas montanhosas da Ásia Central (HARRIS, 2002; JUNIPER, 2006).

Embora o gênero *Malus* seja geneticamente muito diverso, as variedades cultivadas de macieira, têm uma base genética muito estreita (Way *et al.*, 1990). A macieira domesticada e cultivada (*Malus X domestica* Borkh.), da família Rosaceae, é um híbrido interespecífico, incluindo: *M. sylvestris* Miller, *M. siervesii* (Ledeb) M. Roemer, *M. orientalis* Uglitzk, *M. baccata* (L.) Borkh. e *M. prunifolia* (Willd.) Borkh, as quais estariam envolvidas em diferentes graus no desenvolvimento da grande parte de variedades de macieira cultivadas no mundo (Hokansom *et al.*, 1997; Janick *et al.*, 1996; Korban, 1986).

O número exato de espécies de *Malus* não é conhecido, são estimados entre 25 a 35 (PONOMARENKO, 1986; WATKINS, 1995) e mais de 7.000 cultivares tem sido descritas na literatura (WAY *et al.* 1990). Segundo a ABPM (2004) a macieira cultivada, denominada *Malus x domestica* Borkh, é uma das frutíferas que engloba a maior quantidade de variedades conhecidas, com 3 a 4 mil variedades, as quais são cultivadas em grande escala, em diferentes partes do mundo.

Em meados do século XX, os programas de melhoramento genético da macieira nos Estados Unidos foram reduzidos e coleções de muitas estações experimentais foram eliminadas. Isto resultou em perda considerável do germoplasma desta espécie (LAMB, 1974).

A maioria dos cultivares de macieira é diplóide ($2n=34$); mas numerosos clones são triploídes ($2n=51$) e algumas poucas variedades são tetraploídes ($2n=68$). A origem do número básico haplóide de *Malus* e outras Pomoideae, $x=17$, tem sido atribuída à hibridação ancestral entre dois tipos remotos selvagens, Prunoideae ($x=8$) e Spiraeoideae ($x=9$) (CHALLICE & WESTWOOD, 1981). Se isto de fato ocorreu, a macieira pode ser considerada uma espécie aloploplóide.

De fato, estudos com marcadores isoenzimáticos com pólen de progênies de cruzamentos controlados e de autofecundação indicaram que o genoma da macieira tem origem aloploplóide (CHEVREAU *et al.*, 1985). É atribuído a espécie *M. sieversii* uma das possíveis doadoras de pólen, a que deu origem a macieira cultivada. Harris *et al.* (2002), em estudo com marcadores de rDNA (DNA ribossômico) e cpDNA (DNA de cloroplasto), observaram que a macieira domesticada tem relação muito próxima com uma série de outras espécies de *Malus*, indicando como potenciais parentais que deram origem a macieira moderna, as espécies *M. prunifolia*, *M. baccata*, *M. sieboldii*, *M. turkmenorum* e *M. sylvestris* (JUNIPER *et al.*, 1998).

No Brasil o primeiro registro de implantação de pomar foi no ano de 1903, o qual possuía 135 ha, e foi instalado com 52 cultivares recebidas da Itália (BLEICHER, 2006).

Entretanto, o desenvolvimento comercial da cultura da macieira iniciou-se na década de 70, impulsionado pelo pioneirismo de alguns produtores e apoio do governo do estado de Santa Catarina. Através da execução do Profit, cujas metas naquela época previam um plantio de 3.150ha de macieiras até 1975. Este foi o marco decisivo para a implantação do negócio da maçã no Estado e no Sul do Brasil, sendo que passou da categoria de importador para exportador para várias partes do mundo (ABPM, 2003).

Atualmente, a produção de maçãs é uma atividade consolidada no Brasil, exercendo uma grande importância sócio-econômica no país. Os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul são os principais produtores, sendo responsáveis por aproximadamente 90% da produção nacional (BONETI *et al.*, 2006). Inúmeros desafios já foram superados possibilitando um aumento de produção de 1.528 t, em 1973, para 989.961 t na safra 2003/04 (Figura 01) (ABPM, 2004).

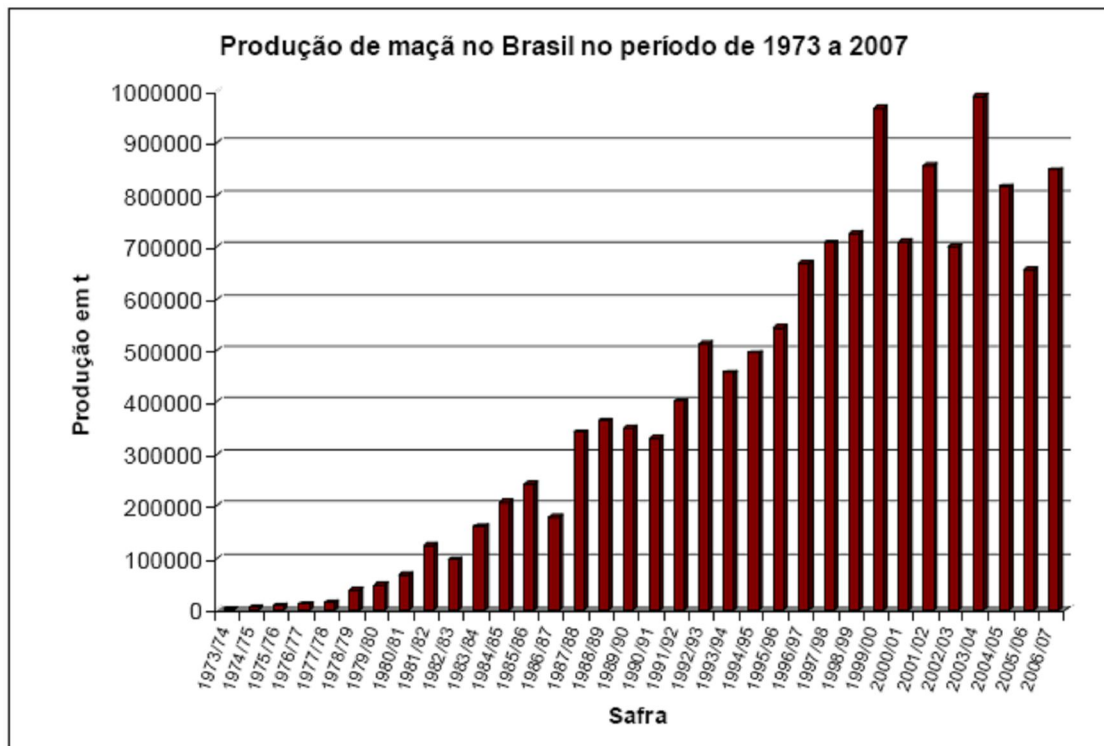


Figura 01 - Produção de maçã no Brasil no período de 1973 a 2007.

(Fonte: ABPM- Associação Brasileira dos Produtores de Maçãs.)

A produção de maçã continua aumentando, sendo que teve um crescimento de cerca de 100%, passando de 53 mil toneladas em 2006 para 106 mil toneladas em 2007. De janeiro a junho foram exportadas 372 mil toneladas em 2007 contra 326 mil em 2006, representando um crescimento de 14% em volume. Quanto ao valor, as exportações dos seis primeiros meses do ano representaram US\$ 203 milhões, 30% a mais que em 2006 - US\$ 156 milhões (ABPM, 2008).

As empresas nacionais líderes no setor contam com 78% na produção das variedades Gala, Fuji e variedades oriundas de suas mutações (Royal Gala, Imperial Gala, Galaxy, Fuji Suprema), as quais são produtos de classe internacional com permanente atualização tecnológica e de controle ambiental (ABPM, 2005).

Mas apesar de a macieira ser uma das espécies de cultivares mais consumidas, várias são as dificuldades encontradas no cultivo desta espécie, entre estas, a falta de adaptação das plantas em algumas regiões, devido à falta de fatores edafoclimáticos relacionados à temperatura, altitude, precipitação, entre outros fatores (PETRI, 2006).

1.2.1 Melhoramento vegetal

Até a metade do século XX, a maioria das cultivares de macieira tinha sido obtida por acaso, de *seedlings* selecionados por fruticultores. O início de programas de melhoramento genético dirigido é atribuído a Thomas Andrew Knight (1759 – 1838) que produziu as primeiras cultivares de genealogia conhecida. Nos últimos 25 anos, *seedlings* derivados de hibridações controladas, passaram a ter sucesso comercialmente, incluindo-se as cultivares: Elstar, Gala, Mutsu, Pinck Lady, Jonagold e Empire. As cultivares Empire e Mutsu descendem da cv. Delicious e as demais, de Golden Delicious (JANICK & MOORE, 1996).

O melhoramento da macieira é largamente desenvolvido ao redor do mundo. Foram iniciados programas de melhoramento a mais de 50 anos na Europa e América do Norte (DUREL, 1998). As principais características buscadas no melhoramento são a alta qualidade do fruto, combinada com resistência a doenças e pragas (LAURENS, 1998).

O início do programa de melhoramento da macieira no Brasil foi no Instituto Agronômico de Campinas (IAC), na década de 50, onde foram lançados diversos cultivares de baixa exigência em frio, a maioria entre 500 e 600 horas de acúmulo de frio necessário, incluindo-se as cultivares Rainha, Paulista, Bonita e Culinária (RIGINATO *et al.*, 1975).

A partir de 1973, o Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) implantou coleções de cultivares em Palmas e Guarapuava, lançando as cultivares Eva, Carícia e Anabela, todas adaptadas às condições de inverno ameno. A cultivar Eva, de modo especial, teve grande aceitação por parte dos produtores, por aliar a essa característica, o fato de produzir bons frutos de maturação precoce (HAUAGGE & TSUNETTA, 1999, HAUAGGE & BRUCKNER, 2002).

Hoje, o maior programa de melhoramento de macieira encontra-se no estado de Santa Catarina. Entre 1973 e 1982, a Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária (EMPASC) hoje EPAGRI, concentrou esforços nos estudos da identificação de um germoplasma promissor, a ser usado como parental para objetivos específicos, tais como de baixa a moderada necessidade de frio, frutos de alta qualidade, alta produtividade e curto período de juvenilidade (DENARDI & HOUGH, 1987).

A partir de 1982, foi dada ênfase para se obter cultivares adaptados às condições das regiões produtoras de Santa Catarina, com 500-600 horas e com 700 horas de frio. O melhor germoplasma disponível até então, para estender a colheita por mais de quatro meses, junto com boa adaptação climática, sabor e textura, eram constituídos pelos cultivares Mollie's

Delicious, Gala, Golden Delicious e Fuji. Cruzamentos entre estas cultivares produziram progênies segregando para mais baixa necessidade em frio, do que aquela apresentada pelos genitores (DENARDI *et al.*, 1998).

Atualmente, o programa de melhoramento genético da macieira na Estação Experimental de Caçador (EPAGRI) objetiva a criação de novas variedades imunes ou resistentes as principais doenças como a sarna (*Venturia inaequalis*), podridão amarga (*Gromerella. cingulata*) e Mancha foliar de glomerela (*Colletotrichum spp*). Além disso, também há o objetivo de desenvolver porta-enxertos adaptados às condições edafoclimáticas (DENARDI & HOUGH, 1987).

A produção nacional de maçãs é representada em grande parte, pelas cultivares Gala e Fuji, usando como polinizadoras as cultivares Golden Delicious, Mollie's Delicious e Granny Smith. A cultivar Fuji tem como principal limitação a fraca coloração da epiderme e quando cultivada em altitudes inferiores a 1.110m apresenta desuniformidade de tamanho e formato dos frutos. A cultivar Gala não consegue expressar todas as suas características em locais onde apresentem frios hibernais insuficientes. Outras cultivares, de maturação mais precoce do que a Gala, como as cultivares Eva, Princesa e Condessa têm tido boa aceitação por parte dos produtores (DENARDI *et al.*, 1988). A Epagri desde então, tem lançado várias cultivares de macieira provenientes do programa de melhoramento genético, dentre elas, Primícia (DENARDI *et al.*, 1986), Princesa (DENARDI *et al.*, 1986), Fred Hough (DENARDI & CAMILO, 1994), Joaquina (DENARDI & CAMILO, 1994), Catarina (BONETI *et al.*, 1996), Baronesa (DENARDI & CAMILO, 1997), Lisgala (DENARDI *et al.*, 1997), Fuji Suprema (PETRI *et al.*, 1997), Condessa (DENARDI & CAMILO, 1998c), Daiane (DENARDI & CAMILO, 1998a), Duquesa (DENARDI & CAMILO, 1998b) e Imperatriz (DENARDI & CAMILO, 2000).

O declínio na diversidade genética que vem ocorrendo no número de programas de melhoramento genético a nível mundial tem ocorrido a despeito do estabelecimento de problemas com pragas e doenças, onde a demanda no crescimento da cultura da macieira exige alta qualidade e resistência a estresses bióticos e abióticos. As populações a serem melhoradas, por esta razão, devem ter suficiente variabilidade genética na seleção de genótipos superiores que satisfaçam à demanda do mercado futuro (SHELBOURNE *et al.*, 1986). Estas populações melhoradas devem incluir genótipos que apresentem boa adaptabilidade climática e de solos, resistência a doenças e com boas características de frutificação (IPBGR, 1982; WAY *et al.*, 1990).

As coleções de germoplasma que apresentam diversas fontes de material genético, são a matéria prima necessária para os programas de melhoramento genético, de domesticação de novas espécies, assim como para evitar ou diminuir a vulnerabilidade que resulta da utilização de bases genéticas estreitas. Isto implica em dispor de coleções de um amplo espectro de espécies, tanto cultivadas como silvestres, pertencentes a um mesmo acervo genético, já que o advento das técnicas moleculares possibilitam manipulação do genoma das espécies impensada até pouco tempo (FERRER & CLAUSEN, 2001).

A resistência genética é considerada a estratégia mais eficaz no controle de doenças de plantas agrícolas. Há vários exemplos do seu emprego em culturas anuais e perenes, sendo o uso de variedades resistentes de grande auxílio no decréscimo de aplicações e concentrações de fungicidas (LOPEZ, 2001). Geralmente, é necessário explorar novas fontes de variabilidade genética, seja para encontrar características específicas de interesse como resistência a doenças, pragas e estresses ambientais ou para avançar e inovar no processo de melhoramento genético frente às novas exigências do mercado (ALVES, 2002).

Cultivares que possuem resistência vertical geralmente mantêm-se resistentes apenas por um curto período de tempo devido ao aparecimento (por mutação) e/ou seleção de genes correspondentes de virulência na população patogênica (LAMBALIS, 1995).

O emprego da resistência genética no controle de doenças vegetais representa um dos mais significativos avanços tecnológicos da agricultura. O uso de cultivares resistentes é o método de controle preferido simplesmente por ser o mais barato e de mais fácil utilização (BORÉM, 1997).

O estabelecimento da cultura da macieira tem sido acompanhado pela ocorrência de várias doenças, destacando-se entre elas, a sarna causada pelo fungo *Venturia inaequalis*, a mancha-foliar-da-Gala (MFG) causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, o oídio causado pelo fungo *Podosphaera leucotricha* e o “Russenting” anelar, doença transmissível por enxertia causada por vírus. (PETRI, 1998). A MFG é uma das doenças que causa mais danos no Estado, pois está associada a cultivar Gala que representa suscetibilidade a esta doença, a qual representa mais de 50% de área cultivada em Santa Catarina.

Dessa forma, o desenvolvimento de variedades de maçã que tenham resistência durável a mancha foliar de glomerela é de extrema importância para o programa de melhoramento da EPAGRI/Caçador, que já vem trabalhando na criação de novas variedades imunes ou resistentes as principais doenças como a sarna (*Venturia inaequalis*) e a mancha foliar de glomerela (*Colletotrichum gloeosporioides*) e a podridão amarga (*Glomerella cingulata*). É importante ressaltar, ainda, que as obtenções de cultivares de Gala resistentes a

MFG reduziriam o número de aplicações de fungicidas na cultura, o que vem ao encontro da crescente preocupação, por parte da sociedade, em consumir produtos mais naturais, com a menor quantidade possível de agrotóxicos (BONETI *et al.*, 2001).

1.2.2 Mancha foliar de glomerela

Atualmente, em algumas regiões produtoras de maçã do sul do Brasil, uma das doenças preocupantes é a mancha foliar da 'Gala' (MFG). Nos últimos tempos, a incidência da MFG, causada por *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*), vem aumentando.

A Mancha foliar de glomerela é uma doença característica das macieiras, é causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* que pode estabelecer relações parasíticas com vários hospedeiros. Desde a sua primeira constatação em 1983, no município de Porto Amazonas (PR) a Mancha foliar de glomerela vem se espalhando por todos os pomares de maçã do sul do Brasil (LEITE *et al.*, 1988). Disseminou-se para a região de Fraiburgo, SC, e atualmente encontra-se por toda a região produtora de maçã do Sul do Brasil. Apesar de se manifestar mais severamente nas regiões de clima mais quente, esta doença pode ocorrer também nas regiões mais frias, como a de São Joaquim, SC, conforme verificado no ciclo 1997/98 e 1998/99 (BONETI, 2001).

É favorecida pela elevação da temperatura, sendo que quando esta ultrapassa os 20°C, 10 horas de período de molhamento foliar (PMF) é suficiente para que ocorra a infecção e os sintomas apareçam em apenas 45 horas. Em relação aos frutos, quando submetidos a este mesmo PMF, o período de incubação da doença varia de 3 a 4 dias, sendo que a doença também é favorecida pela elevação da temperatura. Entretanto, a doença também pode se estabelecer sob baixas temperaturas, como a 12°C, desde que o PMF seja bastante longo (HAMADA, 2005).

Esta doença se manifesta durante o verão, causando desfolhamento severo das macieiras de diferentes cultivares. As folhas inicialmente apresentam manchas avermelhadas difusas. Mais tarde, o centro da lesão torna-se necrótico, com formato irregular e tamanho variável. As folhas lesionadas geralmente amarelecem e caem em curto período de tempo (BONETI *et al.*, 2006).

A germinação dos conídios ocorre somente na presença de água livre ou em elevada umidade relativa próxima a 100%, sendo que os conídios são o principal inóculo da doença (BECKER *et al.*, 2000). No processo de infecção, o apressório adere à superfície do hospedeiro por meio de uma mucilagem hemicelulósica, emitindo hifas de penetração e

colonização do tecido. Além das propriedades de sobrevivência, adesão e infecção do hospedeiro, os apressórios podem germinar dando origem a outros apressórios em cadeia (MENEZES, 2002).

Dependendo das condições ambientais ou do grau de maturidade do hospedeiro, a penetração não ocorre imediatamente e os apressórios entram num período de quiescência. Esta propriedade é de importância considerável para espécies de *Colletotrichum* que causam infecções latentes em frutas (LOPEZ, 2001).

A sobrevivência deste patógeno foi estudada através do monitoramento das folhas infectadas, coletadas da cultivar Gala. As folhas foram observadas quanto à formação de peritécios de *Glomerella cingulata*, mas não foi constatada a presença dos mesmos (KATSURAYAMA & BONETI, 1999). Mas, segundo Katsurayama *et al.* (2000), comprovou-se a presença do patógeno nas gemas e nos crancos, considerando que *C. Gloeosporioides* pode sobreviver saprofiticamente nos cancrios causados por outros patógenos (JONES *et al.*,1996).

Segundo Crusius, 2001 a primeira evidência de que os esporos partiam do chão foi descartada nos seus estudos, confirmando a presença do patógeno nas gemas e nos cancrios das macieiras. Estas propostas também estão de acordo com relatos realizados por Jones & Sutton (1996) e Sanhueza (1999) previamente, que já indicaram a planta dormente como a fonte principal de inóculo para a MFG.

Até pouco tempo não eram conhecidas raças do patógeno e tampouco sua origem, mas em estudos filogenéticos realizados por Ribeiro (2006) verificou-se que os isolados *C. gloeosporioides* de macieira aparecem na mesma ramificação do isolado de citros, o qual se encontra também no ramo do grupo dos isolados de goiaba serrana, sugerindo que estes isolados de macieira possuem características de ancestralidade com *Colletotrichum* spp. causador de doenças em citros e em goiaba serrana. Estes dados corroboram com os de KATSURAYAMA (2001) e FREEMAN *et al.* (1999), os quais sugerem que esta doença chegou às macieiras cultivadas nos Estados de São Paulo e Paraná, a partir das culturas tropicais ou subtropicais, como o citros.

As cultivares de macieira que são descendentes do grupo “Golden Delicious” são as mais suscetíveis. Deste modo, a cultivar Gala apresenta alta suscetibilidade, enquanto a Fuji, de genealogia do grupo Delicious, é considerada cultivar resistente (KATSURAYAMA *et al.*, 1999). Resultados de progênies de parentais resistentes e suscetíveis, quando inoculadas com MFG indicaram a possibilidade de haver mais de um gene controlando a herança da resistência, ou seja, haveria um alelo dominante para o loco C_1 e dois alelos recessivos nos

loci C2 e C3 (DANTAS *et al.*, 2006).

O mecanismo de resistência genética a esta doença nas cultivares fundamentam-se em reação de caráter monogênico e sob controle homocigoto recessivo, o que não oferece segurança da permanência de sua eficiência a longo prazo para o controle da MFG.

Segundo Silva, 2007 a confirmação desta hipótese limitaria a nível comercial o uso deste mecanismo de controle da MFG, devido ao iminente risco de quebra da resistência por formas mutantes deste patógeno (novas raças).

Diante disto, o estudo dos genótipos no Banco de Germoplasma para a obtenção de cultivares resistentes à Mancha da Gala é imprescindível para o controle da doença no Sul do Brasil.

1.2.3 Bancos de germoplasma

O termo germoplasma é originário das expressões “plasma” ou matéria primordial dos seres vivos e “germinal”, referente às células germinativas, capazes de gerar novas células por simples divisão ou por união de outros elementos germinais (PEREIRA, 1989).

Germoplasma é definido por Allard (1971) como sendo a soma total do material de uma espécie. Assim, estes poderão ser na forma de plantas, anteras, pólen, sementes, tecidos (meristema, calo), células ou estruturas ainda mais simples.

Entre as atividades do BGM (Banco de germoplasma de maçã) estão a coleta de material silvestre e cultivado, a caracterização e avaliação dos genótipos, e a promoção da introdução e intercâmbio desses recursos. Esse processo visa assegurar que o máximo de diversidade genética seja preservada e utilizada de forma racional (FIGUEIRA & CASCARDO, 2001).

A conservação *in situ* refere-se à manutenção das espécies selecionadas no seu habitat natural em parques, reservas biológicas ou reservas ecológicas. Conservação *ex situ* é a conservação de espécies vegetais fora do seu ambiente natural, através de coleções de plantas no campo, de sementes em bancos de sementes, ou de coleções de plântulas em bancos *in vitro*.

A atividade científica da conservação de germoplasma foi proposta nos anos 70 para prevenção da erosão genética e para o melhoramento da produtividade agrícola (IBPGR, 1993). A conservação de germoplasma de raças locais, cultivares domésticas e parentes silvestres de espécies agronômicas tem sido uma das mais importantes áreas de pesquisa na Botânica desde então. Seu principal objetivo é o desenvolvimento de técnicas para a

conservação a longo prazo da variabilidade genética de espécies vegetais com a máxima integridade genética e biológica possíveis (BAJAJ, 1995).

Essa conservação de germoplasmas de espécies tem por objetivo ainda, manter indefinidamente a diversidade genética e garantir o maior número possível de genótipos para os programas de melhoramento genético (GIACOMETI, 1986).

Em Geneva, N.Y está localizada a maior coleção de germoplasma de maçã, que consiste em 5000 macieiras representadas por 2500 genótipos diferentes. Entre eles estão espécies selvagens, landraces, cultivares atuais e cultivares obsoletas (1996).

Das coleções existentes no Brasil, existem dois Bancos de Germoplasma de maçã com um número significativo, um no IAPAR/PR com 748 genótipos e outro na EPAGRI/SC com 442 genótipos.

Em Santa Catarina existe o banco de germoplasma de pomáceas mantido pela EPAGRI- Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Figura 02) o qual está situado nos paralelos geográficos: Longitude de 51° 00' 59''; Latitude: 26° 46' 32'' e altitude de 960 metros. A quantidade de frio hibernal médio é de 556 horas iguais ou inferiores 7,2° C. As temperaturas mínimas e máximas médias anuais são: inverno: 7,0° e 19,2° C, respectivamente; verão: 15,1°C e 26,0° C.



Figura 02 - Banco de Germoplasma de Macieiras (BGM) EPAGRI/Caçador-SC.

(Fonte: FURLAN, 2007)

Segundo Denardi (1997) o Banco de Germoplasma de Pomáceas é composto por 717 genótipos, sendo 442 de macieira (*Malus* sp.), 246 de pereira (*Pyrus* sp.) e 29 de marmeleiro (*Cydonia* sp.). No Banco de germoplasma de maçã (BGM) de macieira, a distribuição por origem genealógica é a seguinte: 380 genótipos descendentes da *Malus pumila*, Mill.; 33 genótipos descendentes de híbridos das espécies silvestres *Malus pumila* e *Malus floribunda*; 10 genótipos correspondentes a espécies silvestres (*M. aldenhamensis*, *M. atrosanguinea*, *M. baccata*, *M. elley*, *M. hillieri*, *M. platicarpa*, *M. robusta*, *M. prunifolia*) e 19 genótipos de porta-enxertos, pertencentes à espécie *M. pumila*. O BGM dispõe de importantes fontes de resistência genética as principais doenças e pragas da espécie. Existem 33 genótipos portadores de resistência vertical à Sarna (*Venturia inaequalis*), também o clone *Mildew Immune*, a cv. Discovery e 30 mutações da cv. Delicious, todas portadoras de alta resistência ao oídio (*Podosphaera leucotricha*). Em virtude da preferência mundial por frutos de epiderme vermelha e porque esta característica é dominante sobre frutos amarelos ou verdes (sem antocianina), o BGM compõe-se, basicamente, por variedades vermelhas (81,1%), sendo a sua grande maioria composta por variedades importadas de outros países (9,9%), tais como, Estados Unidos, Europa, Japão, Israel, Nova Zelândia, Austrália e Argentina.

Dentre os genótipos introduzidos no BGM, 61 são de origem brasileira, 30 são oriundas do Rio Grande do Sul, 10 de Santa Catarina, 3 do Paraná e 10 de São Paulo. Oito destes materiais são de origem desconhecida, mas coletados nas regiões de colonização européia em Santa Catarina e Rio Grande do Sul. O BGM ainda compreende mutações somáticas advindas de variedades comerciais importadas, 30 mutações da cultivar Gala; 9 mutações da Fuji; 8 da Golden Delicious e 11 mutações da Jonagold. Um terço dos genótipos existentes atualmente no BGM constitui-se de seleções locais ou importadas, num total de 104 genótipos.

Em conjunto a conservação e ampliação do BGM, a Epagri vem utilizando os recursos genéticos do Banco desenvolvendo um amplo programa de melhoramento genético, do qual já foram criadas 66 cultivares adaptados ao clima local e resistente às principais doenças da macieira. Este programa já introduziu no mercado 10 novos cultivares de macieira, dentre as quais três são resistentes à sarna e sete são resistentes a Mancha foliar de glomerela (MFG). Dentre estas podemos destacar a Baronesa, Catarina, Fred Hough, Imperatriz, Princesa, Condessa e Duquesa (DENARDI & HOUGH, 1987; DENARDI & CAMILO, 2002.).

1.2.4 Marcadores moleculares

A utilização de marcadores de DNA tem aumentado recentemente em virtude do número praticamente ilimitado de polimorfismos que podem ser obtidos e pelo fato de não serem influenciados pelas condições ambientais. A documentação de todos os dados de caracterização e as informações dos genótipos contidos nos Bancos de Germoplasma é uma necessidade para permitir a rápida identificação de genótipos com as características desejadas.

A macieira é um bom exemplo para demonstrar a utilidade dos marcadores moleculares, pois devido ao longo período de cada geração, o grande espaço, tempo e alto custo envolvidos na análise e manutenção de populações a campo e o modo de reprodução alógamo os estudos genéticos e de melhoramento pelas técnicas convencionais têm sido dificultados. Nestas situações, os marcadores moleculares podem ser ferramentas muito úteis para detectar genes responsáveis por características economicamente importantes e para facilitar a seleção dessas características em programas de melhoramento (MALIEPAARD *et al.*, 1998, LIEBHARD *et al.*, 2003b).

O desenvolvimento e a aplicação de marcadores altamente informativos, como os microssatélites, para localizar e rastrear genes controlando características agrônômicas importantes é essencial para o melhoramento da macieira. Esses marcadores podem ser também utilizados para identificação de variedades e gerenciamento dos recursos genéticos (GIANFRANCESCHI *et al.*, 1998; GOULÃO *et al.*, 2001). Marcadores moleculares são imprescindíveis como auxílio na administração de bancos de germoplasma e programas de melhoramento, que objetivam a ampliação da base genética por meio de cruzamentos amplos (BRONDANI *et al.*, 2003).

Dentre os marcadores mais informativos baseados nas diferenças de comprimento das seqüências amplificadas pela reação de PCR estão os microssatélites, ou simples seqüências repetidas (SSRs). Esta classe de marcadores moleculares têm sido amplamente utilizada em estudos com diferentes aplicações em muitos campos da genética que incluem conservação, genética de populações, melhoramento molecular e teste de paternidade (OLIVEIRA *et al.*, 2006)

Esses marcadores estão presentes em regiões expressas e não expressas do genoma e são usualmente caracterizados pelo alto polimorfismo que é decorrente das altas taxas de mutação presente nesses locos. Os erros que acontecem nos processos de recombinação, o *crossing-over* desigual e o processo de *slippage* da polimerase no processo da replicação ou

reparo do DNA são mecanismos que levam as altas taxas de mutação que variam de loco para loco (STRAND, 1993; SCHLOTTERER, 2000).

Quando os microssatélites são individualmente amplificados, usando um par de iniciadores complementares às seqüências únicas que flanqueiam, eles quase que invariavelmente mostram extensivo polimorfismo para tamanho. Esta variação no tamanho dos produtos de PCR é consequência da ocorrência de diferentes números de unidades repetidas dentro da estrutura do microssatélite (MORGANTE & OLIVIERI, 1993; McCOUCH *et al.* 1997).

Desse modo, vários alelos podem ser detectados para uma determinada população. Indivíduos homozigóticos possuem o mesmo número de repetições nos cromossomos homólogos, enquanto indivíduos heterozigóticos possuem número de repetições diferentes nos dois homólogos. Portanto, o loco é definido pelo par de primers e os vários alelos, pelo tamanho das bandas amplificadas (OLIVEIRA, 2006).

Um grande número de marcadores microssatélites tem sido descrito em macieira, desenvolvidos em diferentes centros de pesquisa, tais como o NZ-SSRs, desenvolvidos pelo 'Horticulture and Food Research Institute of New Zealand' em Ackland, Inglaterra (Guilford *et al.*, 1997), CH-SSRs, desenvolvidos pelo 'Institute of Plant Sciences, Swiss Federal Institute of Technology' em Zurich, Suíça (GIANFRANCESCHI *et al.* 1998; LIEBHARD *et al.*, 2002) e COL-SSR, originalmente identificados pela Cornell University, Geneva, NY, USA (HEMMAT *et al.* 1997). Inicialmente foram desenvolvidos 16 iniciadores para *Malus x domestica* (Borkh), oriundos de uma biblioteca genômica da cultivar Golden Delicious, dos quais foram validados em 19 cultivares de macieira, apresentando número médio de alelos por loco de 6,1 com heterozigosidade média de 0,74.

Dentre os trabalhos com estes marcadores, destacam-se ainda o estudo em 66 genótipos da coleção do Banco da Universidade de Cornell, Geneva, NY, o qual foi avaliado com 8 iniciadores microssatélites com o objetivo de caracterização da diversidade e identidade genética e das relações de parentesco entre os genótipos. Altos níveis de variação foram encontrados com uma média de 12,1 alelos por loco e heterozigosidade média de 0,73 (HOKANSON *et al.*, 1998). Em 2001 os mesmos autores ampliaram o trabalho para 142 genótipos de 23 espécies de *Malus*. Desta vez o número médio de alelos por loco foi de 26,4 e a heterozigosidade foi de 0,623. A conclusão do estudo foi que com 8 iniciadores foi suficiente para diferenciar todos os genótipos estudados. SILFVERBERG (2006) construiu um mapa de ligação em maçã com 168 locos novos, quase que o dobro de SSRs já conhecidos.

Grupos de pesquisadores em todo mundo têm desenvolvido mapas do genoma da macieira. Os mapas já existentes podem ser classificados em dois grupos distintos: mapas de referência, com o objetivo de servir de base para pesquisas futuras (MALIEPAARD *et al.*, 1998; LIEBHARD *et al.*, 2003a), e mapas específicos, que visam localizar genes de interesse, como genes de resistência a doenças (YANG *et al.*, 1997; KING *et al.*, 1998; CHENG *et al.*, 1998, PATOCCHI *et al.*, 1999; XU *et al.*, 2000; XU *et al.*, 2002; HUARACHA *et al.*, 2004) ou relacionados a características de crescimento e desenvolvimento das plantas (CONNER *et al.* 1998; LIEBHARD *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, os trabalhos em genética de macieira fizeram significantes progressos, em parte devido à disponibilidade crescente de marcadores de SSR. Estes provaram ser extremamente úteis por integrar estudos independentes e desenvolvimento de inovadores procedimentos para avaliar associações entre os mesmos. O alto nível de transferabilidade, alto grau de polimorfismo, e a facilidade relativa pela qual eles são gerados, enquanto sendo baseados em PCR, fazem deles marcadores de escolha para alinhamentos entre mapas de ligação de macieira. (SILVERBERG-DILWORYH, 2006).

Todas estas características fazem com que marcadores baseados em SSRs sejam ferramentas ideais para identificação e discriminação de genótipos e estudos de variabilidade genética, pois permitem a determinação dos alelos presentes em uma população. O cálculo das suas frequências apresenta elevado número de alelos, isto é, alto polimorfismo intraespecífico em cada loco, o que o torna informativo em populações diferentes permitindo a caracterização de distintos genótipos em uma coleção (SAGHAI-MAROOF *et al.*, 1994; SHARMA *et al.*, 1995; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Estes marcadores permitem ainda, compreender e organizar a variabilidade genética de um programa de melhoramento de forma única, isto é, acessando a variabilidade do DNA, que não é influenciada pelo ambiente como são, por exemplo, os caracteres morfológicos e fenotípicos. A primeira consequência disto é a possibilidade de planejar os cruzamentos de um programa de forma a maximizar as diferenças genéticas entre genótipos elites. A segunda é a possibilidade de organizar o germoplasma do programa em 'pools' gênicos de interesse, facilitando a escolha e diminuindo o número de combinações a serem feitas pelo melhorista (MILACH, 1998).

2 CAPÍTULO II - ESTUDOS DA RESISTÊNCIA GENÉTICA DOS GENÓTIPOS DO BANCO DE GERMOPLASMA DE MACIEIRA DA EPAGRI À MANCHA FOLIAR DE GLOMERELA (*Colletotrichum gloeosporioides*)

2.1 RESUMO

Uma das prioridades do programa de melhoramento genético de macieira da Epagri é a obtenção de cultivares resistentes à mancha foliar de glomerela - MFG, doença essa causada principalmente pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, e que tem causado elevadas perdas na produção. Para tanto, o primeiro passo é a identificação do germoplasma portador dos genes de resistência. No presente trabalho foram utilizados 3 isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de diferentes regiões produtoras de maçã. Estes isolados foram inoculados em 245 genótipos pertencentes ao Banco de Germoplasma de macieira – BGM, da Epagri / Estação Experimental de Caçador - EECd, SC. Para a inoculação em tecido foliar, a concentração de conídios foi ajustada para 10^3 esporos/ml. Setenta e duas horas após a incubação, sob temperatura de 25°C, foi realizada a avaliação da incidência para presença ou ausência de sintomas e para severidade da doença. Para esta, utilizou-se escala diagramática, a qual consistiu de 0= 0%; 1=3%; 2= 6%; 3= 12%; 4= 24%; 5= > de 48% da superfície foliar com sintomas. Nesta avaliação considerou-se apenas as cinco primeiras folhas a partir do ápice de cada ramo inoculado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições. As diferenças de severidade entre os genótipos foram testadas através da Anova não-paramétrica Kruskal Wallis. Entre os genótipos testados, 187 (76,3%) manifestaram resistência e 58 (23,7%) manifestaram suscetibilidade à MFG. Entre as cultivares suscetíveis, não houve diferença no grau de severidade de ataque da MFG. Os resultados obtidos neste estudo têm, dentre outras, a finalidade de subsidiar os programas de melhoramento genético da macieira na seleção de parentais, objetivando a incorporação de resistência genética à MFG nas futuras novas cultivares.

Palavras-chave: *Malus domestica* Borkh. Melhoramento genético. Resistência a doenças. Mancha foliar de glomerela.

2.2 ABSTRACT

One of the priorities at this moment of the tree apple genetic breeding program in the south of Brazil is the obtainment of the resistant cultivars of the “Mancha Foliar da Gala (MFG)” disease. This illness is caused mainly by *Colletotrichum gloeosporioides* fungus, what have been caused great loss in the apple production. Toward to solve this problem, the first step is the vegetable identification, what will supply the resistant genes. In this work were used 3 isolates of *C. gloeosporioides* from different apple producer places, and 245 access belong to the Active Germoplasm Banc Apple Tree “Estação Experimental da EPAGRI de Caçador, Santa Catarina”. To the inoculation in the leaf tissue, the concentration of the conidia was adjusted to 10^3 spore/ml. After 72 hours of the incubation at 25°C, was realized the evaluation of the disease incidence with presence and absence of the symptom and severity, through the diagrammatic scale. The experimental delineation was completely by chance with 3 repetitions. The severity differences among the access were tested through the Anova non-parametric Kruskal Wallis test. Among the tested access, 185 were resistant and 32 susceptible. From those susceptible, there was not difference in the severity degree of the MFG attack. The data obtained in this study can help in the choice of resistant access, what could be used like parentage in the genetic breeding programs of the apple tree, in order to obtain the resistance to this pathogen.

Keywords: Inoculation. Access. Resistant. Susceptible. Breeding.

2.3 INTRODUÇÃO

A maçã é a fruta de clima temperado de maior dispersão, e a mais comercializada e consumida como fruta fresca em todo o mundo, sendo a quarta frutífera mais produzida, perdendo somente para citros, uva e banana (HAUAGGE & BRUCKNER, 2002). Pertencente à família Rosaceae tem suas origens nas montanhas do Cáucaso, Oriente Médio e Leste Asiático. Bastante cultivada na Ásia e Europa desde os tempos mais antigos, é hoje cultivada em várias regiões do mundo, desde a Sibéria até as regiões altas dos trópicos (BLEICHER, 2006).

O BGM da EPAGRI é composto de um amplo acervo de germoplasma, cujos genótipos apresentam ampla diversidade de características de importância agrônômica. Além de importante acervo de características de valor comercial, compõem-se de valiosas fontes de

resistência às principais doenças da macieira como a sarna (*Venturia inaequalis*), podridão amarga (*Glomerella. cingulata*) e oídio (*Podospaera leucotricha*), além da mancha foliar de glomerela (*Colletotrichum* spp). Para os programas de melhoramento genético, a coleta, a caracterização e a manutenção de germoplasma, são indispensáveis para ampliar e preservar a variabilidade genética. HAMMER (2003) afirma que um banco de germoplasma não pode ser um museu, devendo-se estimular a avaliação dos genótipos por meio de análises genéticas. O manejo eficiente de germoplasma vegetal é de vital importância para o pesquisador, pois este precisa de um germoplasma geneticamente puro e bem caracterizado para utilizá-lo em suas pesquisas e para o melhoramento (MARTINELLO, 2001).

O melhoramento genético da macieira é amplamente realizado na busca de maior produtividade, melhor sabor, aparência, e armazenamento, mas é ainda deficiente na busca de resistência da espécie para muitas doenças e pragas (ALDWINCKLE, 1990). Apesar da macieira ser uma das espécies de fruteiras mais consumidas, várias são as dificuldades encontradas no seu cultivo, dentre elas, a falta de adaptação das plantas em algumas regiões, devido a fatores edafoclimáticos relacionados à temperatura, altitude, precipitação, entre outros (PETRI, 2002).

No Brasil, a cultura da macieira está sujeita ao ataque de inúmeras doenças, típicas de clima tropical, devido às condições climáticas marginais para o seu cultivo. Entre estas doenças, a mancha foliar da glomerela (MFG), é atualmente uma das duas doenças mais importantes da ‘Gala’ e de outras cultivares descendentes da ‘Golden Delicious’ (KATSURAYAMA, 2001). A MFG manifesta-se a partir do final da primavera, reduzindo a produção quantitativa e qualitativamente (BONETTI *et al.*, 1999). Os danos mais comuns são a desfolha da planta em 50 a 75% e a formação de cancrios em mais de 50% dos frutos (CEREZINE *et al.*, 1992).

O controle de doenças nos pomares de macieira no Sul do Brasil representa um dos principais itens nos custos de produção. A maciça aplicação de fungicidas, além de encarecer a produção de maçãs, tem efeitos danosos sobre o agroecossistema e sobre a saúde do consumidor. Dentre as alternativas de controle, a resistência genética, além de segura, tem baixo custo e ampla aceitação social, visto que apresenta baixo impacto ambiental. Por isto, ela representa um dos mais significativos avanços tecnológicos da agricultura. Segundo BORÉM (1997), o uso de cultivares resistente é o método de controle preferido, simplesmente por ser o mais barato e de mais fácil utilização.

Em virtude da severidade de ataque e dos altos custos de controle, uma das prioridades atuais dos programas de melhoramento genético de macieira no Sul do Brasil é a obtenção de

cultivares resistente à MFG. Neste processo, o passo inicial é a identificação de possíveis fontes de resistência existentes no Germoplasma disponível. Segundo as pesquisas já realizadas (KATSURAYAMA *et al.*, 2001), cultivares como a Fuji são portadoras de resistência de natureza monogênica e sob controle recessivo. Resultados de segregação observados em estudos envolvendo outras cultivares resistentes, como Imperatriz, Daiane, Baronesa, também apontam para este tipo de resistência (DENARDI, comunicação pessoal). Inúmeras pesquisas em nível mundial envolvendo fruteiras têm revelado a ocorrência de quebra de resistências genéticas de natureza monogênica a fungos (OHM & SHANER, 1992).

Embora na literatura seja dito que a resistência genética do hospedeiro é, sem dúvida, o método mais eficiente, econômico e que menos riscos oferece à saúde do produtor, do consumidor e do ambiente (SARTORATO, 2006), é de fundamental importância que este recurso também ofereça proteção aos cultivos por longo tempo. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar primeiramente a presença de novas fontes de resistência genética contra a MFG nos genótipos do Banco de Germoplasma da Macieira, na Epagri em Caçador e, numa segunda etapa, verificar a possível existência de fontes geneticamente diferenciadas de resistência nos diferentes genótipos portadores desta característica.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Material vegetal

Para a inoculação dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* foram utilizados 245 genótipos do Banco de Germoplasma da Macieira – BGM, da EPAGRI / Estação Experimental de Caçador. Na escolha do material para este estudo, excluíram-se os genótipos que se enquadravam nas seguintes situações: a) mutações somáticas das cultivares comerciais, cujo fator mutante não tem relação com a mancha foliar de glomerela – MFG; b) genótipos de natureza silvestre, produtores de frutos muito pequenos – caráter dominante sobre tamanho comercial; c) genótipos portadores de qualquer característica altamente indesejáveis para fins de melhoramento genético, como frutos de muito baixa qualidade, plantas de muito alto requerimento de frio hibernal e/ou muito suscetíveis a outros organismos fitopatogênicos, como a sarna (*V. inaequalis*), oídio (*P. leucotricha*), podridão amarga (*G. cingulata*).

Durante os meses de dezembro e janeiro 2006/2007, foram coletados 4 ramos de crescimento do ano para cada genótipo com, aproximadamente, 40cm de comprimento. Acondicionados em caixas de isopor contendo gelo, foram levados ao laboratório, onde foram

preparados deixando-se apenas de 6 a 8 folhas mais novas, do ápice caulinar. Imediatamente foram colocados em potes contendo solução de água destilada acrescida de 2,0% de açúcar para evitar a desidratação dos ramos até o final do período de incubação.

2.4.2 Preparo do inóculo e inoculação dos ramos

Foram utilizados três isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de diferentes pomares de macieira, sendo um da região de Caçador, o 4355-6, um da região de Campo Tenente-PR, o M-18, e um da região de Fraiburgo, o M-15. Foram selecionados estes isolados com base em outros estudos de inoculação da MFG, nos quais apresentaram elevado índice de severidade de ataque (HAMADA, 2005). As colônias dos isolados foram mantidas em meio de cultura BDA (Batata-dextrose-ágar 39g/ L) durante 14 dias em BOD, sob regime de luz de 12h por 14 dias $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A suspensão de esporos utilizada para as inoculações foi obtida através de raspagem superficial do micélio das placas de petri e filtragem em gaze esterilizada. As suspensões de esporos dos três isolados foram misturadas. Em seguida, foi realizada a contagem da concentração dos esporos com auxílio de hemacitômetro Neubauer e ajustada para 10^3 conídios/mL através de diluição em água destilada. Foram realizadas duas inoculações. A primeira na totalidade das amostras dos 245 genótipos do BGM e a segunda somente nos genótipos que apresentaram sintomas na primeira inoculação. Foram feitas por pulverização da suspensão de conídios utilizando um compressor de ar. Neste processo, o tempo de inoculação foi rigorosamente cronometrado, pulverizando-se as 5 ou 6 folhas mais novas, do ápice caulinar, durante 10 segundos por genótipo. Após a inoculação, os ramos foram borrifados com água destilada, repostos nos vasos e, em seguida, cobertos com sacos plásticos para manter as folhas úmidas durante todo o período de incubação.

2.4.3 Incubação e avaliação do grau de severidade de ataque do *C. gloeosporioides*

Após inoculados, os ramos foram mantidos sob incubação por 72 horas, em câmara úmida, com nebulização intermitente, no regime horário de 45 minutos desligada para 15 minutos ligada, mantendo o ambiente em 100% de UR (Figura 03). A temperatura foi mantida em $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Na testemunha foi empregada apenas água deionizada e esterilizada. Após vinte e quatro horas, os ramos foram novamente borrifados e assim mantidos por mais 24 horas. Após este período, os sacos plásticos foram removidos e o regime de nebulização foi

desligado. Após quarenta e oito horas, foi feita a avaliação da presença de sintomas de ataque da MFG nos ramos. Vinte e quatro horas após foi avaliada a severidade de ataque da doença com auxílio de uma escala diagramática (BECKER, comunicação pessoal), onde 0= 0%; 1=3%; 2= 6%; 3= 12%; 4= 24%; 5= > de 48% da superfície foliar com sintomas. Nesta avaliação considerou-se apenas as cinco primeiras folhas a partir do ápice de cada ramo inoculado. Para a estimativa da severidade, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$Severidade(\%) = \frac{F1.n + F2.n + F3.n + F4.n + F5.n}{5.5}$$

Onde: F = folha avaliada (1 a 5);

n = nota atribuída



Figura 03- A) Ramos dos genótipos de macieira na câmara de inoculação. B) Ramos dos genótipos de macieira após a inoculação, envoltos com sacos plásticos.

(Fonte: FURLAN, 2007)

2.4.4 Delineamento experimental e análise estatística

Para o ensaio de inoculação, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo que cada ramo representou uma repetição, ou seja, foram feitas três repetições por genótipo. Os dados do ensaio foram submetidos à análise de variância para dados não paramétricos (Anova de Kruskal Wallis) com 5% de significância. As diferenças de

grau de severidade entre os genótipos suscetíveis foram verificadas através do intervalo de confiança entre as amostras.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro ensaio, em que foram inoculados 245 genótipos do Banco de Germoplasma de Macieira - BGM, a mistura de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* foi patogênico para 58 genótipos (Tabela 02), totalizando 23,7%. Os demais 187 genótipos (Tabela 01) se mostraram resistentes a mancha foliar de glomerella - MFG, totalizando 76,3% do total inoculado. Os primeiros sintomas nos genótipos suscetíveis foram observados 48 horas após a inoculação, quando as folhas inoculadas com os isolados apresentaram, inicialmente, pequenas lesões de coloração marrom-avermelhadas (Figura 04), distribuídas de modo geral em toda a extensão da folha. Após 72 horas da inoculação, foi observado progresso das lesões e coalescência da área foliar afetada.

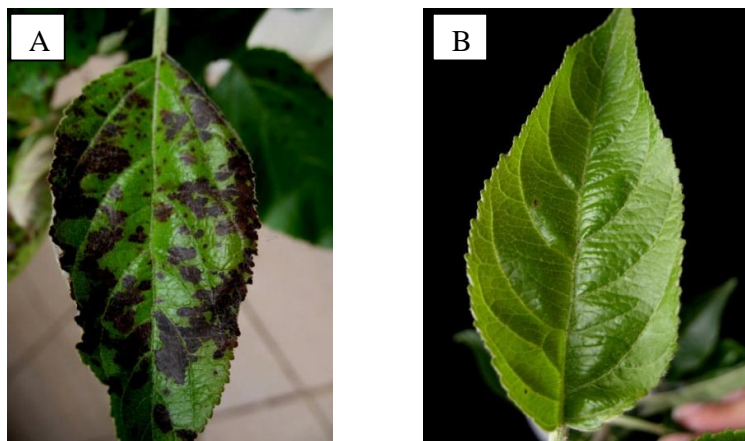


Figura 04 - A) Foto do genótipo Akagui 72 horas após inoculação apresentando sintoma e B) genótipo Sungold 72 horas após inoculação, sem sintoma. (Fonte: FURLAN, 2007)

No presente estudo, folhas da cv Fuji não apresentaram sintomas, corroborando com resultados obtidos em inoculações realizadas por HAMADA (2005). Este autor observou sintomas somente na cv Gala quando usou diferentes isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, comprovando a suscetibilidade desta cultivar a esta doença de acordo com KATSURAYAMA *et al.* (2002).

Tabela 01 - Genótipos resistentes do BGM da Epagri / Estação Experimental de Caçador - EECd, SC, 2008.

GENÓTIPOS RESISTENTES DO BGM			
21.300.21	Dorsett Golden	M-6039	PX 647
21.300.13	Dulcina	Maayan	PX 663
21.361.75	Early Styman	Mac Free	PX 1033
21.373.58	Ein Shemer	Malus eley	Quinte
21.379.64	Empire	Mechinoku	Red Free
21.502.1	Ervin	Melrose	Red Delicious
21.555.13	Eva	Mere	Well Spur
Akane	Everest	Milton	Red Gold
Alkmene	Fiesta	Monroe	Red June
Angius	Florina	N.Easygro	Red Rome
Annurca	FR 8	Natsumidori	Reinete Canada
Argentina 2	FR 16	Nebuta	Reinete du Mans
Arlet	Fred Hough	Nero Red Rome	Rene Reinetes
B. Boscoop	Fuji Suprema	Newton Pippin	Romy 50
Baldwin	Galcía	Niagara	Ruby Spur
Baronesa	Gloster 69	Nippling Staymann	Sansa
Belfigriole	Gold John	Nitany	Shell Red
Bem Davis	Goltey	NJ-36	SM 69-2
Black Stayman	Gorden	NJ-41	SM 69-3
Blackjon	Grangile Red	NJ-44	SM 78-2
Bonita	Greensleeves	NJ-45	SM 82-1
Braeburn	Grive Rouge	NJ-49	Spartan
Brasil	Groth Red	NJ-50	Stark J. Gremes
Carícia	Harold Red	NJ-51	Stark Jonadel
Carla	Hawai	NJ-55	Staymann
Catarina	Hamme 6	NJ-75	Summerland
Centenária	Hokuto	Nova Mac	Sungold
Close	Holliday	Ohrin	Suntan
Conrad Red	Holland	Orankis Ten	Super Kidd's
Coop 8	Holly	Pachacamac	Sweet Cornelly
Coop 14	Honey Gold	Pacific Rose	Trop. Beauty
Coop 16	Imperatore	Paulared	Tsugaru
Coop 24	Imperatriz	Pilat	Ultrared
D1R103T245	Israel 8-3	Pome 3	Vered
D1R102T116	Jamba	Pome 10	Waine
D1R63T94	Jersey Mac	Pome 12	W. Banana
D1R68T571	Jona Mac	Pome 14	Wealthy
D1R78T2	Jonared	Pome 15	Webster
D2R30T30	Jonathan	Pome 16	Wemmerschok
D2R31T237	José Bins	Pome 17	Winter Gold
D2R38T126	July Red	Pome 20	Yoko
D2R39T243	Kendall	Pome 24	Ziger
D2R40T253	Kent	Pome 25	
D2R40T258	Kitanosaki	Pome 28	
Daiane	Liberty	Porporate	
Delcon	M. aldenhamensis	Priam	
Delícia	M. atrosanguinea	Princesa	
	M. floribunda	Priscilla	
	M. robusta	PX 322	

No segundo ensaio foram inoculados apenas os genótipos suscetíveis do BGM, com o objetivo de se avaliar a severidade de ataque da doença. Dos 58 genótipos suscetíveis foram

inoculados os 33, que possibilitaram uma segunda coleta seguida de material no campo. Entre os genótipos suscetíveis, houve diferenças significativas quanto ao percentual de severidade de ataque da MFG ($H_{(32, N=99)}=55,99$; $p=0,0054$). No entanto, conforme é mostrado na Figura 01, levando em conta o intervalo de confiança, as diferenças verificadas entre os genótipos analisados não têm grande magnitude. Isto permite sugerir que a relação de segregação resistente : suscetível é do tipo qualitativo, conforme descrita por KATSURAYAMA *et al.*, (2004).

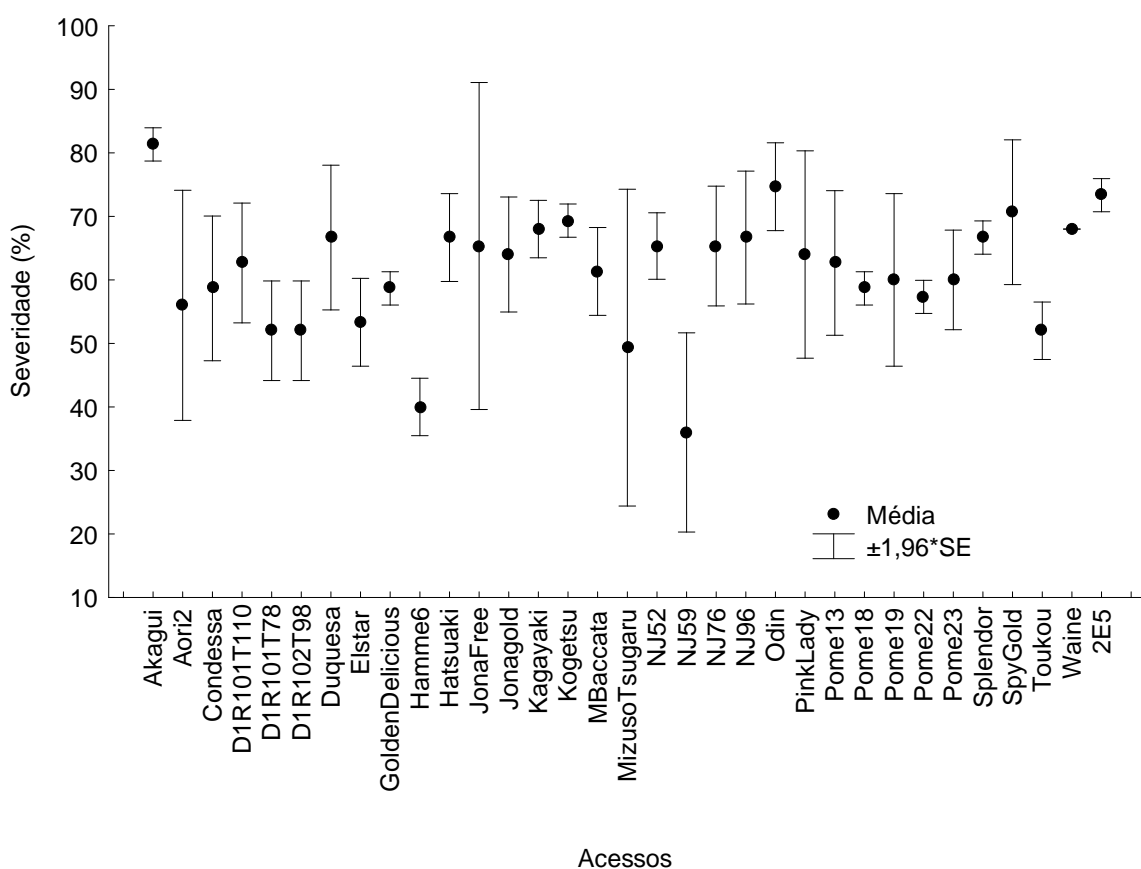


Figura 05 - Diferença de severidade (%) dos genótipos suscetíveis a Mancha Foliar de Glomerela do Banco de Germoplasma de Maça (BGM) da Epagri / Estação Experimental de Caçador - EECd, SC, 2008.

Estes e outros pesquisadores obtiveram resultados de populações de cruzamentos envolvendo combinações de cultivares resistentes e suscetíveis, que apontam para um controle monogênico recessivo (KATSURAYAMA *et al.*, 2001; KATSURAYAMA *et al.*, 2004; DANTAS, *et al.*, 2003). A confirmação da segregação monogênica recessiva para resistência à MFG em macieira, certamente limitaria o uso deste mecanismo de controle em

nível comercial, devido ao iminente risco de quebra da resistência por formas mutantes (novas raças) deste patógeno. Cita-se como exemplo outras doenças, como a sarna e o oídio da macieira (SILVA, 2007). Por outro lado, não há relatos de que existam ou de que tenham sido conduzidas outrora pesquisas para resistência à MFG. Por ser uma doença de climas quentes, encontra no Sul do Brasil condições ideais para seu desenvolvimento (KATSURAYAMA & BONETI, 2005).

Entretanto, em trabalhos posteriores realizados por DANTAS, *et al.* (2005), quando realizaram inoculações de *C. gloeosporoides* em diferentes populações segregantes, de cruzamentos envolvendo cultivares resistentes e suscetíveis, incluindo ‘Gala’ e ‘Fuji’, inferiram a presença de três genes que segregam de forma independente, sendo um dominante e dois recessivos, que atuam de forma complementar.

Ainda que desvios das proporções esperadas para segregação monogênica tenham sido observados em alguns cruzamentos, sugerindo que outros fatores estejam influenciando na resposta da macieira ao *Colletotrichum*, segundo SILVA (2007), pouco se sabe a esse respeito. Apesar da enorme variabilidade genética existente no gênero *Malus*, o melhoramento tem sido realizado somente com um limitado “pool” gênico. Com o agravante de que isto tem sido feito tendo em foco apenas características de importância comercial, negligenciando os aspectos fitossanitários. Desta maneira, um grande número de cultivares comerciais derivaram de cruzamentos nos quais um dos genitores foi a “Golden Delicious” - suscetível à MFG - e/ou a “Cox’s Orange Pippin” (NOITON & SHELBOURNE, 1992), cujos frutos são muito apreciados pelos consumidores.

Alguns dos genótipos do BGM que se mostraram suscetíveis a MFG, Condessa, Duquesa, Elstar, Gala, Galícia, Hatsuaki, Horei, Jonafree, Jonagold, Kogetsu, Lisgala, Mutsu, Odin, Pink Lady, Rainha, Summerred, Spigold, Yvette, possuem parentesco direto com a Golden Delicious, confirmando este dado.

Nos resultados deste estudo, a maioria dos genótipos existentes no BGM de Caçador é resistente à MFG (Tabela 01), incluindo muitos genótipos descendentes de, pelo menos, um parental suscetível, como a ‘Golden Delicious’. Resultados obtidos com inoculações artificiais realizadas na Epagri (DENARDI, 2007 - informação pessoal), indicaram que as cultivares Anna e Sansa - descendentes em F1 da ‘Golden Delicious’, e as cultivares Imperatriz e Daiane, descendentes em F2 são todas resistentes.

Estudos realizados sobre a genealogia dos genótipos existentes no BGM de Caçador mostram que vários genótipos com parentesco direto com a Golden Delicious apresentaram resistência à MFG (Arlet, Carícia, Ein Shemer, Greensleeves, Hawaii, HoneyGold, Red Gold,

Sweet Corbelly, ShelRed, Summerland, Tsugaru, Yoko). Por outro lado, poucos genótipos descendentes da 'Delicious' – resistente à MFG, apresentaram suscetibilidade no presente estudo (Senshu, Aori).

A MFG é uma doença de grande importância aqui no Brasil e também nos Estados Unidos e as relações entre patógeno e hospedeiro ainda não são conhecidas totalmente. Desta forma a diversidade genética presente nas coleções de germoplasma permite aos melhoristas escolher a melhor estratégia a ser empregada nos programas de melhoramento (LEFORT-BUSON, *et al.*, 1988).

No desdobramento do presente trabalho, estudos complementares estão sendo conduzidos com o auxílio de técnicas de biologia celular e molecular objetivando investigar a possível existência de diferentes fontes de resistência à MFG.

3 CAPÍTULO III- CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA VIA SSR DE GENÓTIPOS DE MACIEIRA DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DA EPAGRI

3.1 RESUMO

O estado de Santa Catarina é o maior produtor nacional de maçã e esta cultura tem grande importância na economia do estado. A área plantada no estado é de 18,4 mil hectares e a produção gira em torno de 27,4 toneladas/ha. O Banco de Germoplasma de Macieira (BAG) da EPAGRI possui 442 genótipos, no entanto, este BAG não está suficientemente caracterizado para que possa ser utilizado de maneira eficiente em programas de melhoramento. A caracterização da diversidade genética dos genótipos via marcadores moleculares, tem sido utilizada como uma importante ferramenta para maximizar os trabalhos de manutenção de bancos de germoplasma. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente o Banco de Germoplasma de macieiras utilizando 12 primers de SSR. A análise de diversidade genética foi realizada através da extração do DNA de 169 genótipos, utilizando-se folhas jovens. O método de extração utilizado foi CTAB e a estimativa da concentração de DNA extraído foi feita em gel de agarose 0,8% com brometo de etídeo (0,3 µg/ml), tendo como padrão DNA Fago Lambda (20, 50, 100 e 200 ng/µl). Foi obtido um total de 197 alelos, sendo que o número médio de alelos por loco SSR foi de 16,4. A expectativa média de heterozigosidade foi de 84%, o polimorfismo revelado pelo número de alelos por loco teve uma percentagem alta de 82%. Pela análise de similaridade genética foram observados dois grupos.

Palavras chaves: Macieira. Germoplasma. DNA. Microsatélites. Diversidade

3.2 ABSTRACT

The Santa Catarina state is the bigger national producer of tree apple, and this culture has a great importance in the state economy. The planted area of the state is 18,4 thousand of hectare, and its production is around 27,4 ton/ha. The active germoplasm bank (BAG) of the

EPAGRI has 442 access, however it is not completely characterized to be used efficiently in genetic breeding program. The genetic diversity characterization of the access by means of molecular marker studies, has been used like an important tool to maximize the maintenance work of the germoplasm banks. In this way, the objective of this study was characterize genetically the active germoplasm bank of the apple tree making use of 12 primers of SSR. The analysis of genetic diversity was realized through the DNA extraction of the 169 access, using young leafs. The extraction protocol used was the CTAB, and the estimation of the DNA concentration was done in agarose gel 0,8% coloured with bromide ethidium (0,3 µg/ml), with DNA Fago Lambda (20, 50, 100 e 200 ng/µl) like pattern. A total of 197 alleles were encountered, and the medium number of alleles by locus of SSR was 16,4. The medium heterozigosity expectation was 84%, and the revealed polimorphism by number of the alleles by locus had a high percentage (82%). The genetic similarity analysis showed two distinct groups.

Keywords: Apple tree. Germoplasma. DNA. Microsatellites. Diversity.

3.3 INTRODUÇÃO

A insuficiente diversidade genética entre os parentais em programas de cruzamentos pode resultar na redução da variabilidade genética das populações, principalmente quando se trata de caracteres quantitativos. Isso pode dificultar ou até impossibilitar a obtenção de ganhos significativos para estes caracteres, além de aumentar a vulnerabilidade genética da espécie a fatores bióticos e abióticos (VIEIRA, 1988). Dessa forma, a análise da diversidade genética tem como principal objetivo propiciar a caracterização do germoplasma para fins de utilização em programas de melhoramento, favorecendo a identificação de parentais promissores para hibridação (CRUZ & CARNEIRO, 2003).

As diferenças entre os genótipos muitas vezes não podem ser identificadas através de análises fenotípicas. A genética molecular, por meio da utilização dos marcadores moleculares, é hoje uma ferramenta fundamental para agilização e aumento da eficiência no processo de seleção, pois antecipa e otimiza os experimentos de campo. A utilização de marcadores na identificação da variabilidade permite a seleção de genótipos superiores com garantia de que os alelos favoráveis selecionados sejam transmitidos pelos genitores.

A caracterização de genótipos por marcadores morfológicos tem sido bastante utilizada, mas efeitos ambientais podem influenciar na expressão dos caracteres, alterando a sua eficácia. Por esta razão, marcadores moleculares podem ser aplicados para auxiliar na caracterização de genótipos mantidos em bancos de germoplasma. Por produzirem informações ao nível de DNA, os marcadores moleculares revelam o polimorfismo de um gene expresso ou de um segmento específico do DNA, eliminando possíveis interferências ambientais (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

Nos últimos anos, análises genéticas de maçã fizeram significativos progressos, em parte devido à disponibilidade crescente de marcadores multialélicos de SSR. Estes marcadores provaram ser uma ferramenta extremamente útil por conter resultados de estudos independentes e no desenvolvimento inovador de procedimentos para avaliar associações de genes marcados. O alto nível de transferebilidade, alto grau de polimorfismo, e a facilidade relativa pela qual eles são gerados, enquanto baseados em PCR, fazem deles os marcadores escolhidos para alinhamentos entre mapas de ligação em maçã (SILFVERBERG-DILWORTH, 2006).

Os marcadores microssatélites, também denominados SSR (*Simple sequence repeats*), apresentam atributos como consistência e ganho de tempo na obtenção de resultados, têm grande potencial para identificar polimorfismos em espécies com estreita base genética, e têm sido bastante utilizados em estudos de variabilidade genética e mapeamento genético em macieira (WANG *et al.*, 1994) na busca de marcas próximas a genes de grande importância agrônômica.

O estudo da diversidade genética dentro dos bancos de germoplasma gera informações que têm como objetivo otimizar a manutenção e o manejo das coleções básicas, facilitando o acesso dos melhoristas à novos conjuntos gênicos. Desta forma o objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade genética entre os 220 genótipos do BAG de macieira da EPAGRI/Caçador.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1 Coleta de amostras

A avaliação da diversidade genética, utilizando marcadores microssatélites (SSR), foi realizada, em 169 genótipos do Banco de Germoplasma de macieira da EPAGRI/Caçador (Anexo 01), sendo genótipos resistentes e suscetíveis a MFG.

A coleta de material foliar foi realizada no mês de janeiro/ 2007 no BGM, onde foram coletadas folhas jovens no início do ciclo vegetativo, imediatamente acondicionadas em caixas de isopor com gelo e levadas ao Laboratório de Análises Genéticas do CAV/UEDESC onde foram armazenadas no ultrafreezer (-80°C) para posterior extração de DNA.

3.4.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico, foram utilizadas folhas jovens, coletadas no início do ciclo vegetativo. O método de extração utilizado foi com CTAB, de acordo com DOYLE & DOYLE (1987). Em cadinhos de porcelana, com aproximadamente 270 mg de tecido, as folhas foram maceradas em nitrogênio líquido o suficiente para virar um pó bem fino. Após este procedimento, 3 mL de um tampão de extração (2% CTAB; 5 M NaCl; 0,5 M EDTA pH 8,0; 1 M Tris-HCl pH 8,0 2% de PVP-40 e 2% β-mercaptoetanol) foi adicionado em cada amostra, a qual foi transferida para 3 tubos de 2mL. Em seguida, o macerado foi mantido em banho-maria a 65°C, por cerca de 30 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se 1 mL da solução de 24 partes de clorofórmio para 1 de álcool isoamil, homogeneizando-se levemente durante 5 minutos e centrifugando-se durante 10 minutos na velocidade de 10.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e misturado com 1 gota de CTAB 10% juntamente com 1 mL da solução de 24 clorofórmio : 1 álcool isoamil, centrifugando novamente durante 10 minutos na velocidade de 10.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e adicionado 3/4 de etanol, mantendo-o no freezer (- 20°C) por cerca de 1 hora, no mínimo. Procedeu-se com a centrifugação a 10.000 rpm descartando o sobrenadante e ressuspensando o pellet. Em seguida foram feitas 2 lavagens com álcool 70% : 1 acetato de sódio 3M, deixando secar em temperatura ambiente por 2 horas. O etanol foi descartado e as amostras foram mantidas invertidas na bancada por 2 horas para secagem do DNA. Foram adicionados 70 μ L de RNase (10 mg.mL⁻¹) em cada amostra e incubado por 30 minutos a 37°C e armazenados a -20°C. A estimativa da concentração do DNA extraído foi realizada em géis de agarose 0,8% contendo 3,0 μ L de brometo de etídeo, utilizando-se como padrão o DNA Fago Lambda, nas concentrações de 20, 50, 100 e 200 ng. μ L⁻¹.

3.4.3 Reações de amplificação, separação dos fragmentos por eletroforese, e detecção das bandas polimórficas

Um total de 40 pares de iniciadores foram testados para amplificação de produtos específicos em reações de PCR, nos 169 genótipos de macieira, sendo que doze primers (Tabela 02) foram usados para discriminar os fragmentos de DNA dos genótipos de macieira por apresentarem melhor polimorfismo. Cada reação foi composta por um kit (*Invitrogen*) 0,85 µl de MgCl₂, 1,7 µl de Tampão 10 X (100 mM Tris; 500 mM KCl, pH 8,3), 0,2µl de Taq (5U/µL). As reações foram realizadas adicionando 3µL de DNA 10ng/µL, 1,75 de primer forward e reverse e 3,54 µL de água ultrapura autoclavada por tubo e submetidas à amplificação em termociclador Hibayd.

O controle negativo constituiu-se de uma reação com adição de 3,0 µL de água ultrapura ao invés de DNA. O programa de amplificação foi de uma desnaturação inicial em 96⁰C por 3 minutos e 30 segundos, seguida por 30 ciclos de 94⁰C por 1 minuto, 50 ou 55⁰C por 1 minuto, 72⁰C por 1 minuto e para finalizar 72⁰C por 7 minutos (HOKANSON *et al.*, 2001).

Os produtos das amplificações foram resolvidos em gel de poliacrilamida a 4% (10 mL de bis-acrilamida 30%, 42 gramas de uréia em 10 mL de TBE 5X, 200 µl de APS 10% e 84 µL de TEMED), para cada 60 mL de solução de gel, em cuba vertical. A solução tampão utilizada nos eletrodos foi TBE 1X. Nas linhas de extremidade de cada gel foi utilizado como marcador uma solução de fragmentos de tamanho conhecido, de 10 pb DNA Ladder (*Invitrogen*). Em cada reação foi adicionado 7,0 µl de tampão de amostra contendo Formamida (98% Formamida, 10 mM de EDTA pH 8,0, azul de bromofenol e xileno cianol) para análise dos fragmentos. A voltagem utilizada para corrida foi de 1495 V e potência constante de 60 W por 1 hora. Após a corrida, o gel foi fixado em álcool etílico 10% e ácido acético 1% e corado com nitrato de prata 0,2%, de acordo com metodologia empregada por CRESTE *et al.* (2001), e deixado secar a temperatura ambiente por 24 horas. A leitura do gel foi realizada em transluminador de luz branca fria.

3.4.4 Análise da diversidade genética entre os genótipos

Através dos fragmentos amplificados foi construída uma matriz de dados binários baseados em cada loco dos 169 genótipos avaliados. A presença de cada banda foi representada pelo número 1 (um) enquanto que a ausência desta foi representada pelo número

0 (zero). A matriz de distância genética foi calculada utilizando o coeficiente de Jaccard, o qual foi analisado pelo método de agrupamento de pares utilizando a média aritmética (UPGMA). Os cálculos das distâncias e a construção do dendrograma foram efetuados com o auxílio do programa NTSYS (State University of New York, EUA).

Tabela 02 - Microssatélites (SSR) e temperatura de anelamento utilizada nas reações de PCR com os genótipos do Banco de Germoplasma da Epagri-Çaçador-SC.

Número do SSR	SSR Nome	Sequência Foward e Reverse	Temperatura de Anelamento
27	CH02c11	tga agg caa tca ctc tgt gc ttc cga gaa tcc tct tcg ac	56°C
48	CH03g07	aat aag cat tca aag caa tcc g ttt ttc caa atc gag ttt cgt t	56° C
14	NZ04h11	ctt cca tcg aga ttg cat cat a cga att gag agg tcg tcg tt	56° C
41	CH02a04	gaa aca ggc gcc att att tg aaa gga gac gtt gca agt gg	56° C
13	NZ02b1	ccg tga tga caa agt gca tga atg agt ttg atg ccc ttg ga	55° C
31	CH03a09	gcc agg tgt gac tcc ttc tc ctg cag ctg ctg aaa ctg g	55° C
34	CH03e03	gca cat tct gcc tta tct tgg aaa acc cac aaa tag cgc c	55° C
42	CH02a08	gag gag ctg aag cag cag ag atg cca aca aaa gca tag cc	56° C
22	CH01d08	ctc cgc cgc tat aac act tc tac tct gga ggg tat gtc aaa g	54° C
30	CH02h11a	cgt ggc atg cct atc att tg ctg ttt gaa ccg ctt cct tc	54° C
33	CH03d07	caa atc aat gca aaa ctg tca ggc ttc tgg cca tga ttt ta	55° C
54	CH05c06	att gga act ctc cgt att gtg c atc aac agt agt ggt agc cgg t	56° C

Fonte: CH Marcadores microssatélites publicados por GIANFRANCESCHI *et al.* (1998).

NZ Microssatélites desenvolvidos e publicados por GUILFORD *et al.* (1997).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os 12 pares de primers geraram múltiplos fragmentos (alelos) quando amplificados em reações de SSR com DNA genômico dos 169 genótipos do BAG de macieira (Anexo 01), a exemplo dos primers NZ02b1 e CH03a09 (Figura 06 e 07).

Uma análise comparativa das frequências alélicas entre os genótipos indicou uma média de 16 alelos por genótipo, sendo que o maior número de alelos foi observado nos genótipos Willie Sharp com 22 alelos, Wilmuta com 21 alelos, seguido do genótipo Fiesta com 20 alelos. Para cada iniciador, ou seja, loco de microssatélite, os mais polimórficos foram observados no iniciador NZ02b1, com 37 alelos amplificados, seguido do iniciador CH03g07 com 25 alelos amplificados (Tabela 03). O número de pares de base amplificado variou de 85 a 330pb entre todos os locos analisados (Tabela 03).

Foi obtido um total de 197 alelos, sendo que o número médio de alelos por loco SSR foi de 16,4. O valor encontrado por GUILFORD *et al.* (1997) foi de 4,5 alelos/loco em 21 cultivares de *M. x domestica*. Entretanto, este valor é menor àquele encontrado por GIANFRANCESCHINI *et al.* (1998) de 8,2 alelos/locos em 19 cultivares. Estes valores são muito inferiores ao encontrado por HOKANSON *et al.*, (2001) de 12,1 alelos/loco em 142 genótipos de 23 espécies de *Malus*, e por ORAGUZIE *et al.* (2005) de 9,7 alelos/loco em 16 cultivares de porta-enxertos de diferentes origens e espécies. Vários fatores contribuem para esta discrepância, incluindo tamanho da amostra, diversidade dentro da amostra e método ou técnica de detecção e estimação de fragmentos.

Tabela 03 - Tamanho, número de alelos e frequência observada (Ho) e esperada (He) de heterozigotos de cada loco de microssatélite.

Primer	Varição dos alelos (pb)	Número de alelos	Frequência observada de heterozigotos (Ho)	Frequência esperada de heterozigotos (He)
CH03d07	115-210	25	0,39	0,93
CH02c11	195-240	11	0,54	0,87
NZ04h11	200-250	12	0,50	0,81
NZ02b11	135-330	37	0,69	0,95
CH0309	134-158	10	0,66	0,80
CH03e03	180-230	17	0,30	0,86
CH02a08	135-170	9	0,27	0,80
CH02h11a	120-144	13	0,47	0,82
CH03g07	190-240	18	0,59	0,87
CH05c06	105-145	15	0,77	0,72
CH02a04	85-130	18	0,50	0,86
CH01d08	220-295	12	0,48	0,80
TOTAL		197	0,51	0,84

Marcadores SSR são relativamente simples para uso rotineiro em laboratório, e seu padrão de bandas é de fácil interpretação (LIEBHARD *et al.*, 2002). Entretanto, existem artefatos, tais como a presença de rastros chamados bandas ‘stutter’, as quais aparecem principalmente em marcadores contendo di-nucleotídeos repetidos. Outro artefato, chamado de ‘slippage’ da polimerase, caracteriza-se por um “escorregão” durante a amplificação, o qual é responsável pela amplificação de fragmentos com comprimento menor pela redução nas unidades repetitivas (SMEETS *et al.*,1989).

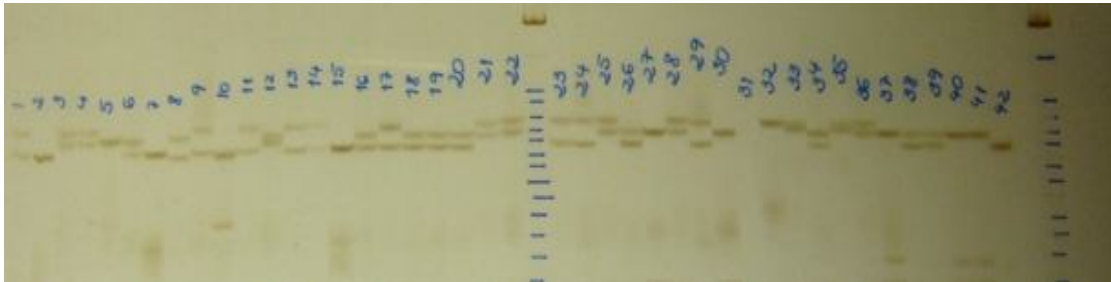


Figura 06 - Perfil de bandas amplificadas do iniciador NZ02b1 em 42 genótipos de macieira do Banco de Germoplasma da EPAGRI-Caçador, S/C. M(Ladder) = 10 pb.

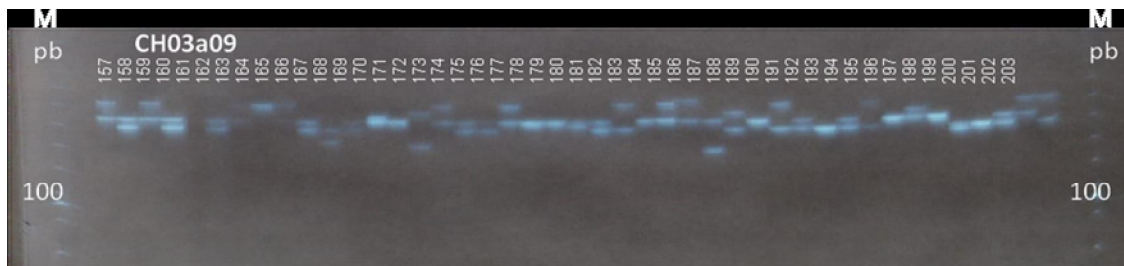


Figura 07 - Perfil de bandas amplificadas do iniciador CH03a09 em 46 genótipos de macieira do Banco de Germoplasma da EPAGRI-Caçador S/C. M(Ladder)= 10 pb.

Com 12 pares de primers foi possível verificar a diferença entre os 169 genótipos estudados, sendo que GUILFORD *et al.* (1997) discriminaram 21 cv de maçã com apenas 3 pares de primers; HOKANSON *et al* (2001) utilizou 8 pares de primers para caracterizar 142 genótipos de maçã; SÁNCHEZ-SCRIBANO *et al.*(1999) discriminaram 43 cv de uva-de-mesa empregando 8 pares de primers; GRAPIN *et al.* (1998) conseguiram caracterizar 59 genótipos de *Musa acuminata* utilizando 9 microssatélites, e SOUZA (2002) caracterizou 35 genótipos de bananeira com 11 microssatélites. BRINI, (2007) utilizou 7 microssatélites de macieira em pereira e obteve um total de 36 fragmentos em 25 genótipos.

O polimorfismo revelado pelo número de alelos por loco teve uma percentagem alta de 82%. O polimorfismo abundante já era esperado em razão do alto índice de heterozigosidade provocado pelo mecanismo de incompatibilidade existente na espécie. Anteriormente, este tipo de resultado também foi encontrado em outros trabalhos com macieira, tais como GUILFORD *et al.* (1997). A riqueza gênica do BGM foi confirmada por esta alta percentagem. A expectativa média de heterozigosidade foi de 84%, sendo que a observada foi de 51%. WEIR, (1996) concorda que a heterozigosidade é uma medida adequada para quantificar a variação, porém também considera a frequência de heterozigotos como um importante indicador de diversidade genética, uma vez que cada heterozigoto carrega alelos diferentes.

A partir do dendograma (Figura 08), pode-se verificar que os genótipos foram divididos em dois grupos, com coeficiente de similaridade variando de 0,74 a 0,94. O primeiro grupo contém os genótipos: Waine, PX216, PX565, Alkemene, PX322, Planaltina, Harrold Red, D1R103T245, Rome Beauty, D1R99T15, Melrose, *M. aldenhamensis*, *M. elley*, Discovery, Pome 19, Reinete Du Mans, Senshu, Reinete Canada Greensleeves, D2R38T126, Hokuto, NJ49, Condessa, NJ96, NJ41, Wilmuta, Centenária, Wealthy, D2R41T243, Marquesa, Gala, Pome 13, Eva, Toukou, NJR75, Yoko, Nero 26, Bonita, Rene Reinetes, Willie Sharp.

No grupo II ficou concentrada a maior parte dos genótipos do BGM. Os genótipos Rainha e Daiane (cultivar nova) ficaram separados do restante, uma pressuposição para este indicativo seria pela Daiane ser germoplasma elite, isto é, já ter sido resultado de cruzamentos no melhoramento da EPAGRI/Çaçador e ambos estes genótipos possuírem parentesco direto com a Golden Delicious. Dentro de cada grupo houve divisões revelando a proximidade entre os genótipos, onde pudemos observar, por exemplo, o parentesco entre a Gala com a Eva (Fig. 08).

Entre os genótipos analisados, Dulcina e Holy apresentaram 94% de similaridade, da mesma forma para os genótipos Nero Red Rome e Grangille Red. Isto indica que esses genótipos são bastante próximos quando analisados com os marcadores de microssatélites utilizados neste trabalho. A alta similaridade genética é esperada entre indivíduos de um mesmo subgrupo, pois partilham uma origem comum, sendo que grande parte dos genótipos estudados tem parentais comuns com a Golden Delicious e Delicious. Embora as diferenças observadas entre os genótipos não tenham sido de grande magnitude, podemos afirmar que a grande maioria dos genótipos analisados apresentaram diferenças significativas, e esta característica é fundamental em um Banco de Germoplasma.

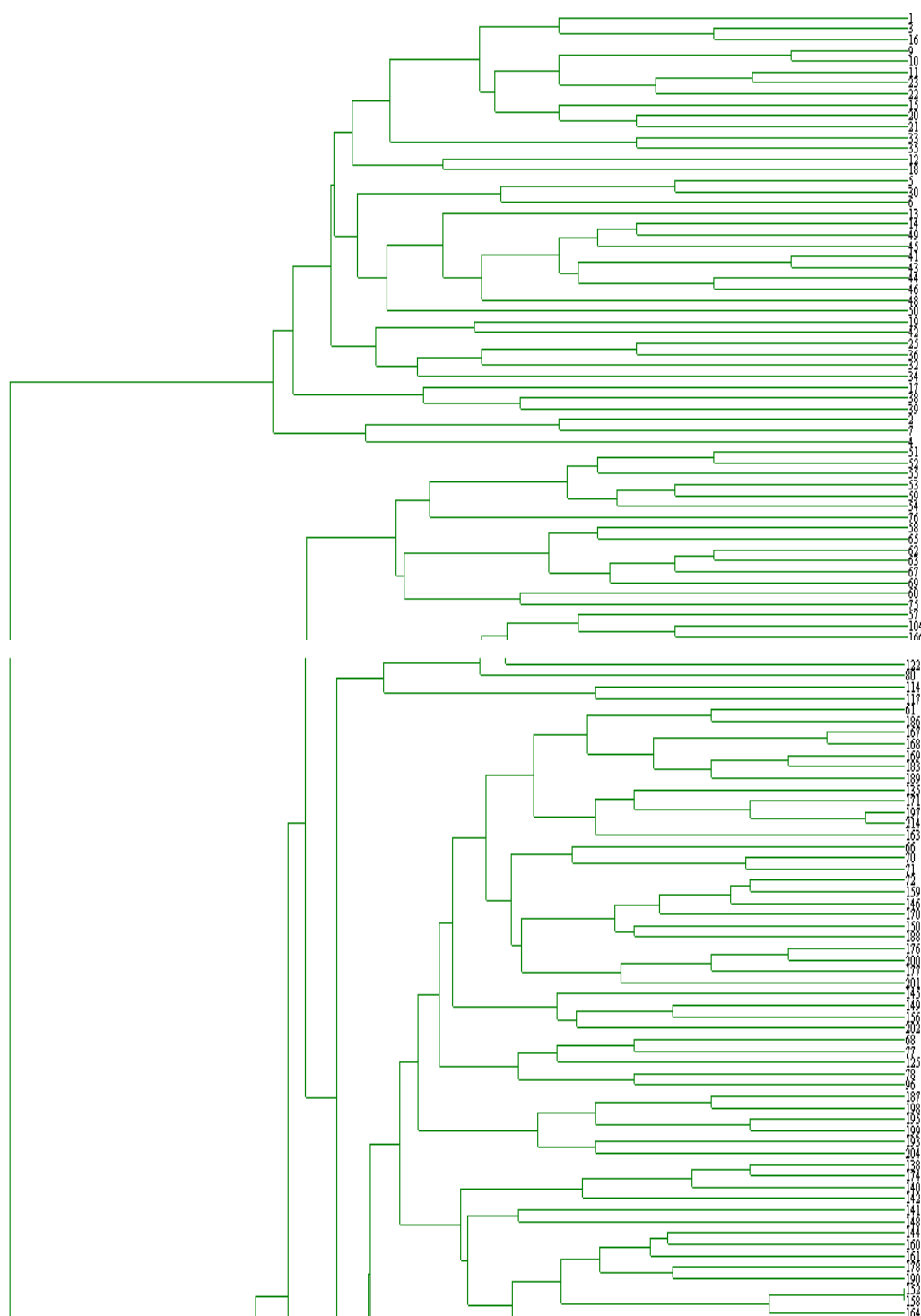


Figura 08 - Dendrograma baseado em análise de UPGMA de 169 genótipos de macieira do Banco de Germoplasma da EPAGRI/caçador, usando 12 marcadores microssatélites.(continua)

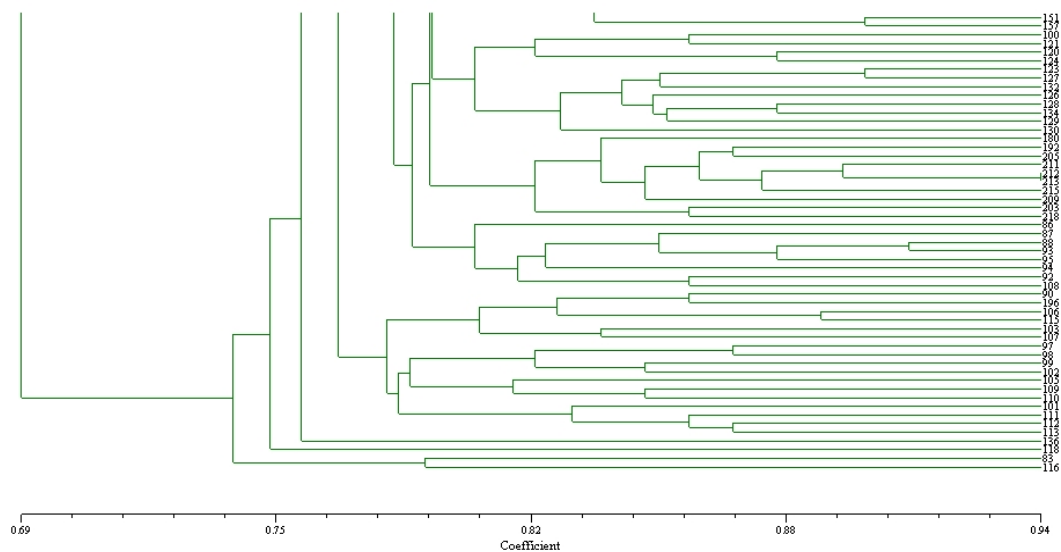


Figura 08 - Dendrograma baseado em análise de UPGMA de 169 genótipos de macieira do Banco de Germoplasma da EPAGRI/caçador, usando 12 marcadores microsatélites. (conclusão)

3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os marcadores microsatélites apresentaram-se como uma ferramenta útil no estudo da diversidade genética e na resolução das relações de parentesco entre os genótipos.

Com 12 pares de primers de SSR, foi possível a análise da diversidade genética dos genótipos do BGM.

Os resultados obtidos demonstraram a existência de alta variabilidade genética no banco de germoplasma de macieiras, ressaltado pelo elevado número de alelos por loco e alto nível de heterozigosidade.

Esse conhecimento contribuirá com a melhora na eficiência da identificação de combinações que servirão de base para o melhoramento genético da macieira.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPM - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MAÇÃ. Site:
<http://www.abpm.org.br/> - Acesso em maio de 2004 e julho de 2008.

ABPM. Associação Brasileira dos Produtores Maçã. Disponível em < <http://www.abpm.org.br> >. Acesso em: 22/03/2007.

ALDWINCKLE, H. NORELLI, J. **Improvement of Apple Varieties and Rootstocks by Biotechnology.** Presented at the 43rd Annual IDFTA Conference, February 6-9, 2000, Napier, New Zealand.

ALVES, R. M. Caracterização Genética de Populações de Cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd.ex. Spreng.) Schum., Por marcadores Microsatélites e Descritores Botânico-Agronômicos. Piracicaba, 2002, 159p. Tese (doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo.

BLEICHER, J. A cultura da macieira. In: EPAGRI. A cultura da macieira. Florianópolis, SC, 2002. p. 29-36.

BLEICHER, J. História da Macieira. p. 29-36. In. EPAGRI. A cultura da macieira. Florianópolis-SC, 743p., 2006.

BONETI, J.I. *et al.* Epagri-402 – Catarina – nova cultivar de macieira resistente à sarna. Agropecuária Catarinense, v.9, p. 51-54, 1996.

BONETI, J.I. S. A cultura da macieira. p.43. In: EPAGRI. A Cultura da Macieira. Florianópolis, SC, 2006. 743 p.

BONETTI, J.I.S.; OZAWA, T. Efeito da temperatura e do período de molhamento foliar na severidade da mancha foliar de *Glomerella* nas macieiras da cv. Gala, em condições controladas. Fitopatologia **Brasileira**, v. 24, n. suplemento, p. 295–296, 1999.

BORÉM, A. Melhoramento visando resistência a doenças. In: BORÉM, A. Melhoramento de plantas. Viçosa: Editora UFV, 1997. 461-484.

BRINI, W., MARS, M., HORMAZA, J.L. 2008. Genetic diversity in local Tunisian pears (*Pyrus communis* L.) studied with SSR markers. **Scientia Horticulturae** 115, 337–341, 2008.

BRONDANI, C; BRONDANI, R.P.V; RANGEL, P.H.N.. Utilização de Marcadores Moleculares em Programas de Ampliação da Base Genética de Espécies Cultivadas Embrapa, documento, dez 2003.

BROOKS, R. M. & OLMO, H.P. **Register of Fruit e Nut Varieties**: 2 Ed. University of California Press. 1972.

BROOKS, R. M. & OLMO, H.P. **Register of Fruit e Nut Varieties**: 3 Ed. 1997 ASHS Press USA

BULTITUDE, J.. **Apples. A Guide to the Identification of International Varieties**. Macmillan reference Books, 1984.

CARVALHO, F.M.S. Caracterização cultural, morfológica e genética de espécies de *Colletotrichum* associadas a doenças em macieira. Tese de mestrado. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 1997.

CEREZINE, P.C.; LEITE, R.P.; TSUNETTA, M. Efeito do tratamento químico no controle da mancha foliar de *Glomerella* em macieira no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira** 17(3): 258-267, 1992.

CHALLICE, J.S. Chemotaxonomic studies in the family Rosaceae and the evolutionary origins of the subfamily Maloideae. *Preslia*, v.53, n.3, p. 289-304, 1981.

CHENG, F. S.; WEEDEN, N. F.; BROWN, S. K.; ALDWINKLE, H. S.; GARDINER, S. E.; BUS, V. G. Development of DNA marker for Vm, a gene conferring resistance to apple scab. **Genome**, v. 41, n. 2, p. 208-214, 1998.

CHEVREAU, E., LESPINASSE, Y., GALLET, M. Inheritance of pollen enzymes and polyploid origin of apple (*Malus x domestica* Borkh). **Theoretical and Applied Genetics**, v.71, p.268-277, 1985.

CONNER, P. J.; BROWN, S. K.; WEEDEN, N. F. Molecular-marker analysis of quantitative traits for growth and development in juvenile apple trees. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.1027-1035, 1998.

CO-OP 19,20,21 and 22: **Four Scab-Resistant Apple Selections. Released for Advanced Testing.** Bulletin 755.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.1-8, 2001.

CROWE, A.D. **Apple Scion Varieties and Strains Atlantic Horticulture Committee as part of the Tree Fruit Production Guide for the Atlantic Provinces** Kentville, Nova Scotia, 01/1976

CRUSIUS, L. U., *et al.* Epidemiology of apple leaf spot. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.1, p. 65-70, 2002.

CRUSIUS, L.U. Epidemiologia da Mancha Foliar da Macieira. Tese de Mestrado. Passo Fundo, UPF, 2000.

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

DANTAS, A.C.M., *et al.* Classificação e estudo da herança de resistência *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causador da Mancha Foliar em macieira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., Águas de Lindóia, 2005. **Anais...** Águas de Lindóia, 2005.

DANTAS, A.C.M., *et al.* Classification and inheritance of Resistance to Glomerela Leaf Spot (*Colletotrichum gloeosporioides*) in Apple, 2006 (*submitted*).

DANTAS, A.C.M., *et al.* Herança da resistência da Mancha Foliar (*Colletotrichum Gloeosporioides* Penz.) em macieira. In: CONGRESSO BRASILEIRO MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., Porto Seguro, BA, 2003. **Anais...** Porto Seguro, BA, 2003.

DAYTON, D.F., *et al.* 'Jonafree' Apple. **HortScience** 14(4): 551-552, 1979.

DAYTON,D.F., *et al.* **'Priscilla', a Fall Red Apple with Resistance to Apple Scab** Reprinted From Fruit Varieties vol. 26, n2, Pg 34 e 35 April, 1972.

DAYTON,D.F., *et al.* **CO-OP 12-18: Seven Scab-Resistant Apple Selections Released for Advance Testing** Jan,1972.

DECOURTYE L.M., *et al.* Priam Apples. **HortScience**, vol 9 (4) August 1974.

DENARDI, F.; CAMILO, A.P. ' Epagri 404- Imperatriz ' – nova cultivar de macieira para dupla finalidade – produtora e polinizadora. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.22, n.1, p. 40-43, 2000.

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

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

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. EPAGRI 408-Condessa: nova cultivar de macieira de baixa exigência em frio hibernal. **Agropecuária Catarinense**, v. 11, n.2, p. 12-15. 1998c.

DENARDI, F.; CAMILO, A.P. Fred Hough – nova cultivar de macieira imune à sarna. **Revista Brasileira de Fruticultura**. V.16, p. 1-6, 1994.

DENARDI, F.; FAORO, L.D.; CAMILO, A.D. Banco de Germoplasma de pomáceas. **Recursos Genéticos de Espécies Frutíferas do Brasil**, Embrapa, 1999.

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

DENARDI, F.; HOUGH, L.F.; CAMILO, A.P. Primícia e Princesa – cultivares de macieira obtidas pelo melhoramento genético em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.8, n.2, p. 75-80, 1986.

DOYLE, J.J; DOYLE, J.L Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1987.

DUREL, C. E.,LAURENS, F.;FOUILLET, A.; LESPINASSE, Y. Utilization of pedigree information to estimate genetic parameters from large unbalanced data sets in apple. **Theor Appl Genet** (1998) 96: 1077-1085

FERREIRA ME; GRATTAPAGLIA D. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPACENARGEN. 220p.

FERRER, M. E., CLAUSEN, A.M. Variabilidad genética en los recursos vegetales de importancia para la agricultura del Cono Sur. In: ESTRATEGIA EN RECURSOS FITOGENÉTICOS PARA LOS PAÍSES DEL CONO SUR, PROCISUR, Montevideo, Uruguay, 2001. 144p.

FIGUEIRA, A .V.O; CASCARDO, J.C.M.Marcadores moleculares no melhoramento. In: Dias, L.A.S. (Ed). Melhoramento Genético do Cacueiro. Viçosa: FUNAPE, UFG, 2001. P. 385- 438.

FISCHER, C. Apple breeding in the Federal Centre for Plant Breeding Research, Institute for Fruit Breeding at Dresden-Pillnitz.Germany. *Acta Hortic.* 538, 225—227, 2000.

GIANFRANCESCHINI, L., *et al.* Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.1069-1076, 1998.

GRAPIN, A., *et al.* Diploid *Musa acuminata* genetic diversity assayed with sequence-tagged microsatellite sites. **Electrophoresis**, v. 19, p. 1374-1380, 1998.

GUILFORD, P. *et. al.* Microsatellites in *Malus x domestica* (apple) abundance, polymorphism and cultivar identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.249-254, 1997.

HAMADA, N. A. Caracterização morfológica, patogênica e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. em macieira. Dissertação apresentada ao curso de pós graduação em Recursos Genéticos Vegetais, para obtenção do título de mestre. 2005, 118p.

HAMADA, N.A. Influência da temperatura e do período de molhamento foliar (PMF) na incidência e severidade da Mancha Foliar da Gala (*Colletotrichum* spp.). **Agropecuária Catarinense** 18(2): 73-77. 2005.

HARRIS, S. A.; ROBINSON, J. P.; JUNIPER, B. E., Genetic clues to the origin of the apple. **Trends of genetics**, v. 18, n. 8, p. 426-430, 2002.

HAUAGGE, R., BRUCKNER, C.H. Macieira. In: BRUCKNER, C.H. (ed). Melhoramento de fruteiras de clima temperado. Viçosa: UFV, cap.2, p. 27-88, 2002

HAUAGGE, R.; BRUCKNER, C. H. Macieira. cap. 2, p.28-88. In. BRUCKNER, C. H. **Melhoramento de Fruteiras de Clima Temperado**. Editora UFV, Viçosa, 2002

HAUAGGE, R., TSUNETTA, M. 'IAPAR 75-Eva', 'IAPAR 76-Anabela' e IAPAR 77- Carícia' - Novas cultivares de macieira com baixa exigência em frio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 15, 1998, Poços de Caldas, Resumos... Lavras: UFLA, 1998, p.472.

HAYASHI, T. OMURA, M. & SCOTT, N.S. **Techniques on Gene Diagnosis and Breeding in Fruit Trees**, Tsukuba, Japan. Novembro 24-27, 1992.

HOKANSON, S. C.; McFERSON, J.R.; FORSLINE, L.; et al., Collecting and managing wild *Malus* germplasm in its center of diversity. **HortScience**, v.32, n.2, 1997.

HOKANSON, S.C., *et al.* Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids. **Euphytica**, v. 118, p.281-294, 2001.

HUARACHA, E.; XU, M.; KORBAN, S. S. Narrowing down the region of the Vf locus for scab resistance in apple using AFLP-derived SCARs. **Theoretical and Applied Genetics**, v.108, p.274-279, 2004.

IPBGR. Apple Descriptors. In: WATKINGS, R.; SMITH, R.A. (eds.) Commission of the European Communities: EEEEC, ECSC, EAEC, Brussels and Luxembourg, IPBGR, Rome, 1982.

JANICK, J., *et al.* Apples. In: JANICK, J., Juniper B, Mabberley D (2006) *The Story Of The Apple*. Portland: Timber Press. 236 p.39.

JANICK, J., *et al.* William's Pride' Apple. **Hortscience** 23 (5): 928-930. 1988.

JANICK, J., GOFFREDA, J.C. & KORBAN S. S., 2004a: _Co-op 29_ (PixieCrunch™) apple. **HortScience** 39, 450—451.

JANICK, J., GOFFREDA, J.C. & KORBAN S. S., 2004b: _Co-op 33_ (Sundance™) apple. **HortScience** 39, 452—453

JANICK, J., *et al.* Apples. In: JANICK, J., MOORE, J.N. (ED.) Fruit breeding: tree and tropical fruits. New York: John Wiley & Sons, 1996. v. 1, p, 1-78.

JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEGER & PLUMBIEY, R.A. The biology and control of *Colletotrichum* sp. on tropical fruit crops. **Plant Pathology**, 39: 343-366, 1990.

JUNIPER, B.E., WALKINS. R., HARRIS, S. A. The origin of the apple. **Acta Horticulturae**, v. 484, 1998.

KATSURAYAMA, Y. *et al.* Mancha Foliar da Gala: principal doença de verão da cultura da macieira. **EPAGRI Agropecuária Catarinense** vol. 13, n 3 nov. 2000.

KATSURAYAMA, Y., *et al.* Epidemiologia das Doenças da Macieira no Subtrópico e Perspectivas no Manejo Integrado: Caso da Mancha da Gala (*Colletotrichum* spp.)

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I. da S. Efeito da temperatura na germinação de conídios de *Colletotrichum* spp in Relatório Técnico ABPM – Projetos de Pesquisas 2001-2002. Fraiburgo: ABPM, 2002.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I.S.; BECKER, W. F. Prevenção e controle da Mancha da Gala. In: SEMINÁRIO SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 5., 2004. São Joaquim, SC. **Anais...Epagri**, Florianópolis, SC. 2004, 74p.

KATSURAYAMA, Y.; TSUCHIYA, S.; BONETI, J.I.S. Herança da resistência da macieiras à mancha da Gala (*Colletotrichum goeosporioides*). **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.409, 2001.

KATSURAYAMA, Y; BONETI, J. I. da S. Epidemiologia da Mancha Foliar da Gala In: REUNIÃO ANUAL DE FITOSSANIDADE NA CULTURA DA MACIEIRA, 4, 1999, São Joaquim, SC. Relatório... Epagri- Estação Experimental de São Joaquim, São Joaquim, SC. 1999. 40 pg.

KHANIZADEH, S., *et al.*. 2003: _Galarina_ apple. **HortScience** 38, 477—478.

KING, G. J., *et al.* Multiple field and glasshouse assessment increase the reliability of linkage mapping of the Vf source of scab resistance in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.699-708, 1998.

KORBAN, S. S., GOFFREDA, C., and JANICK, J, 2003: _Co-op 43_ (Juliet™) apple. **HortScience** 38, 144—145

KORBAN, S.S. Interspecific hybridization in *Malus*. *HortScience*, v.21, p.41-48, 1986.

KOZAKI, I. TSUCHIYAS., UENO, I. KAJIURA, I. **The Fruits in Japan**. Yokendo, Tokio, 1996.

LAMB, R.C. Future germplasm resources of pome fruits. **Fruit Varieties Journal**, v.28, p.75-79, 1974.

LAURENS, F. Review on the current apple breeding programmes in the world: breeding objectives for scion-cultivar improvement. In: Proc EUCARPIA Fruit Breed Genet Symp, Oxford, England, **Acta Hort.** (1998).

LAURENS, H., Y. LESPINASSE, & FOUILLET, A.: A new scab resistant apple: _Ariane_. **HortScience** 40, 484—485. 2005.

LEFORT-BUSON, M.; HEBERT, Y.; DAMERVAL, K. Les outils d'évaluation de la diversité génétique at phenotypique. **Agronomie**, 8:173-178, 1988.

LEITE Jr., R.P.; TSUNETTA, M.; KISHINO, A.Y. Ocorrência de mancha foliar de *Glomerella* em macieira no Estado do Paraná. Londrina, IAPAR, 1988, 6p. (IAPAR, Informe de Pesquisa, 81).

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

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum* in Revisão Anual de Patologia de Plantas, volume 9: 291-339, 2001. Passo Fundo.

MARTINELLO, G.E., *et al.* Divergência genética em genótipos de quiabeiro com base em marcadores morfológicos. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 1, p. 52–58, março 2001.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia brasileira**, 27 (suplemento): S23, 2002.

MILACH, S.C.K. Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141p.

MOORE, J.N. (ED.) Fruit breeding: tree and tropical fruits. New York: John Wiley & Sons, 1996. v. 1, p, 1-78.

NORTON, R.A., STEBBINS, R.L. & YOSHIDA, Y. Current Status of Several Japanese Apple Cultivars. **Fruit Varieties Journal**, 41 (1): 22-9, 1987.

OLIVEIRA, E.J., *et al.* Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, 2006.

ORAGUZIE, N.C., *et al.* DNA fingerprinting of apple (*Malus* sp.) rootstocks using Simple Sequence repeats. **Plant Breeding**, v.124, p.197-202, 2005.

PATOCCHI, A.; GIANFRANCESCHI, L.; GESSLER, C. Towards the map-based cloning of Vf: fine and physical mapping of the Vf Region. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.1012-1017, 1999.

PEREIRA, A. V. Utilização de análise multivariada na caracterização de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Piracicaba, 1989, 180p. Tese (doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo.

PETRI, J.L. Desafios da pesquisa na produção integrada de maçã.. In. SANHUEZA, R. M. V. *et al.* Reunião sobre o sistema de produção integrada de macieira no Brasil, 1. Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho. p.1-2, 1998. 48p

PETRI, J.L. Fatores edafoclimáticos. In: A Cultura da Macieira. Florianópolis, 2002. 743p.

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

PLANK, V. J.E. **Disease Resistance in Plants**. Academic Press, New York San Francisco, London, 1968.

PONOMARENKO, V.V. Review of the species in the genes *Malus* Mill. Bulletin of Applied Botany, **Genetics and Breeding**, v.106, p.3-27, 1986.

RIBEIRO, D.C. Relação Filogenética, por ITS-rDNA, de *Colletotrichum* spp, agente causal da mancha foliar da gala em macieira. Dissertação. Universidade do Estado de Santa Catarina- UDESC, fevereiro de 2007.

RIGINATO, O., OJIMA, M., DALL'ARTO, F.A.C. Novos cultivares de maçã para o clima paulista. Campinas: Instituto Agronômico, 1975. 11p. (Boletim técnico, 31).

SAGHAI-MAROOF, M.A., *et al.* Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in Barley: species diversity, chromosomal locations and population dynamics. Proc. National Academic Science, USA, v.91, p. 5466-5470, 1994.

SANCHEZ- ESCRIBANO, E.M., *et al.* Use of sequence- tagged microsatellite site markers for characterizing table grape cultivars. **Genome**, v.42, p. 87-93, 1999.

SANHUEZA, R.M.V. Características e controle de *Glomerella cingulata* (*C.gloeosporioides*), agente causal da mancha das folhas e frutos da macieira - II. Bento Gonçalves. Embrapa. Circular Técnica 54. 1999.

SARTORATO, A. Novas Fontes de Resistência do Feijoeiro Comum à Mancha Angular. **Fitopatologia Brasileira**. 31(2), mar - abr 2006.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **ChromosomDa**, Berlin, v. 109, p. 365- 371, 2000.

SHELBOURNE, C.J.A., *et al.* Development plan for breeding Radiata pipe. p.142. Forest Research Institute Report, Rotorua, 1986.

SILFVERBERG-DILWORTH, E., *et al.* Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. **Tree Genetics & Genomes**, v. 2 p. 202–224, (2006).

SILVA, M. F. da. Desenvolvimento de um mapa genético de ligação de macieira saturado para a região com resistência à Mancha Foliar de *Glomerella* (*Colletotrichum gloeosporioides*). Tese. Universidade Federal de Santa Catarina, novembro de 2007.

SMEETS H.J.M., *et al.* 1989. Use of variable simple sequence motifs as genetic markers: application to study of myotonic dystrophy. **Hum. Genet.** 83: 245–25.

SOUZA, S.A.S.de. Avaliação da Variabilidade Genética em *Musa* spp. Utilizando Marcadores Microssatélites. Tese. Piracicaba, 2002, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo.

STRAND, M., *et al.* Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, London, v. 365, p. 274-276, 1993.

VIEIRA, C. Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa: Imprensa Universitária, 1988, 231p.

WANG, Z., *et al.* Survey of plant short tandem repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v.88, p.1-6, 1994.

WATKINS, R. Apple and Pear (*Malus* and *Pyrus* sp. – Rosaceae) In: SMARTT, J.; SIMMONDS, N.W. (eds.) *Evolution of Crops Plants*, Longman Scientific & Technical, Burnt Mill, p. 418-422, 1995.

WAY, R.D. , *et al.* Apples (*Malus*) In: MOORE, N.; BALLING, J.R. (eds) *Genetic resources of temperate fruit and nuts crops*. **Acta Horticulturae**, n.290, ISHS, Wageningen, 1990.

WEIR, B.S. *Genetic data analysis methods for discretetion genetic data*. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 377p.

WILLIAMS, E.B., *et al.* Redfree' Apple. **HortScience** 16(6): 798-799, 1981.

WILLIAMS, E.B.; JANICK, J & F.H. EMERSON E.B. **Six Scab-resistant Apple Selections Released for Grower Testing** Department of Botany and Plant Patology, and Horticulture, Purdue University.

XU, M. L.; KORBAN, S. S. AFLP-derived SCARs facilitate construction of a 1.1 Mb sequence-ready map of a region that spans the Vf locus in the apple genome. **Plant Molecular Biology**, v.50, p. 803-818, 2002.

XU, M. L.; KORBAN, S. S. Saturation mapping of the apple scab resistance gene *Vf* using AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.844-851, 2000.

YANG, H. Y., *et al.* The use of modified bulk segregant analysis to identify a molecular marker linked to a scab resistance gene in apple. **Euphytica**, v. 94, p. 175-182, 1997.

ANEXOS

ANEXO 01 - Genótipos do Banco de Germoplasma

ANEXO 02 – Genealogia do Banco de Germoplasma de Macieiras da EPAGRI-Caçador/SC

ANEXO 03- Soluções

ANEXO 04- Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

ANEXO 05- Géis

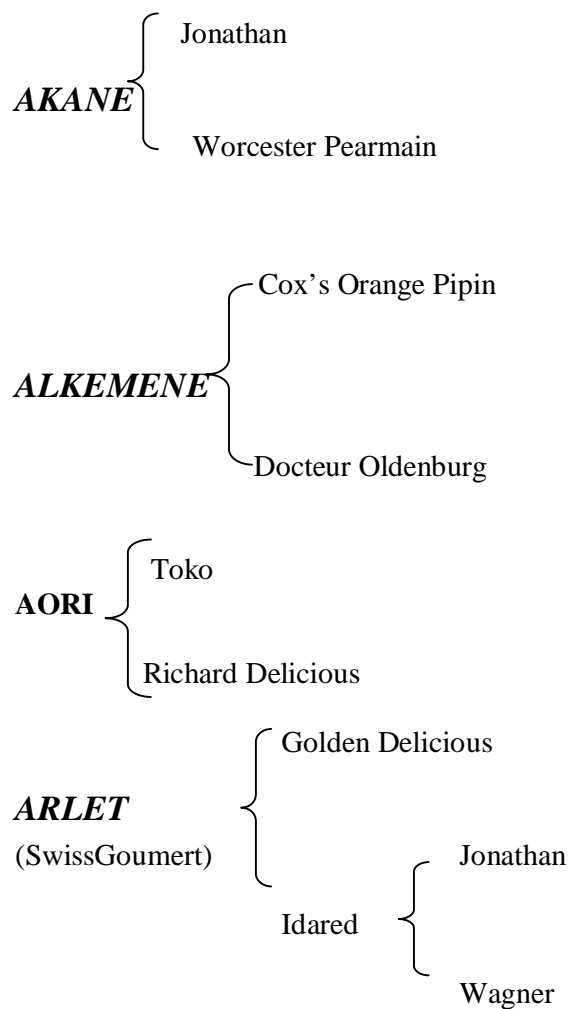
ANEXO 01

Genótipos do Banco de Germoplasma							
1	Waine	37	Hatsuaki	73	21.379.64	109	Jonathan
2	Bonita	38	Yoko	74	21.555.13	110	Pome 23
3	PX216	39	Nero 26	75	W. Banana	111	Splendor
4	Willie Sharp	40	PX 1032	76	M. Atrosanguinea	112	Summered
5	Reinete Du Mans	41	Condessa	77	Nova Easygro	113	Ivete
6	Reinete Canada	42	Marquesa	78	PX 1033	114	Israel 8-3
7	René Reinetes	43	NJ 96	79	SM 78-2	115	Lisgala
8	Quinte	44	NJ 41	80	July Red	116	Daiane
9	Alkemene	45	NJ 49	81	M. Robusta	117	Honey Gold
10	PX322	46	Wilmuta	82	M. Baccata	118	SM 82-1
11	Planaltina	47	Jonagold	83	Rainha	119	Stark J. Grimes
12	Discovery	48	Centenária	84	Mizuso Tsugaru	120	NJ 55
13	Greensleeves	49	Hokuto	85	D1R100T209	121	Delicia
14	D2R38T126	50	Wealthy	86	M 6039	122	Pome 12
15	Rome Beauty	51	D2R39T243	87	Granny Smith	123	Pome 17
16	PX 565	52	Sungold	88	Pome 18	124	Winter Gold
17	NJR 75	53	D2R40T253	89	Ruby Spur	125	Delcon
18	Pome 19	54	Stayman	90	21502-1	126	Carícia
19	D2R40T253	55	Belfigriole	91	Aori 2	127	Pome 10
20	D1R99T15	56	Imperatore	92	21373-58	128	2136175
21	Melrose	57	Dorsett Golden	93	Akane	129	Empire
22	D1R103T245	58	Red Free	94	Hame 6	130	Nebuta
23	Harrold Red	59	D1R68T571	95	Belle de Boscoop	131	NJ 36
24	Coop 16	60	PX663	96	Gold Jon	132	Spartan
25	Gala	61	Pome 14	97	Coop 24	133	Ohrin
26	Golden Delicious	62	Suntan	98	Elstar	134	D2R31T237
27	D1R102T116	63	2130021	99	Newton Pippin	135	Monroe
28	Jona Free	64	Liberty	100	Groth Red	136	Erwin
29	Princesa	65	Jonared	101	Ein Shemer	137	Ein Shemer
30	Senshu	66	Fuji S.	102	D1R101T110	138	Sweet Cornely
31	Kogetsu	67	NJ 50	103	Pome 22	139	Ziger
32	Eva	68	PX 647	104	NJ 52	140	Akagui
33	M. Aldenhamensis	69	Imperatriz	105	Fiesta	141	D1R98T188
34	Toukou	70	Gorden	106	Tsugaru	142	Ozark Gold
35	M. Elley	71	Nova Mac	107	Mutsu	143	D1R98T486
36	Pome 13	72	Shell Red	108	Horey	144	Holland

Genótipos do Banco de Germoplasma					
145	Catarina	181	Pilat	217	NJ 44
146	Conrrade Red	182	Pome 3	218	Kent
147	Red Gold	183	Nitany	219	Ultra Red
148	NJ 59	184	Romy 50	220	Jona Mac
149	Supper Kidd's	185	Webster	221	Vered
150	NJ 45	186	Carla	222	PX- 216
151	Priam	187	Pome 25	223	Duquesa
152	Dulcina	188	Pome 28	224	G. Weinsberg
153	Gloster 69	189	Maayan	225	Kagayaki
154	Holliday	190	Paulared	226	Misouri 2071
155	Annurca	191	Natsumidori	227	NJ- 45
156	Bem Davis	192	Summerland	228	NJ- 76
157	D1R102T98	193	Arlet	229	NY- 44-408-11
158	Holly	194	Black Jon	230	NY- 454
159	Galícia	195	Tropical Beauty	231	Odama Oley
160	Sansa	196	Bonita	232	Odin
161	D1R73T94	197	Priscilla	233	Pink Lady
162	D2R30T30	198	Pome 16	234	Spy Gold
163	Milton	199	Red June	235	21.636.5
164	Mere	200	Argentina 2	236	21.373.58
165	José Bins	201	SM 69-3	237	21.300.3
166	Mechinoku	202	PX 1033	238	21.502.1
167	Braeburn	203	Nova Easygro	239	
168	Angius	204	Red Delicious	240	21.636.5
169	FR 8	205	Pachacamac	241	Primícia
170	Wemershock	206	Red Gold	242	Everest
171	Mac Free	207	Baronesa	243	Kendall
172	Baldwin	208	Pome 24	244	Winter Banana
173	21.300.3	209	Stark Jonadel	245	Early Staymman
174	Niagara	210	Jersey Mac		
175	Black Staymann	211	Orankis Tem		
176	Pome 20	212	Nero Red Rome		
177	Coop 6	213	Grangille Red		
178	D1R78T2	214	Porporate		
179	D2R40T258	215	Red Rome		
180	Pome 15	216	Coop 14		

ANEXO 02

GENEALOGIA DAS CULTIVARES DO BANCO DE GERMOPLASMA



BALDWIN (?)

(Sawyer Baldwin, Baldwin Double Red, Baldwin Scarlet, Black Baldwin, Double Red Baldwin, Red Baldwin)

BANCROFT { Forest
MacIntosh

BARONESA { Princesa
Fuji { Ralls Janet
Delicious

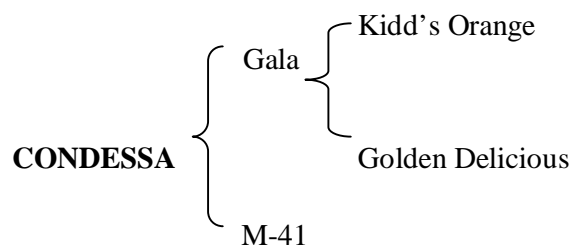
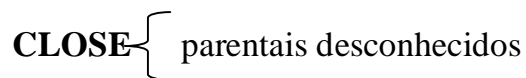
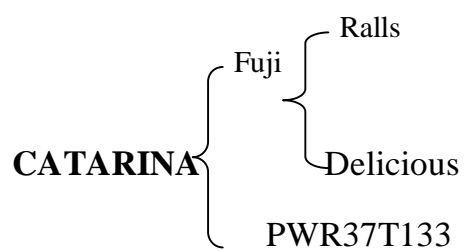
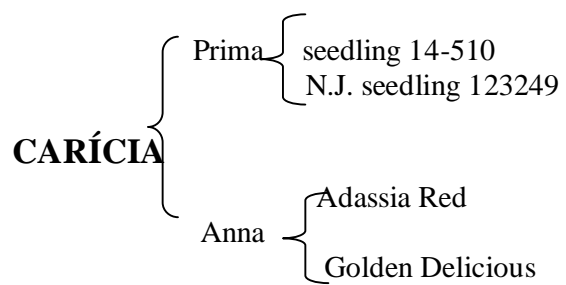
BELLE DE BOSKOOP (?)

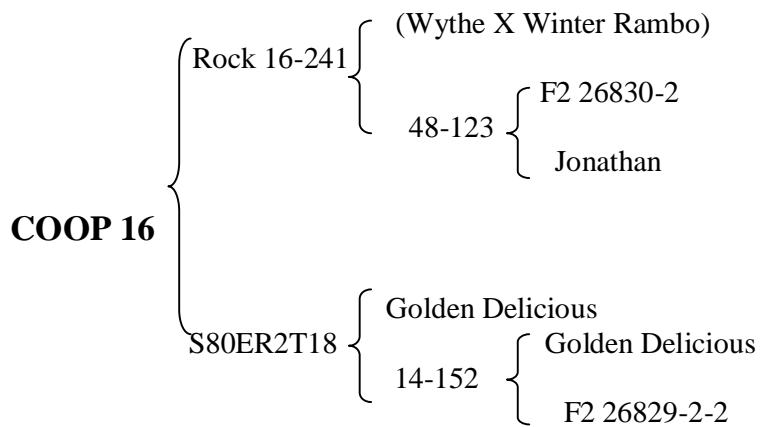
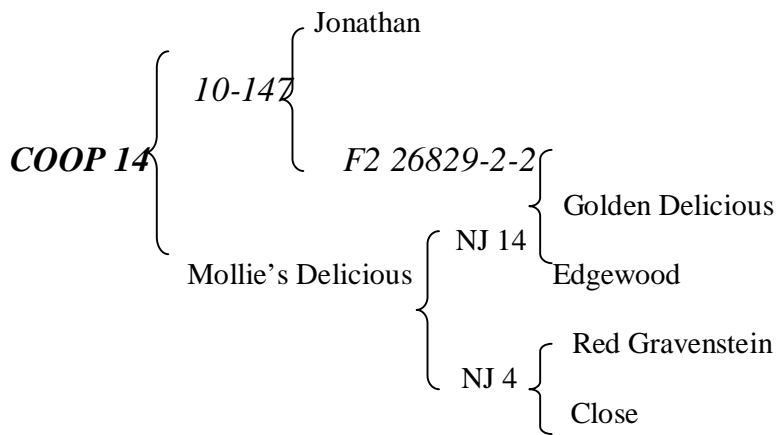
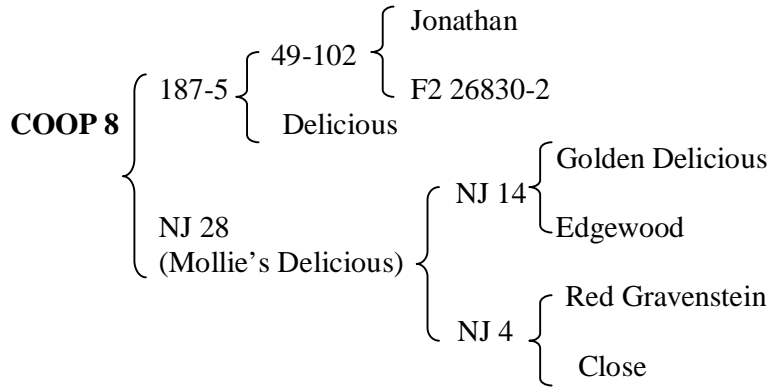
BEN DAVIS { Black Ben
Gano

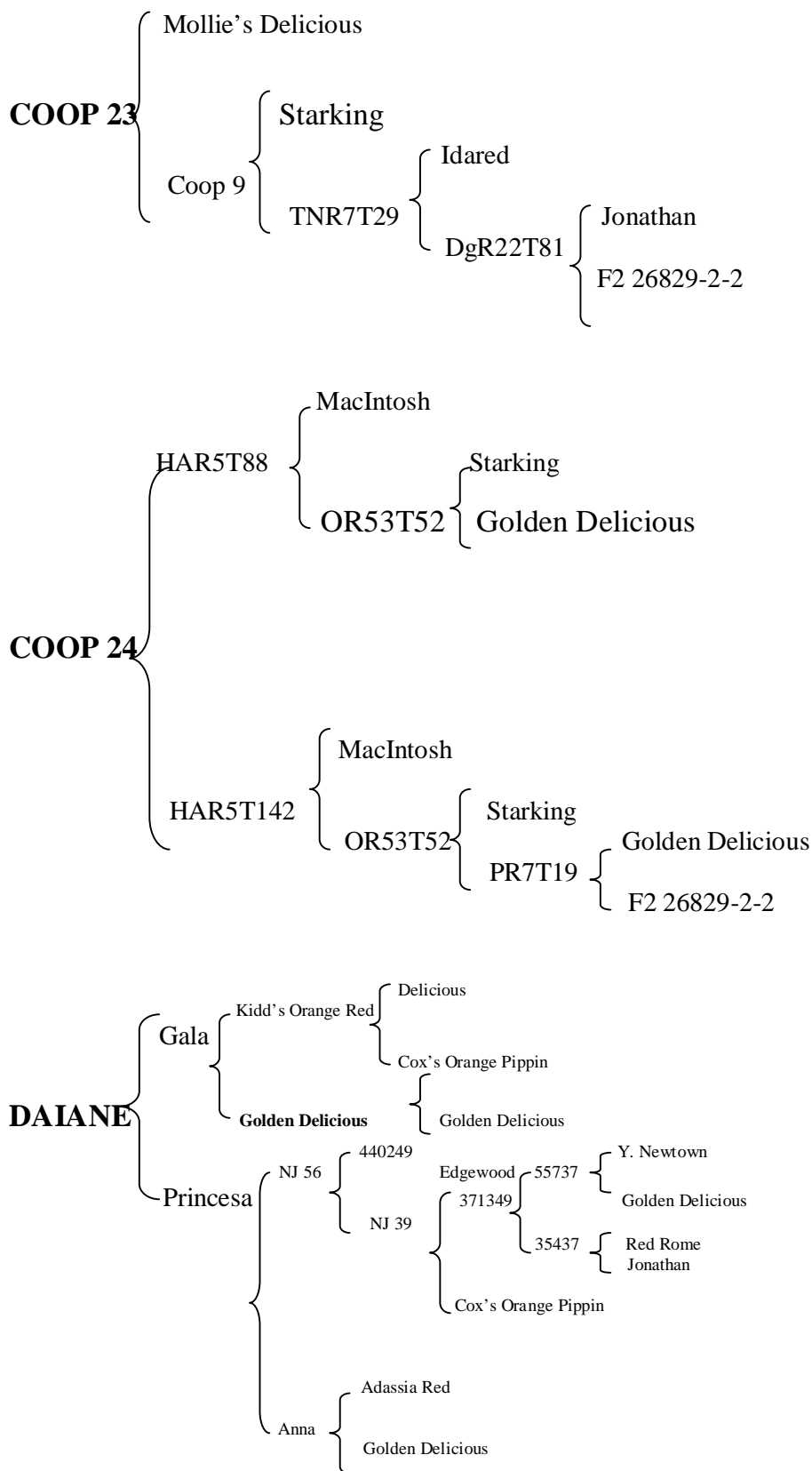
BLACKJON { mutação da Jonathan

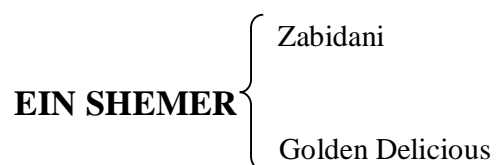
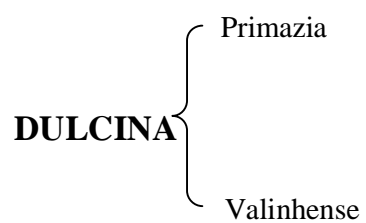
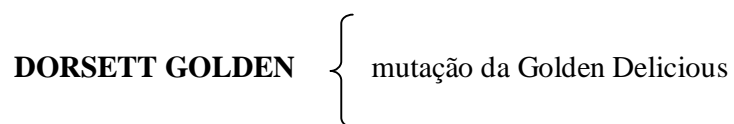
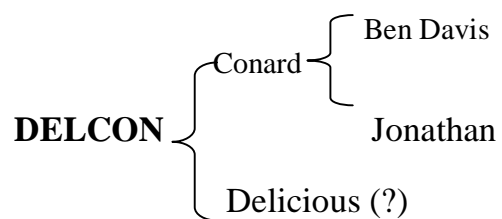
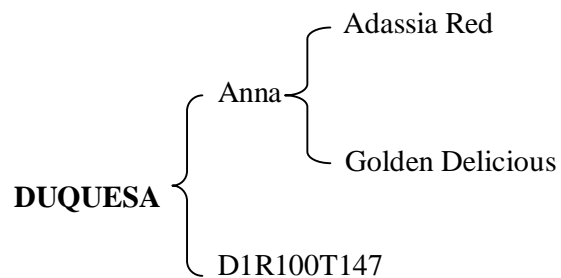
(Black Jonathan, Double Red Jonathan, Red Jon, Red Jonathan)

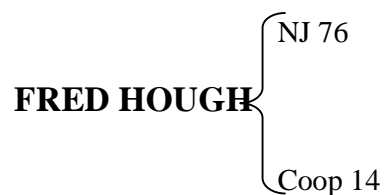
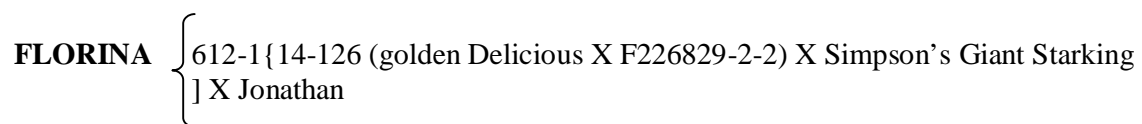
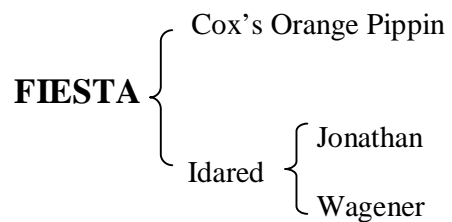
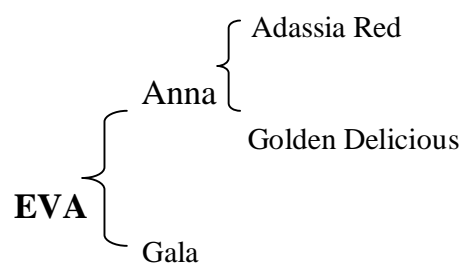
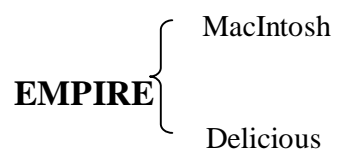
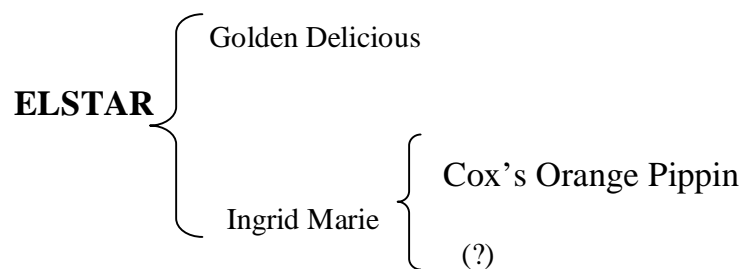
BRAEBURN { Lady Hamilton
polinização aberta











FUJI { Ralls Janet
Delicious

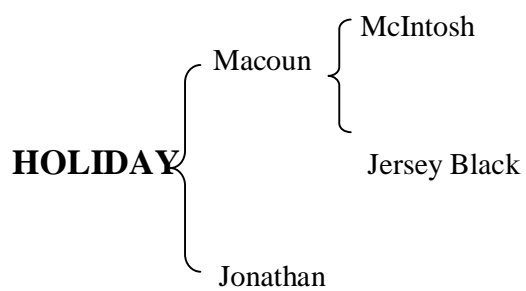
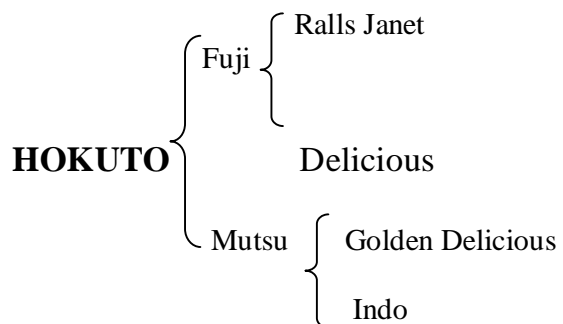
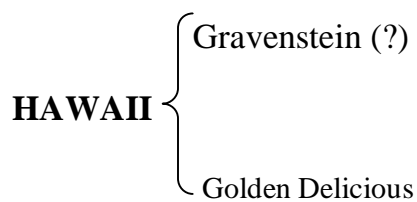
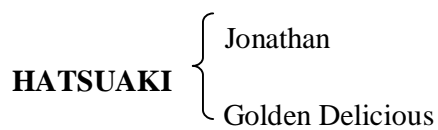
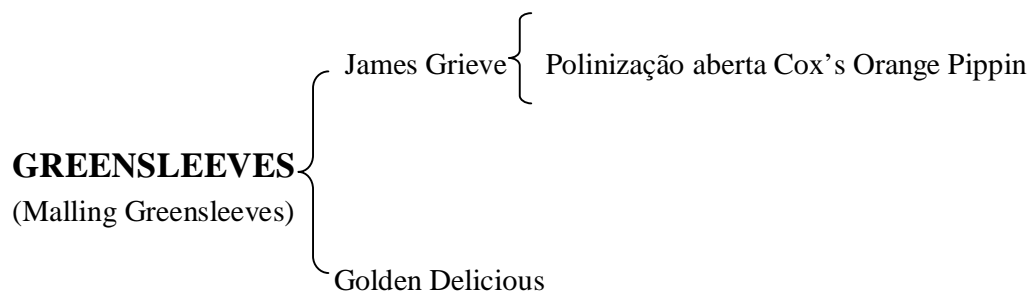
GALA { Kidd's Orange Red { Delicious
Cox's Orange Pippin
Golden Delicious

GALÍCIA { Gala { Kidd's Orange { Delicious
Cox's Orange Pippin
Golden Delicious
Anna { Adassia Red
Golden Delicious

GLOSTER 69 { Glockenapfel
Richard Delicious (mutação da Delicious)

GOLDEN DELICIOUS { Possibilidade de plântula Golden

GRANNY SMITH { Possibilidade de plântula de French



HOLLY { Jonathan
Delicious

HONEYGOLD { Golden Delicious
Haralson (seedling Malinda)

HOREI { Ralls Janet'
Golden Delicious

IDARED { Jonathan
Wagener

JONAFREE { 855-102 { 14-644 { Golden Delicious
Jonathan { F2 26829-2-2 { 9433-2-2 } Rome Beauty
9433-2-8 } Malus Flor.
NJ 31 { Gallia Beauty
Red Spy

JONATHAN { Seedling de Esopus Spitzenburg
Polinização aberta

JERSEY MAC { parentage complexo

JONAFREE { 855-102
NJ 51

JONAMAC { McIntosh
Jonathan

JONAGOLD { Golden Delicious
Jonathan

JONARED { Mutação Jonathan

JULYRED { Parentage complexo

KENDALL { McIntosh
Zusoff

KENT
(Malling Kent) { Cox's Orange Pippin
Jonathan

KITANOSACHI { Tsugaru
Amer Summer Pearmain

KOGETSU { Golden Delicious
Jonathan

LADY WILLIAMS { Parentais desconhecidos

LIBERTY { Macoun
PRI 54-12

LISGALA { mutação da gala

MARQUESA { polinização aberta Rainha

MELBA
1909 { McIntosh
polinização aberta

MAAYAN { F2 seleção (Calville St. Sauveur X Damascus)
X Delicious

MACFREE { McIntosh
PRI 48-77

MILTON { White Transparent
McIntosh

MUTSU { Golden Delicious
Indo

MILTON { Yellow Transparent
McIntosh

MICHINOKU { Kitakami
Tsugaru { Polinização aberta Golden Delicious

MELROSE { Jonathan
Delicious

MONROE { Jonathan
Rome Beauty

MUTSU { Golden Delicious
Indo

NATSUMIDORI { Kitakami
Meku 10

NIAGARA { Carlton
McIntosh

NJ 50 { Mollie's Delicious
Julyre

NOVA EASYGRO { Spartan
progeny 565 { Fanny
Jefferies

NEBUTA { Kitami
Tsugaru

NERO ROME

(Nero Red Rome, Flaming Rome, Mutação Rome Beauty
Lemcke Rome, Triton Rome)

NIAGARA { Carlton { Montgomery
Red Astrachan
McIntosh

NOVAMAC { McIntosh
PRI 1018-3

ODIN { Golden Delicious
Ingrid Marie

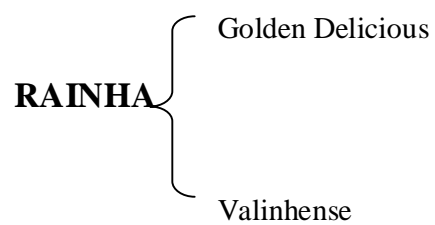
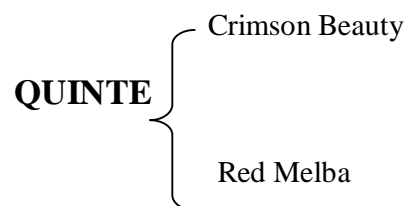
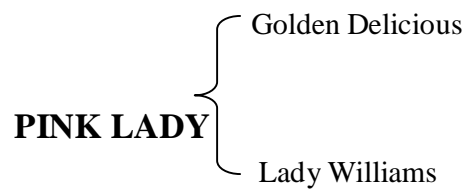
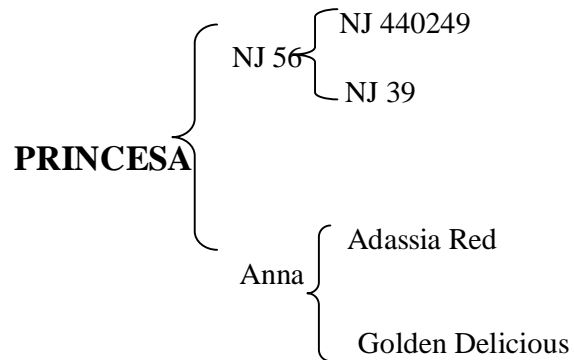
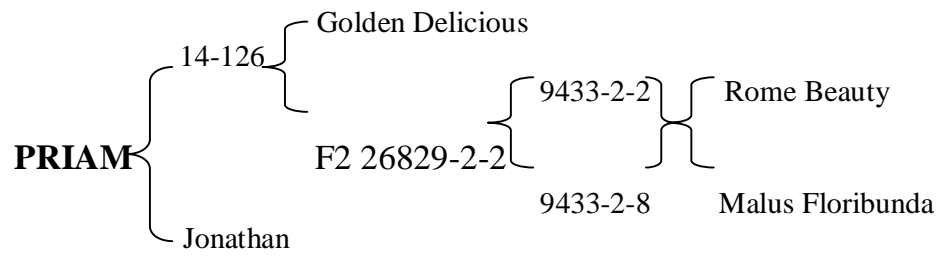
ORIN { Golden Delicious
Indo

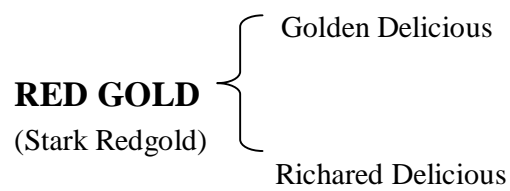
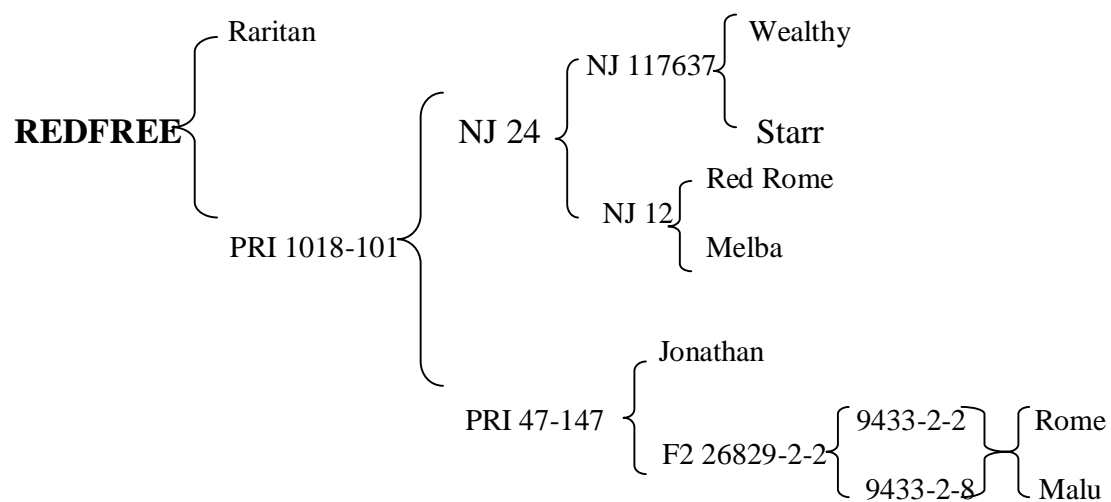
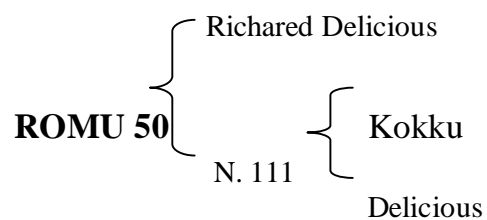
OZARK GOLD { Golden Delicious
H1291 (Red Delicious X Conrad) (Ben Davis X Jonathan)

PAULARED { Parentais desconhecidos

PRISCILLA { Starking Delicious
610-2 { McIntosh
14-226 { Golden Delicious
F2 26829-2-2 { 9433-2-2 { Rome Beauty
9433-2-8 { Malus Floribunda

PRIMÍCIA { D1R101T117
D1R103T245





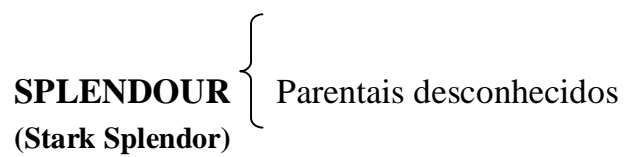
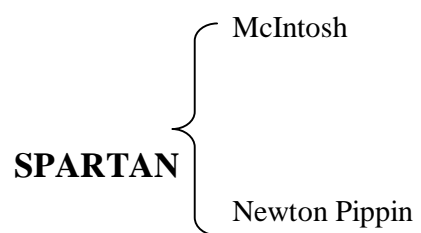
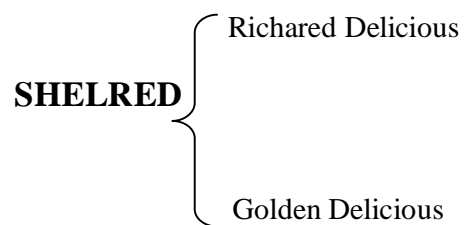
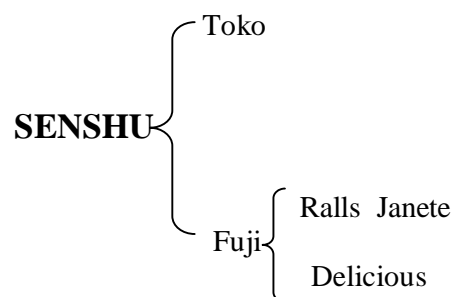
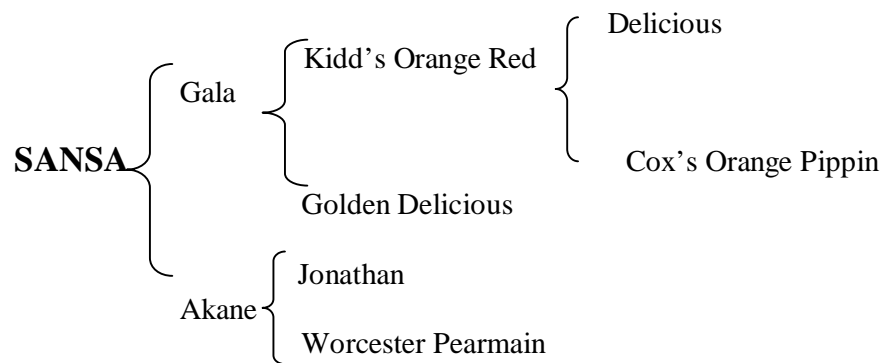
RUBY { Gallia Beauty
Starking

SPARTAN
1936 { MacIntosh
Yellow Newton

SUMMERRED { *MacIntosh*
Golden Delicious } *X polinização aberta*

SPIGOLD { Red Spy
Golden Delicious

SWEET CORNELLY { Golden Delicious
McIntosh



**SPIGOLD
(SPY GOLD)** { Red Spy } mutação de Northern Spy
 { Golden Delicious

STARK JON GRIMES { Parentais desconhecidos
 (Jongrimes, Hoosier Seedling)

SUMMERLAND { McIntosh
 { Golden Delicious

SUNGOLD { *Parentais desconhecidos*

SUNTAN { Cox's Orange Pippin
 { Court Pendu Plat

TROPICAL BEAUTY { Parentais desconhecidos

TSUGARU { Polinização aberta Golden Delicious

VERED { F2 (Calville St. Sauveur X unnamed local Seedling)

YVETTE { Cox's Orange Pippin
Golden Delicious

YOKO { polinização aberta Golden Delicious

WAYNE { Northwestern Greening
Northern Spy

WEALTHY { Polinização aberta Cherry Crab

WEBSTER { Ben Davis
Jonathan

ANEXO 03

SOLUÇÕES

TAMPÃO TBE 10X

- ✓ Tris – HCl 0,89M 108,0g
- ✓ Ácido Bórico 0,89M 55 g
- ✓ EDTA 0,02M 40 mL de 0,5M pH 8,0
- ✓ H₂O ultra-pura completar volume para 1000 mL

A solução foi preparada e mantida à temperatura ambiente. No momento do uso procederam-se as diluições necessárias.

SOLUÇÃO ESTOQUE DE TRIS-HCl 1M pH 7,2

- ✓ Trisma-base 12,11 g
- ✓ H₂O ultra-pura completar volume para 100 mL
- ✓ O pH foi ajustado para 7,2 com HCl.

A solução foi autoclavada e mantida em temperatura ambiente.

SOLUÇÃO ESTOQUE DE EDTA 0,5M pH 8,0

- ✓ EDTA 18,61 g
- ✓ H₂O ultra-pura completar volume para 100 mL

O pH foi ajustado para 8,0 com NaOH. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

BIS-ACRILAMIDA 40% (19:1)

- ✓ Acrilamida= 380 g
- ✓ Bis-acrilamida= 20 g
- ✓ Água ultrapura para 1000 mL

A solução deve ficar no agitador overnight

ANEXO 04

REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA - PCR

Componentes	Concentração Solução de Trabalho	Volume 1 X (1µl)
Água Mili-q estéril		3,4
MgCl ₂	50 mM	0,6
Tampão 10X		1,5
DMSO	50 %	1,7
DNTPs	2,5 mM	1,5
Iniciador F	20 µM	1,75
Iniciador R	20 µM	1,75
Taq DNAPolimerase	5 U/ µl	0,2
DNA	10 ng/ µl	3,0
TOTAL		15 µl

ANEXO 05

GÉIS

GEL DE AGAROSE 0,8%

- ✓ TBE 1X 350 mL
- ✓ Agarose 2,8 g
- ✓ Brometo de Etídio (10 mg.mL⁻¹) 3,0 μ L

Foi pesado a agarose e adicionado o TBE 1X, aquecidos no microondas por 2-3 minutos na potência máxima para que toda a agarose fosse dissolvida. Após esperar esfriar um pouco foi adicionado o Brometo de Etídio e vertido o gel na cuba de eletroforese (Gator™ Large Format Horizontal Systems – OWL model A2).

GEL DE POLIACRILAMIDA 4%

GEL DE POLIACRILAMIDA (50 mL)

- ✓ Uréia: 21,0 g
- ✓ TBE 10X: 2,5 mL
- ✓ Água ultrapura: 24,2 mL
- ✓ 40% A:BIS (19:1): 5,0 mL

Obs: O gel de poliacrilamida pode ficar armazenado na geladeira, no máximo por 1 mês.

PREPARO DO GEL

Misture (na capela), minutos antes de aplicar o gel na placa:

80 mL do gel – filtrado com papel filtro

40 μ L TEMED

400 μ L Persulfato de Amônia (APS)

APS: 1,0 mg de persulfato de amônia

1000 μ L de H₂O Ultra Pura

LIMPEZA DAS PLACAS

Placa Aderente (inteira):

Lavar a placa com detergente e secar;

Aplicar álcool 70% algumas vezes no sentido longitudinal e transversal.

Placa Repelente (dentada):

Lavar a placa com detergente e secar;

Aplicar água Ultra Pura algumas vezes e secá-la novamente.

TRATAMENTO DA PLACA ADERENTE (INTEIRA):

995 μ L de álcool 95%

5 μ L de ácido acético glacial

3 μ L de "binding silane"

Misturar os reagentes em um tubo e aplicar na placa no sentido longitudinal e transversal por

3 vezes. Trocar as luvas.

TRATAMENTO DA PLACA REPELENTE (DENTADA) (NA CAPELA):

500 μ L de "repel silane"

Aplicar na placa e espalhar no sentido longitudinal e transversal por 3 vezes.

Obs: Após o preparo das placas deixá-las por 15 minutos secando;

A seguir, limpar novamente as placas:

Placa inteira: Utilizar solução etanol a 95% e espalhar no sentido longitudinal e transversal por 3 vezes.

Placa dentada: Secar com papel toalha nos dois sentidos por 3 vezes.

Importante: Não esquecer de trocar as luvas ao manusear as placas.

MONTAGEM DA PLACA:

- 1- Preparar todos os aparatos do gel (grampos, espaçadores, pente, nível, injetor do gel, isopor, cuba);
- 2- Cobrir o balcão com parafilme;
- 3- Colocar o isopor sobre o parafilme;
- 4- Colocar a placa aderente (inteira) sobre o isopor;
- 5- Colocar os espaçadores sobre a placa aderente;
- 6- Colocar a placa repelente (dentada) em cima da aderente;
- 7- Colocar os grampos nas laterais da placa;
- 8- Nivelar a placa.

APLICAÇÃO DO GEL:

Completar o volume do gel para 80 mL e colocar no injetor de gel;
Acrescentar 50 μ L de TEMED e 500 μ L de APS (na capela) agitando;
Verter continuamente o gel na placa;
Colocar o pente invertido na placa e fixá-lo com grampos;
Deixar em repouso até polimerizar bem.

Passos para correr o gel

- 1- Antes de colocar o gel para aquecer, limpar os resíduos de gel nas placas e no local onde fica o pente;
- 2- Tirar os grampos da placa;
- 3- Encaixar o gel no suporte (cuba de eletroforese);
- 4- Limpar o espaço onde ficará o pente tirando o excesso de acrilamida. Cuidar para não tocar na linha do pente;

- 1- Colocar o tampão em cima das placas e embaixo;
- 2- Encaixar os suportes das correntes;
- 3- Conectar os plugs na fonte;
- 4- Colocar o medidor de temperatura;
- 6- Colocar o gel para aquecer por 30 a 45 minutos ou até a temperatura chegar a 45°C com tampão TBE 1X, a qual pode ser utilizada por 3 vezes;
- 7- Limpar as canaletas com borrifador;
- 8- Após aquecer o gel, colocar o pente e aplicar as amostras, procure aplicar rápido e limpar a canaleta do lado com a micropipeta na diagonal, deixar correr por 15 minutos, desligar e tirar o pente;
- 9- Deixar as amostras correndo no gel por um período de $\approx 1 \frac{1}{2}$ horas, em uma voltagem de 1300 V.

Aquecimento: 1300V 46mA 60W

Após aplicar as amostras: 900V 75mA 75W

REAGENTES NECESSÁRIOS PARA REVELAR O GEL

1- Solução de Fixação: Ácido Acético (1 L)

10 mL de ácido acético glacial 1%

100 mL etanol 10%

890 mL de água Ultra Pura

2- Pré-tratamento: Ácido Nítrico (1 L)

15 mL ácido nítrico 1,5%

985 mL água Ultra Pura

3- Solução de coloração: Nitrato de Prata (1 L)

2 g de nitrato de prata

1L de água Ultra Pura

OBS: Guardar em vidro âmbar ou um vidro forrado com papel alumínio.

4- Solução de Revelação – Impregnação: Carbonato de sódio (1 L)

30 g de carbonato de sódio anidro – Na_2CO_3

540 μL de formaldeído (37%)

1L de água Ultra Pura

Modo de Preparo

Em um Becker acrescentar 500 mL de água Ultra Pura e adicionar o carbonato aos poucos no agitador, até diluir completamente. Completar o conteúdo para 1L e armazenar na geladeira (deve estar bem gelado na hora de ser utilizado). Acrescentar o formaldeído na hora que for utilizar o carbonato.

REVELAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE DO GEL

Separar as duas placas com o auxílio de uma espátula

1- FIXAÇÃO: em uma bacia mergulhar a placa com o gel (inteira) em uma solução de fixação composta de: etanol 10%, ácido acético 1% (100 mL etanol.L-1 + 10 mL ácido acético.L-1) mantendo sob agitação por 10 minutos.

2- LAVAGEM: em uma bacia fazer a lavagem da placa em 1L de água Ultra Pura e manter sob agitação por 1 minuto.

3- PRÉ-TRATAMENTO: transferir a placa para outra bacia contendo ácido nítrico 1,5% (15 mL.L-1) e manter sob agitação por 3 minutos.

4- LAVAGEM: em uma bacia fazer a lavagem da placa em 1L de água Ultra Pura e manter sob agitação por 1 minuto.

5- IMPREGNAÇÃO: transferir a placa para outra bacia contendo nitrato de prata 0,2% (2 g.L-1) e manter sob agitação por 30 minutos.

6- LAVAGEM: em uma bacia fazer outra lavagem da placa em 1L de água Ultra Pura e manter sob agitação por 1 minuto.

7- REVELAÇÃO: transferir a placa para outra bacia contendo uns 300 mL do carbonato de sódio (30 g.L-1 Na_2CO_3 + 540 $\mu\text{L.L-1}$ de formaldeído 37%) bem gelado sob leve agitação (manual) até a solução ficar escura e, então, adicionar em uma outra bacia limpa o restante da solução (700 mL) até que apareçam todas as bandas ou até que o gel comece a escurecer bastante.

8- BLOQUEIO: transferir a placa para outra bacia contendo o ácido acético 5% (50 mL.L-1) mantendo sob agitação por 5 minutos para que seja bloqueada a reação.

9- LAVAGEM: em uma bacia fazer outra lavagem da placa em 1L de água Ultra Pura e manter sob agitação por 1 minuto.

REUTILIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES

Fixação → 3 vezes

Pré-tratamento → 5 vezes

Impregnação → 3 vezes (deve ser armazenada no escuro em T°C ambiente)

Bloqueio → 5 vezes