

LUANE BOSETTO

**CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO ENTRE CULTIVARES DE MACIEIRA
DESENVOLVIDAS EM SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Dr. Altamir Frederico Guidolin
Coorientador: Dr. Jefferson M. Coimbra

**LAGES
2021**

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela Sua presença constante e essencial para guiar os meus passos e me dar forças para enfrentar as dificuldades da vida.

A minha família, pelo apoio incondicional e pela sua simples presença, que me acalma, e me motiva seguir em frente.

Aos professores Dr. Altamir Frederico Guidolin e Dr. Jefferson Luís Meirelles Coimbra pela orientação e oportunidade de realização do mestrado.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e pelo tempo cedido para a leitura e apresentação do presente trabalho.

A EPAGRI, pela concessão do material e por sempre me receberem de portas abertas, dispostos a auxiliar e transmitir o conhecimento da pesquisa.

Aos pesquisadores Dr. Marcus Vinicius Kvitschal e Dra. Maraisa Crestani Hawerth, pela oportunidade, confiança e incentivo.

Ao professor Dr. Rubens Onofre Nodari, pela concessão de grande parte dos marcadores microssatélites utilizados no trabalho.

Ao Laboratório de DNA, pela concessão do espaço e materiais necessários, e aos professores integrantes, Dr. Newton e MSc. Flávia, pelo auxílio prestado e por todos os ensinamentos nos momentos de dúvidas.

À UDESC, ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal e a todos os professores, pelo ensino.

A CAPES e FAPESC pelo auxílio financeiro.

Aos amigos, integrantes do Laboratório de Genética – Pesquisa e IMEGEM, pelos conselhos, dicas e ajuda nos momentos necessários.

Aos amigos de tempos anteriores, Thyana, Cris, Keren e Jessé, pelos conselhos, apoio e auxílio em todos os momentos que foram necessários.

A todos aqueles que de alguma forma auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho e contribuíram com essa conquista, agradeço o apoio.

Muito obrigada!

RESUMO

BOSETTO, L. **Caracterização e diferenciação entre cultivares de macieira desenvolvidas em Santa Catarina**. 2020. 53f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal – Área: Melhoramento e Recursos Genéticos) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2021.

A macieira (*Malus x domestica* Borkh.) é uma das frutíferas mais cultivadas mundialmente, apresentando grande importância econômica e social, sendo alvo de diversas pesquisas. O melhoramento genético, busca desenvolver novas cultivares mais adaptadas e com características de interesse ao produtor e ao consumidor. A caracterização morfológica e agrônômica permite estimar a dissimilaridade entre os genótipos para que sejam utilizados com maior eficiência na formação de populações segregantes visando a obtenção de maior variabilidade. Entretanto, o ambiente exerce uma grande influência sobre o desempenho fenotípico das cultivares. Visando a caracterização independente dos efeitos ambientais, podem ser utilizados marcadores moleculares para a descrição a nível molecular dos genótipos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização e diferenciação morfoagronômica e molecular das cultivares de macieira desenvolvidas em Santa Catarina pelo Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (PMGME/EPAGRI). Foi realizada a fenotipagem com base nos 57 descritores mínimos previstos pelo Sistema Nacional de Proteção de Cultivares do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SNPC/MAPA) para a caracterização de cultivares copa de macieira, e em paralelo foi realizada a genotipagem com o uso de um conjunto de 19 marcadores microssatélites. Foram contemplados 23 genótipos, englobando as 21 cultivares lançadas pela Epagri, sendo 5 desenvolvidas a partir de mutações espontâneas e 16 de hibridações controladas e duas cultivares padrão (Fuji *standard* e Royal Gala). Conforme o esperado, a caracterização fenotípica se mostrou essencial, entretanto, a dissimilaridade entre os genótipos foi baixa, visto que os genótipos utilizados apresentam indivíduos aparentados e são resultantes de um programa de melhoramento, advinda do processo de seleção. Os marcadores microssatélites não foram eficientes na diferenciação de todas as cultivares desenvolvidas a partir de mutações espontâneas, entretanto, podem ser uma excelente ferramenta auxiliar para a caracterização de cultivares obtidas por meio de hibridações controladas, inclusive, atestando a genealogia das cultivares de interesse. Com isso, conclui-se que a descrição morfoagronômica é essencial, mas pode ser complementada pela caracterização molecular, garantindo a diferenciação entre as cultivares.

Palavras-chave: *Malus x domestica* Borkh., melhoramento genético, recursos genéticos, marcadores microssatélites, descritores morfoagronômicos.

ABSTRACT

BOSETTO, L. **Characterization and differentiation between apple cultivars developed in Santa Catarina.** 2021. 53f. Dissertation (Master in Plant Production - Area: Breeding and Genetic Resources) - Santa Catarina State University. Postgraduate Program in Plant Production, Lages, 2020.

The apple tree (*Malus x domestica* Borkh.) is one of the most cultivated fruit trees worldwide, presenting great economic and social importance, being the target of several researches. Genetic improvement seeks to develop new cultivars more adapted and with characteristics of interest to the farmer and the consumer. The morphological and agronomic characterization allows estimating the dissimilarity between genotypes so that they are used more efficiently in the formation of segregating populations in order to obtain greater variability. However, the environment exerts a great influence on the phenotypic performance of cultivars. In order to independently characterize the environmental effects, molecular markers can be used for the molecular description of genotypes. Therefore, the objective of this work was to perform the characterization and morphoagronomic and molecular differentiation of apple cultivars developed in Santa Catarina by the PMGME/EPAGRI. Phenotyping was performed based on the 57 minimum descriptors predicted by SNPC/MAPA for the characterization of apple tree cultivars, and in parallel genotyping was performed by using a set of 19 microsatellite markers. Twenty-three genotypes were included, comprising the 21 cultivars launched by Epagri, 5 of which were developed from spontaneous mutations and 16 from controlled hybridizations and two control cultivars (Fuji standard and Royal Gala). As expected, phenotypic characterization proved essential, however, the dissimilarity between genotypes was low, since the genotypes used present related individuals and are the result of a breeding program, arising from the selection process. The microsatellite markers were not efficient in differentiating all cultivars developed from spontaneous mutations, however, they can be an excellent auxiliary tool for the characterization of cultivars obtained through controlled hybridizations, including attesting to the genealogy of cultivars of interest. Thus, it is concluded that the morphoagronomic description is essential, but can be complemented by molecular characterization, ensuring differentiation between cultivars.

Keywords: *Malus x domestica* Borkh., plant breeding, genetic resources, microsatellite markers, morphoagronomic descriptors.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Dendrograma da dissimilaridade fenotípica entre 23 cultivares de macieira obtido pelo método de Ward, com base no algoritmo de Gower. O ponto de corte na distância 0,37 foi obtido pelo cálculo da dissimilaridade média, gerando a formação de seis grupos.23
- Figura 2** – Época de maturação dos 22 genótipos avaliados, conforme a data da colheita, na safra 2018/2019.25
- Figura 3** – Mapa genético da macieira, com a localização dos 19 marcadores SSR empregados neste trabalho. O mapa foi construído com base no banco de dados disponibilizado em www.rosaceae.org/search/markers.34
- Figura 4** – Exemplificação da genotipagem da cultivar Fuji Suprema com 4 marcadores microssatélites (CH02d08, CH03b06 e NZ02b1), por meio do software GeneMapper®, v. 1.2.36
- Figura 5** – Eletroforegramas de quatro marcadores microssatélites obtidos para a cultivar Catarina.42
- Figura 6** – Genealogia ilustrada das cultivares avaliadas no presente estudo.44
- Figura 7** – Dendrograma de agrupamento dos 23 genótipos de macieira analisados, com base nos 19 marcadores microssatélites, sendo agrupados pelo método UPGMA, com base na distância de Jaccard. A linha tracejada vermelha representa a distância média entre os genótipos (0,583) e foi utilizada como ponto de corte.45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Genótipos de macieira avaliados, englobando 21 cultivares lançadas pelo Programa de Melhoramento Genético da Epagri e duas cultivares padrão. 19
- Tabela 2** – Maiores e menores valores de dissimilaridade fenotípica, entre as 23 cultivares avaliadas, considerando os 57 caracteres morfoagronômicos multicategóricos. 21
- Tabela 3** – Cultivares de macieira desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri e suas respectivas origens ou genealogias. 30
- Tabela 4** – Iniciadores microssatélites, empregados para a genotipagem das cultivares de macieira (*Malus x domestica* Borkh.), e as suas respectivas sequências *forward* e *reverse*, sentido 5'-3', e unidades de repetição (UR). Foram organizados oito painéis multiplex (M) de acordo com a cor do fluoróforo (*Dye*) e o tamanho do fragmento amplificado (*Range*), em pares de bases (pb). 33
- Tabela 5** – Caracterização molecular de genótipos de macieira desenvolvidas pela Epagri, sendo duas cultivares padrão, quatro parentais, cinco mutantes e 16 híbridos (continua). 38
- Tabela 6** – Comparação entre a caracterização molecular da cultivar SCS425 Luiza (filho), seus parentais de acordo com o registro, Imperatriz (genitor feminino) e Cripps Pink (suposto genitor masculino) e o real parental masculino de acordo com o genótipo, a cultivar Baronesa (genitor masculino). 43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 A CULTURA DA MACIEIRA.....	9
2.2 MELHORAMENTO GENÉTICO DA MACIEIRA.....	10
2.3 VARIABILIDADE GENÉTICA DA MACIEIRA.....	12
CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO FENOTÍPICA ENTRE CULTIVARES DE MACIEIRA DESENVOLVIDAS EM SANTA CATARINA.....	17
1 INTRODUÇÃO	17
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4. CONCLUSÃO.....	27
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR ENTRE CULTIVARES DE MACIEIRA DESENVOLVIDAS EM SANTA CATARINA.....	28
1 INTRODUÇÃO	28
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4. CONCLUSÃO.....	46
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXO A – DESCRITORES MORFOLÓGICOS E AGRONÔMICOS	55
ANEXO B – CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.....	58

1 INTRODUÇÃO

A maçã (*Malus x domestica* Borkh.) é uma das frutíferas mais cultivadas no mundo (FAO, 2018). No Brasil, a produção está concentrada na região Sul, sendo Santa Catarina o principal estado produtor, existindo um predomínio quase total dos grupos de cultivares ‘Gala’ e ‘Fuji’ (ABPM, 2019).

Esse cenário representa uma maior vulnerabilidade do sistema de cultivo, tanto pela resistência à doenças, quanto pela adaptação às condições climáticas, além da dificuldade do uso da mão-de-obra, com épocas de colheita concentradas em determinados períodos, e do oferecimento de poucas cultivares ao mercado consumidor.

Os programas de melhoramento genético da macieira são essenciais para que o desenvolvimento de novas cultivares melhore esse cenário, deixando o sistema de cultivo menos vulnerável e mais eficiente. No Brasil, o Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri é o principal desenvolvedor de cultivares de macieira, e o único exclusivo da espécie, tendo lançado 21 cultivares com apelo do mercado nacional e internacional. Essas cultivares são de extrema importância, pois oferecem frutos com qualidade organoléptica e melhor adaptadas às condições de clima do sul do Brasil, permitindo melhores opções de manejo.

Entretanto, o desenvolvimento de uma nova cultivar é um processo laborioso, que demanda tempo. Uma das etapas essenciais é a caracterização e diferenciação desses materiais já existentes, auxiliando os melhoristas nas tomadas de decisões, além de viabilizar a identificação fiel e, com isso, facilitar o recolhimento de *royalties* pela empresa detentora da proteção das cultivares já lançadas.

A caracterização e diferenciação de cultivares pode ser realizada por meio de marcadores morfológicos e agronômicos, que vêm sendo empregados há décadas por exigência dos órgãos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) responsáveis pelo registro (Registro Nacional de Cultivares – RNC) e proteção (Serviço Nacional de Proteção de Cultivares – SNPC) de cultivares no país. Mas, seria interessante incorporar o uso de ferramentas complementares às atividades de rotina, como marcadores moleculares, que ampliam o conhecimento sobre cada genótipo e podem garantir uma diferenciação mais eficiente e rápida.

Nesse sentido, o presente trabalho objetivou caracterizar e diferenciar genótipos de macieira desenvolvidas no estado de Santa Catarina pela Empresa de

Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), visando agregar informações para o uso do Programa de Melhoramento. Objetivou-se também avaliar a efetividade do uso dos marcadores morfológicos e agronômicos da espécie *Malus x domestica* Borkh. (copa), e verificar a possibilidade do emprego de marcadores moleculares para a diferenciação entre genótipos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DA MACIEIRA

A macieira cultivada foi inicialmente domesticada a partir da macieira selvagem *Malus sieversii*, nas cordilheiras de Tian Shan, na Ásia Central, sendo distribuída na região da Rota da Seda, que abrangia a Ásia e a Europa, entrando em contato com outras espécies selvagens, como a *Malus baccata* (L.) Borkh., *Malus orientalis* Uglitz. e *Malus sylvestris* Mill. Essas quatro espécies são consideradas os ancestrais da macieira cultivada, *Malus x domestica* Borkh. (CORNILLE *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, tem sido a terceira frutífera mais cultivada no mundo, atrás apenas da banana e da melancia. A China é o maior produtor, contribuindo com aproximadamente 48,6% do valor total, seguida pelos Estados Unidos com 5,7% e da Turquia com 4,1%. O Brasil é o 11º país no ranking mundial, produzindo em torno de 1,4 % da fruta (FAO, 2019), sendo que 99,3% da maçã é cultivada na região Sul (IBGE, 2017), que divide-se em 52,6% em Santa Catarina, 44,8% no Rio Grande do Sul e 2,6% no Paraná. Em Santa Catarina, o cultivo está concentrado no Planalto Sul Catarinense, região do município de São Joaquim, que contribui com aproximadamente 71,2% da produção catarinense, enquanto que o restante está distribuído entre Fraiburgo e as outras regiões produtoras do estado (ABPM, 2019).

No cenário nacional de cultivo existe um predomínio dos grupos ‘Gala’ e ‘Fuji’, que correspondem a 94,5% da produção total, onde 61,6% equivale ao grupo Gala e suas mutações, como Galaxy, Baigent e Maxi Gala, enquanto que 32,9% corresponde ao grupo Fuji e suas mutações, como Fuji Mishima e Fuji Suprema. Os demais 5,5% englobam as outras cultivares, como Cripps Pink, Daiane, Eva, Monalisa, Joaquina, Catarina, Condessa e Julieta (ABPM, 2019).

Entretanto, em países desenvolvidos do Hemisfério Norte, o cenário é outro. Na Europa, existem mais de 30 cultivares plantadas, sendo que as mais produzidas

são Golden Delicious, Gala e seus clones, Red Delicious, Idared, Jonagold, Champion, Cripps Pink, Elstar, Fuji e seus clones e Granny Smith. Nos Estados Unidos, são produzidas mais de 20 cultivares de maçã, dentre elas também Gala e Fuji e seus clones, além de Red Delicious, Granny Smith, Honeycrisp e Golden Delicious, que possuem volumes semelhantes de produção. No Hemisfério Sul o número de cultivares é reduzido, sendo as principais, Gala, Fuji, Red Delicious, Granny Smith, Cripps Pink, Golden Delicious e Braeburn, produzidas no Chile, Argentina, África do Sul, Nova Zelândia e Austrália (WAPA, 2019).

Esse número reduzido de cultivares pode ser atribuído às condições climáticas desfavoráveis ao cultivo nessas regiões, visto que possuem um clima mais quente, dificultando o acúmulo de horas de frio ($HF < 7,2^{\circ}\text{C}$) no inverno, que é necessário para o cultivo de frutíferas de clima temperado (IUCHI, 2006), além da dificuldade de introdução de novas cultivares, devido ao pequeno percentual de replantio de pomares anualmente (HAUAGGE; BRUCKNER, 2012).

A restrição da base genética em macieira atualmente cultivada no Brasil, traz como consequência um sistema de cultivo vulnerável e menos eficiente em questões como, por exemplo, o escalonamento da colheita. Uma possibilidade de mudança desse cenário é o desenvolvimento e uso de cultivares mais adaptadas, possibilitando a produção em regiões como o Planalto Norte Catarinense e do Sul do Paraná, além de possibilitar a expansão do cultivo da macieira para outras regiões do país e do mundo (ALBUQUERQUE, 2018; KVITSCHAL; HAWERROTH; BRIGHENTI, 2018).

2.2 MELHORAMENTO GENÉTICO DA MACIEIRA

O desenvolvimento de novas cultivares de macieira é um processo laborioso e demanda tempo, visto que a espécie se desenvolve ao longo de anos (HAUAGGE; BRUCKNER, 2012). Para a obtenção de genótipos com características promissoras é necessário a existência de variabilidade genética, que pode ser criada por meio de mutações naturais ou induzidas, e ampliada por meio da hibridação entre parentais contrastantes, conduzida por programas de melhoramento da espécie (FAORO, 2018).

A macieira é uma das frutíferas com maior número de cultivares mutantes lançadas em todo o mundo, devido à sua alta predisposição a mutações naturais, que ocorrem em uma única célula, originando uma gema, galho ou planta inteira mutante, que resultam em um novo genótipo (BROWN, 1975; PRASAD, 2020). Além disso,

existem muitas cultivares desenvolvidas a partir de hibridações, contribuindo para a alta diversidade de cultivares de macieira.

As mutações são alterações na sequência e no arranjo do DNA, que podem ocorrer de forma espontânea, e que mesmo em baixa frequência, podem gerar características importantes, que podem ser selecionadas com base no fenótipo, focando muitas vezes em caracteres inexistentes no germoplasma disponível. Essas mutações espontâneas podem formar alguns ramos, ou estar limitadas a uma camada de células do meristema. Desta forma, a parte mutada da planta é propagada vegetativamente, seguida da avaliação da estabilidade genética da característica e da possível ocorrência de outras alterações no fenótipo (FAORO, 2018; PRASAD, 2020; PRATT, 1983). Embora com baixa frequência, essa metodologia ainda é utilizada, pois os mutantes são identificados com relativa facilidade, sendo mais comuns em pomares comerciais (BRUCKNER; WAGNER JÚNIOR, 2011; HAUAGGE; BRUCKNER, 2012). As mutações espontâneas mais comumente selecionadas são de plantas compactas, com período juvenil curto, época de colheita distinta, permitindo escalonamento, e frutos de coloração atrativa (PEREIRA-LORENZO et al., 2018). Após a confirmação de que a mutação é estável e reprodutível, serão realizados os testes requeridos pelo MAPA/SNPC para registro de cultivar, para que a estabilidade e homogeneidade seja garantida.

A hibridação é outra metodologia de obtenção de novas cultivares. Em frutíferas alógamas e propagadas vegetativamente são selecionados genitores heterozigotos compatíveis, com boa aceitação e características de interesse agrônomo e comercial. Como resultado da hibridação entre esses genitores, são obtidas populações segregantes, base para a seleção de híbridos e a perpetuação por meio da propagação vegetativa, mantendo os caracteres selecionados, e possibilitando a avaliação da estabilidade dessas características, visando o lançamento de uma nova cultivar. No Brasil,, são buscados híbridos com menor exigência de frio para a superação da dormência, resistentes à doenças, com cor de epiderme atrativa, época de maturação dos frutos distinta das cultivares existentes e com boa capacidade de armazenamento em câmara fria (BRUCKNER; WAGNER JÚNIOR, 2011; HAUAGGE; BRUCKNER, 2012).

2.3 VARIABILIDADE GENÉTICA DA MACIEIRA

A variabilidade genética é a base do processo de melhoramento genético, pois a seleção só é efetiva se há diversidade. A seleção de um material com as características buscadas pelos programas visa desenvolver cultivares com maior produtividade, que possibilitam opções de manejo ao produtor, resistentes à doenças, adaptadas ao local de cultivo e atrativas ao mercado consumidor.

Os bancos de germoplasma são uma forma de armazenamento e conservação dessa diversidade, preservando e tornando disponíveis aos melhoristas a base genética de uma determinada espécie ou gênero (REYES-VALDÉZ et al., 2018). A seleção de genótipos é eficiente desde que haja uma ampla base genética, entretanto, o melhoramento, geralmente, reduz essa variabilidade, restringindo as características dos genótipos ao que é almejado pelos produtores e pelo mercado consumidor (FALEIRO et al., 2008).

O resgate dessa variabilidade e a ampliação da base genética pode ser feita através da introdução desses genótipos mantidos nos bancos de germoplasma, podendo incluir espécies silvestres em alguns casos, além dos métodos de hibridação e de obtenção de genótipos a partir de mutações (FAORO, 2018; HOKANSON et al., 2001).

A macieira é uma das espécies com maior variabilidade genética conservada no mundo (FERREIRA, 2011). O gênero *Malus* engloba aproximadamente 30 espécies, sendo a *Malus x domestica* Borkh. a espécie cultivada mundialmente (CORNILLE et al., 2014), englobando mais de 7500 cultivares que são mantidas em bancos de germoplasma em diversos países (DENARDI et al., 2011; FURLAN et al., 2010; GASI et al., 2010; LASSOIS et al., 2016; MARCONI et al., 2018; PEREIRA-LORENZO et al., 2003; STORTI et al., 2012).

No Brasil, o banco de germoplasma da macieira está localizado na Estação Experimental de Caçador, da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), onde foi implementado na segunda metade da década de 70, contando com aproximadamente 444 acessos, os quais apresentam uma grande diversidade de características de importância agrônômica, incluindo fonte de resistência às principais doenças da macieira. Em 2010, esse banco foi incorporado a Rede Vegetal da Embrapa, tendo sido retomadas as ações de conservação, caracterização, enriquecimento, documentação e manutenção desses materiais, visando a preservação e ampliação da variabilidade genética empregada no Programa

de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri (PMGME) e pesquisas associadas (DENARDI et al., 2011; FURLAN et al., 2010).

A Epagri é a principal detentora das cultivares nacionais de macieira lançadas no mercado. O Programa de Melhoramento Genético da Macieira foi implantado em 1973 nas cidades de Caçador e São Joaquim, inicialmente buscando cultivares adaptadas às condições ambientais do estado, com menor exigência de frio hibernal e resistente às doenças ocorrentes na região (DENARDI; HOUGH, 1987). Atualmente, o PMGME é o único programa de melhoramento em instituição pública destinado exclusivamente a espécie no país, tendo lançado cinco cultivares copa desenvolvidas a partir de mutações espontâneas e 16 desenvolvidas por meio de hibridações (DENARDI; KVITSCHAL; HAWERROTH, 2019; HAWERROTH; BRANCHER; KVITSCHAL, 2018).

Além de contribuir para a produção nacional, essas cultivares de macieira desenvolvidas em território brasileiro também tem ganhado espaço no cenário internacional. De acordo com a Secretaria de Estado da Agricultura e Pesca, do Governo de Santa Catarina, a cultivar SCS417 Monalisa vem sendo cultivada na Europa, e no início de 2019 a Epagri conquistou os direitos para o recolhimento de *royalties* sobre o cultivo e comercialização da cultivar em 27 países da União Europeia. Além da SCS417 Monalisa, segundo o *International Fruit Obtention* (IFO), as cultivares SCS425 Luiza, SCS426 Venice e SCS443 Isadora também despertaram interesse internacional.

Portanto, a caracterização dessa variabilidade genética e a diferenciação entre esses genótipos são etapas importantes, que contribuem para o estabelecimento de um programa de melhoramento genético, devido ao amplo conhecimento dos acessos armazenados em bancos de germoplasma e dos genótipos já existentes, além de auxiliar na proteção de cultivares, gerando informações que poderão subsidiar o recolhimento de *royalties*

2.3.1 CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO ENTRE CULTIVARES

O método tradicional de caracterização e diferenciação de cultivares copa tem sido a avaliação das características morfológicas e agronômicas (OLIVEIRA et al., 2017). Esses caracteres fenotípicos têm sido utilizados para esse fim desde o início do estudo da genética (FUKUDA; GUEVARA, 1998), sendo baseado em descritores

de características morfológicas e agronômicas, realizando comparações com cultivares padrão, avaliando diversos parâmetros das plantas e frutos (JACKSON, 2003).

A caracterização de cultivares copa de macieira, tem sido baseada na normativa publicada pela União Internacional para a Proteção de Novas Variedades de Plantas (*International Union for the Protection of New Varieties of Plants - UPOV*) (UPOV, 2005). No Brasil, o Sistema Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou uma instrução baseada nas diretrizes da UPOV, que traz os 57 descritores morfológicos e agronômicos empregados na diferenciação de cultivares copa de macieira, visando diferenciá-las das já existentes (MAPA, 2012).

Além dessa caracterização exigida para o registro nacional de novas cultivares, essa instrução normativa pode ser utilizada como base para estudos voltados à espécie, buscando a caracterização e diferenciação dos genótipos de interesse de uma determinada região ou desenvolvidas por um programa de melhoramento específico (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2004; GANOPOULOS *et al.*, 2018).

Entretanto, apenas o fenótipo pode não fornecer informações suficientes para a diferenciação efetiva entre genótipos. O efeito do ambiente pode mascarar ou gerar diferenças que podem ou não ser identificadas, além do fato de que, geralmente são utilizadas plantas apenas na fase adulta para a diferenciação, aumentando o tempo necessário para a caracterização um genótipo (BHAT *et al.*, 2010). As informações complementares necessárias, podem ser fornecidas pelo seu material genético, por meio do emprego de ferramentas da biotecnologia, visando a caracterização e diferenciação de cultivares à nível de DNA (BHAT *et al.*, 2010; MARIC *et al.*, 2010; REVERS; MACHADO, 2005).

Essas ferramentas podem complementar e auxiliar o melhoramento clássico, que é um processo laborioso e demorado (BROWN, 2012), como por exemplo, pelo uso de marcadores de DNA para a identificação e diferenciação de cultivares (REVERS *et al.*, 2013). O emprego dessas tecnologias pode reduzir o tempo necessário para a obtenção de genótipos superiores, dinamizando a seleção e proporcionando maior eficiência e agilidade ao processo de avaliação, além da garantia da identidade genética (KVITSCHAL *et al.*, 2013).

O uso de marcadores moleculares, à exemplo dos microssatélites, como uma ferramenta auxiliar e complementar, abre novas perspectivas no que diz respeito à caracterização e identificação dos genótipos. Esses marcadores vêm sendo utilizados por programas de melhoramento de espécies vegetais visando auxiliar estudos da variabilidade genética conservada em bancos de germoplasma e na proteção dos direitos dos melhoristas e empresas, fornecendo subsídios para a rastreabilidade de cultivares protegidas (AVIANI; SANTOS, 2011). Os marcadores de DNA não são influenciados pelo ambiente, seus resultados apresentam elevada repetibilidade e reprodutibilidade, fornecem um número significativo de polimorfismo, e são altamente informativos (MORGANTE; OLIVIERI, 1993).

Marcadores moleculares podem ser definidos como sequências de DNA identificáveis, que se encontram em regiões específicas do genoma e seguem um padrão de herança conhecido, podendo ser empregados em estudos de variabilidade genética (SEMAGN et al., 2006). Os marcadores microssatélites (SSR – *Simple Sequence Repeats*) são baseados na amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de regiões específicas do genoma utilizando *primers* específicos, que anelam nas regiões flangeadoras do microssatélite, o qual consiste em repetições de 1 a 6 nucleotídeos em sequência, sendo que os diferentes números dessas unidades de repetição possibilitam a identificação genotípica dos indivíduos de interesse (OLIVEIRA et al., 2005; ZANELLA et al., 2017).

O tamanho estimado do genoma da *M. domestica* é de 742,3 Mb, sendo encontrados aproximadamente 57.386 genes, responsáveis pela variação da morfologia e de características agrônômicas da espécie. Estima-se que 67% do DNA total seja composto por sequências repetitivas (VELASCO et al., 2010), e o alto polimorfismo dessas regiões, decorrente dessa variação do número de repetições das bases que compõem o microssatélite, pode ser utilizado para a identificação de cultivares. Isso pode ser feito a partir do uso de marcadores específicos para a espécie, possibilitando a genotipagem e permitindo o seu emprego em identificação genética, diferenciação de cultivares e análise de paternidade, por exemplo (PARIDA et al., 2009).

Em diversos países, os marcadores SSR têm sido empregados na identificação genotípica de genótipos, visando a caracterização do germoplasma dessas regiões. Essas informações, além de permitir estudos de variabilidade genética e serem uma base para programas de melhoramento genético da espécie,

contribuem para a conservação dos materiais e permitem a proteção de cultivares, contribuindo para o recebimento de *royalties* pela empresa detentora da patente/proteção (DAR et al., 2017; GANOPOULOS et al., 2018; GARKAVA-GUSTAVSSON et al., 2013; PEREIRA-LORENZO et al., 2018; SIKORSKAITE et al., 2012; URRESTARAZU et al., 2012).

A demanda de caracterização do perfil molecular de cultivares comerciais no Brasil tende a crescer nos próximos anos em decorrência da Lei de Proteção de Cultivares (Lei 9.456 de 25/04/1997), que atualmente utiliza apenas marcadores fenotípicos para a identificação. Vários laboratórios pertencentes à instituições públicas e privadas estão se estruturando para estarem aptas à realização dessas análises, que já são aceitas como informações complementares para a obtenção do Certificado de Proteção de Cultivares junto ao Sistema Nacional de Proteção de Cultivares/ MAPA (AVIANI; SANTOS, 2011).

Os marcadores SSR já vem sendo empregados em testes de genotipagem, visando a construção de bancos de dados e identificação de cultivares de macieira. A Embrapa Uva e Vinho deu início à genotipagem de cultivares comerciais de macieira adotando um conjunto padrão de seis microssatélites (CH03g07, CH04e03, CH05d11, CH05d11, CH05c02, Cho4g10 e CH05e03) e conforme avaliação três a quatro loci de marcadores SSR adicionais podem ser utilizados, visando elevar o grau de confiabilidade do teste (REVERS et al., 2013).

As cultivares desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri (PMGME) não possuem seus padrões moleculares conhecidos, sendo essa informação de interesse para os melhoristas da Epagri e para a comunidade que faz uso do material desenvolvido por essa instituição.

CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO FENOTÍPICA ENTRE CULTIVARES DE MACIEIRA DESENVOLVIDAS EM SANTA CATARINA

1 INTRODUÇÃO

A avaliação fenotípica tem sido a base para a caracterização e diferenciação de cultivares, tendo sido utilizado desde o início do estudo da genética. Essa avaliação baseia-se em características morfológicas e agronômicas expressas pelo genótipo de forma visual, com a avaliação por meio da visualização e medição de parâmetros da planta e dos frutos.

Os descritores morfoagronômicos são uma ferramenta empregada na distinção de cultivares. Para a macieira, o MAPA publicou uma instrução, estabelecendo diretrizes para um procedimento técnico que visa a comprovação de que a nova cultivar a ser lançada é distinta das já existentes, tenha um ciclo reprodutivo estável e que seja homogênea em suas características. Esses ensaios são conduzidos em um único local, avaliando-se 5 plantas para cultivares obtidas por hibridação, e 10 plantas se desenvolvidas a partir de mutações. Esses descritores englobam 57 caracteres qualitativos nominais, como formato e tonalidade da coloração superficial dos frutos, e ordinais, como altura dos frutos e comprimento das folhas, por exemplo (MAPA, 2012).

O Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri lançou até o momento 21 cultivares de macieira, sendo 5 advindas de mutações espontâneas e 16 desenvolvidas por meio de hibridações controladas. A diferenciação entre essas cultivares é algo essencial para o programa, e traz informações à comunidade científica, no que se refere ao desenvolvimento de genótipos de macieira no estado de Santa Catarina.

Portanto, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar e diferenciar as cultivares de macieira desenvolvidas pela Epagri, bem como verificar a efetividade do uso de descritores morfoagronômicos como único parâmetro de caracterização e diferenciação, além de identificar quais cultivares se destacam para os diferentes descritores contemplados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Foi realizada a caracterização fenotípica de 23 genótipos de *Malus x domestica* Borkh., sendo 21 cultivares lançadas pelo Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri (PMGME) e duas cultivares padrão tradicionais amplamente plantadas no Brasil (Tabela 1).

Tabela 1 – Genótipos de macieira avaliados, englobando 21 cultivares lançadas pelo Programa de Melhoramento Genético da Epagri e duas cultivares padrão.

Denominação	Nome simplificado	Ano de registro	Principal característica de interesse
Epagri 405 (Fuji Suprema)	Fuji Suprema	1997 ^a	Cor da epiderme
Epagri 407 Lisgala	Lisgala	1997 ^a	Cor da epiderme, sem estrias
Castel Gala	Castel Gala	2005 ^a	Precocidade da colheita
SCS413 Fuji Precoce	Fuji Precoce	2009 ^a	Precocidade da colheita, em relação à Fuji <i>standard</i>
SCS441 Gala Gui	Gala Gui	2019 ^b	Resistente à mancha
Primícia	Primícia	1986 ^a	Sabor ácido e precocidade da colheita
Princesa	Princesa	1986 ^a	Resistente à mancha e precocidade da colheita
Epagri 402 (Catarina)	Catarina	1996 ^a	Boa arquitetura de plantas
Epagri 403 (Fred Hough)	Fred Hough	1994 ^a	Sabor doce
Epagri 404 (Imperatriz)	Imperatriz	2000 ^a	Frutos atraentes
Epagri 406 (Baronesa)	Baronesa	1997 ^a	Resistente à doenças
Epagri 408 (Condessa)	Condessa	1998 ^a	Precocidade da colheita
Epagri 409 (Duquesa)	Duquesa	1998 ^a	Resistente à sarna e precocidade da colheita
Daiane	Daiane	1998 ^a	Colheita diferenciada (entre Gala e Fuji)
Joaquina	Joaquina	2003 ^a	Resistente à sarna
SCS416 Kinkas	Kinkas	2009 ^a	Alta fixação pós-maturação
SCS417 Monalisa	Monalisa	2009 ^a	Resistente à sarna e à macha
SCS425 Luiza	Luiza	2015 ^a	Frutos atraentes
SCS426 Venice	Venice	2015 ^a	Colheita diferenciada (entre Gala e Fuji)
SCS427 Elenise	Elenise	2015 ^a	Colheita tardia
SCS 443 Isadora	Isadora	2021	Longa conservação
Fuji <i>standard</i>	Fuji <i>standard</i>		
Royal Gala	Royal Gala		

^a DENARDI; KVITSCHAL; HAWERRORH, 2019. FONTE: a autora, 2021.

O pomar onde as plantas vêm sendo conduzidas encontra-se na Estação Experimental da Epagri de Caçador (EECd), localizada na região meio-oeste de Santa Catarina, à latitude 26°49'07" Sul, longitude 50°59'25" Oeste e altitude média de 940 m acima do nível do mar, tendo uma média de acúmulo de frio hibernal ($<7,2^{\circ}\text{C}$) de aproximadamente 510,09 horas ano⁻¹ (Epagri/Ciram, 2019), com uma variação entre 360 e 900 horas ano⁻¹ (PETRI, 2006).

2.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

Para a caracterização das cultivares de acordo com a avaliação fenotípica foi adotada a tabela de descritores morfoagronômicos da macieira, proposta pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicada nas "Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de macieira (*Malus x domestica* Borkh.)" (MAPA, 2012). De acordo com essa instrução, são atribuídos códigos para cada uma das 57 características que descrevem o fenótipo (Anexo A).

As avaliações foram realizadas durante o ciclo de cultivo 2018/2019. Para os caracteres referentes à planta, ramo de um ano, lâmina foliar, pecíolo, flor e fruto jovem, foram avaliadas 10 plantas de cada genótipo, constituindo 10 repetições, e as avaliações foram realizadas à campo, obedecendo a instrução publicada pelo MAPA. Já para as características de fruto, foram selecionados aleatoriamente 10 frutos de cada genótipo no total, que foram avaliados individualmente após um período de armazenamento em câmara fria ($\approx 4^{\circ}\text{C}$) de aproximadamente 15 dias.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A matriz de dissimilaridade foi obtida com base no algoritmo de Gower (1971), visto que permite uma análise simultânea de características quantitativas, qualitativas nominais e qualitativas ordinais, gerando uma única matriz de distâncias com valores compreendidos entre 0 e 1, e calculando a dissimilaridade entre duas cultivares.

Com base nas distâncias genéticas geradas, o agrupamento das cultivares foi obtido pelo método Ward, para encontrar quais cultivares se assemelham por meio de um dendrograma, validado pelo coeficiente de correlação cofenético. Todas as

análises foram realizadas por meio do software R (<http://www.r-project.org/>), utilizando os pacotes “circlize” e “cluster”.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O algoritmo de Gower (1971) foi empregado no cálculo de divergência genética entre cultivares de diversas espécies, como pimenta (MOURA et al., 2010), tomate cereja (ROCHA et al., 2010), mamão (QUINTAL et al., 2012), maracujá (MACHADO et al., 2015), braquiária (TORRES et al., 2015), capim elefante (VIDAL et al., 2018) e soja (PERINI et al., 2018).

As 23 cultivares avaliadas apresentaram uma dissimilaridade média de 0,3785, ou seja, o conjunto foi dissimilar em 37,85% das possíveis classes das variáveis multicategóricas. As maiores e menores distâncias encontradas estão listadas na Tabela 2, bem como quantas características divergiram entre os pares de cultivares.

Tabela 2 – Maiores e menores valores de dissimilaridade fenotípica, entre as 23 cultivares avaliadas, considerando os 57 caracteres morfoagronômicos multicategóricos.

Dissimilaridade	Cultivares	Número de características distintas
0,5751	Fuji Suprema e Luiza	44
0,5482	Fuji Suprema e Princesa	45
0,5184	Fuji Suprema e Elenise	37
0,5073	Fuji <i>standard</i> e Gala Gui	42
0,5026	Fuji <i>standard</i> e Princesa	40
0,5015	Fuji Suprema e Gala Gui	40
0,4997	Royal Gala e Condessa	39
0,4944	Fuji <i>standard</i> e Luiza	42
0,2518	Baronesa e Elenise	26
0,2424	Baronesa e Kinkas	18
0,2339	Fuji Suprema e Fuji <i>standard</i>	22
0,2193	Baronesa e Venice	24
0,2187	Venice e Isadora	24
0,2167	Venice e Kinkas	20
0,1915	Catarina e Kinkas	20

FONTE: a autora, 2021.

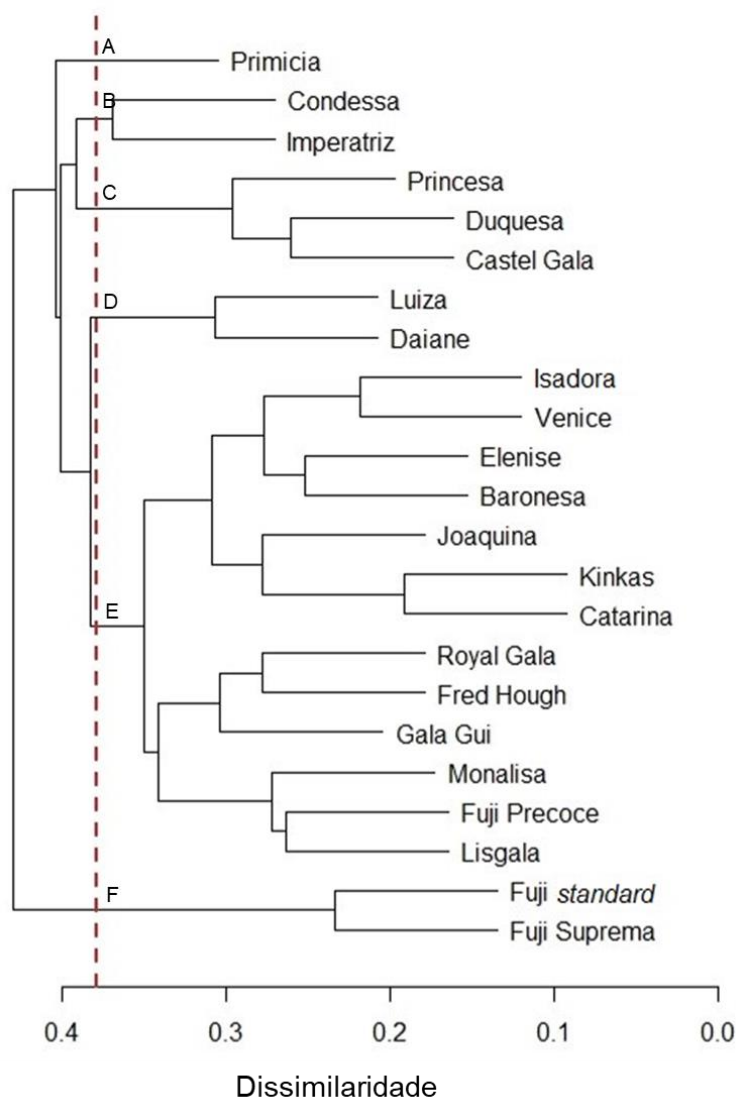
As cultivares que mais se distinguiram foram Fuji Suprema e Luiza, e Fuji Suprema e Princesa, com 44 e 45 características distintas, respectivamente, como por exemplo, extensão da coloração antocianínica dos frutos jovens, coloração de fundo dos frutos, número de lenticelas nos frutos, entre outras.

A dissimilaridade média entre as cultivares Fuji Suprema e Fuji *standard* foi baixa (0,2339), conforme o esperado, visto que Fuji Suprema é uma cultivar desenvolvida a partir de uma mutação de Fuji *standard*. As cultivares Catarina e Kinkas também apresentaram uma baixa dissimilaridade (0,1915), conforme o esperado, visto que são irmãs.

A cultivar que apresentou a maior dissimilaridade média foi a Fuji Suprema (0,4179), evidenciando que é àquela que apresenta mais diferenças fenotípicas quando comparada às demais cultivares.

Baseando-se na matriz de distâncias genéticas, gerada pelo algoritmo de Gower, foi realizado o agrupamento pelo método Ward, resultando na formação de seis grupos, tendo como base a dissimilaridade média (Figura 1).

Figura 1 – Dendrograma da dissimilaridade fenotípica entre 23 cultivares de macieira obtido pelo método de Ward, com base no algoritmo de Gower. O ponto de corte na distância 0,37 foi obtido pelo cálculo da dissimilaridade média, gerando a formação de seis grupos.



Dos seis grupos formados, o grupo A foi composto por apenas uma cultivar (Primícia) que apresentou dissimilaridade média de 0,3890. Três grupos (B, D e F) englobaram duas cultivares, sendo eles, Condessa e Imperatriz, Luiza e Daiane e Fuji *standard* e Fuji Suprema, que apresentaram dissimilaridades entre si de 0,3064, 0,3064 e 0,2339, respectivamente. Os grupos B e C incluem as cultivares mais precoces e de menor requerimento de frio (Condessa, Princesa, Duquesa, Castel Gala, Imperatriz), ou seja, os caracteres referentes à brotação e maturação contribuíram para agrupá-las.

Um grande grupo (E) formou-se englobando as 13 cultivares restantes que foram analisadas. Isso mostra que 57% são semelhantes, evidenciando o fato de que

o melhoramento genético reduz a variabilidade genética, por priorizar características de interesse agrônomo e comercial, durante o desenvolvimento de uma nova cultivar. Um subgrupo do grupo E reuniu Venice, Baronesa, Kinkas e Catarina, sendo todas descendentes de Fuji nas suas ancestralidades, o que justifica suas semelhanças. No outro subgrupo do grupo E observa-se uma separação também dos clones coloridos de Gala, agregando ainda Monalisa, Fred Hough e Fuji Precoce, portanto, os caracteres de frutos e de épocas de brotação e maturação também contribuíram nesse agrupamento.

O coeficiente de correlação cofenética foi de 0,7561, evidenciando que o agrupamento utilizado foi consistente. Este valor é calculado com base na matriz de distâncias gerada pelo algoritmo de Gower e a matriz cofenética obtida a partir do dendrograma.

Nenhuma característica específica pôde ser destacada como diferenciadora entre as cultivares analisadas. Entretanto, alguns caracteres podem ser destacados. Para as características tipos de planta (PLT) e habito de crescimento (PLH), todas as cultivares foram classificadas como ramificado e aberto, respectivamente. Quanto a época de início de floração (EIF), as cultivares foram separadas em três classes, sendo elas, Castel Gala, Princesa, Condessa e Duquesa, com início da floração precoce, Primícia, Imperatriz, Monalisa, Luiza, Venice e Royal Gala, com início da floração média, e o restante das cultivares com início da floração tardia. Para o caráter época de maturação para o consumo (EM) formaram-se seis grupos, sendo eles: muito precoce a precoce, precoce, intermediária, intermediária a tardia, tardia e tardia a muito tardia.

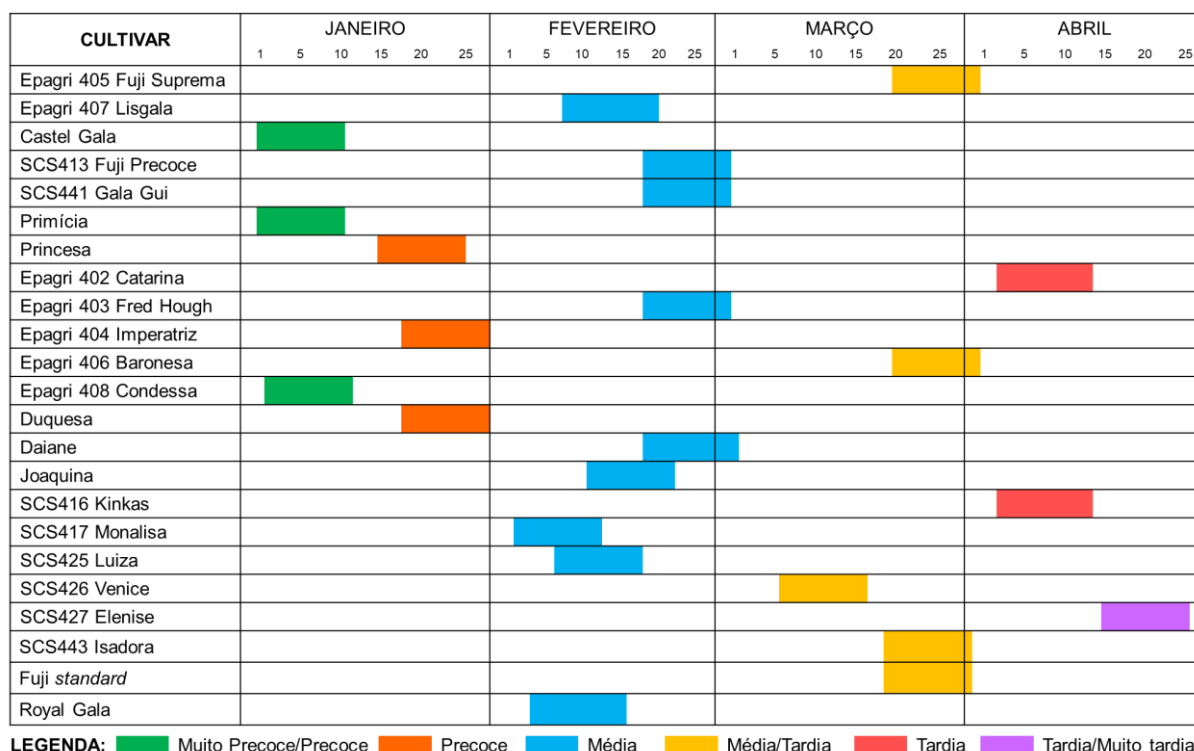
Para as características que englobam os frutos, no que diz respeito a forma geral, as cultivares Lisgala, Castel Gala, Princesa, Fred Hough, Condessa, Duquesa, Luiza, Elenise e Royal Gala possuem formato cônico, Imperatriz e Daiane, formato cilíndrico, Primícia, Catarina, Baronesa, Kinkas, Monalisa, Venice e Isadora, formato globoso, e Fuji Suprema, Fuji Precoce, Joaquina e Fuji *standard*, formato oblóide. Quanto as demais características de frutos propostas como agrupadoras, foram formados cinco, quatro e cinco grupos para área relativa, tonalidade e distribuição da coloração superficial, respectivamente.

À campo, algumas cultivares apresentaram características distintas das demais, que podem ser utilizadas como caráter inicial para diferenciá-las. A cultivar Condessa possui folhas grandes, quanto ao tamanho. Joaquina e Venice possuem

folhas crenadas (1), enquanto que Kinkas, Elenise e Isadora, folhas bisserilhadas (5). Quanto a características de flores, Primícia e Venice possuem os estigmas acima das anteras (3). Na caracterização dos frutos, as maçãs Imperatriz e Daiane foram classificadas como frutos com formato cilíndrico (4). Lisgala apresenta frutos com coloração uniforme e sem estrias (1). E a cultivar Fuji Suprema, que apresenta frutos jovens com grande extensão da coloração antocianínica (9) e um alto número de lenticelas nos ramos (7).

Também pôde-se observar que as cultivares desenvolvidas pelo PMGME, podem ser adotadas em um sistema de cultivo que busca o escalonamento da colheita (Figura 2), visando a otimização do uso da mão de obra, visto que, no Brasil, ainda é utilizado o sistema de colheita exclusivamente manual.

Figura 2 - Época de maturação de 23 cultivares de macieira avaliados, conforme a data da colheita, na safra 2018/2019.



Percebe-se que o grupo de cultivares avaliado é fenotipicamente semelhante, visto que todos foram desenvolvidos e lançados por um mesmo programa de melhoramento, reduzindo a base genética e restringindo a seleção à características buscadas pelos pesquisadores, além da presença de cultivares aparentadas.

Entretanto, deve-se ter em mente que, na normativa que guia a descrição fenotípica das cultivares, a maioria das cultivares padrão não são plantadas no Brasil, tendo caracteres que podem ser distintos a nossa realidade, além do desenvolvimento dessa lista em outro país, tendo um comportamento fenotípico diferente ao expresso no Brasil. Com isso, a avaliação seguindo essas diretrizes pode ser inconsistente, visto que algumas características que diferenciam as cultivares podem não ser contempladas, fazendo com que a diferenciação fique restrita apenas aos 57 descritores.

Esses descritores baseados no fenótipo sofrem grande influência do ambiente na expressão fenotípica de diversos descritores, além da subjetividade do avaliador, que pode implicar em pequenas divergências de classes em um descritor para uma mesma cultivar em questão. Isso dificulta tanto análises de estimativas de dissimilaridade entre genótipos quanto na identificação de identidade genética de cultivares unicamente pela checagem dos dados de descritores da cultivar.

Uma alternativa para a diferenciação de cultivares seria a caracterização e diferenciação por meio de marcadores de DNA, sendo que as diferenças são detectadas na sequência de bases nitrogenadas, não sofrendo alterações por causas ambientais.

4. CONCLUSÃO

As cultivares avaliadas são similares entre si, o que pode ser explicado pela presença de indivíduos aparentados, tanto irmãos e meio irmãos, como parentais, reduzindo a variabilidade entre os genótipos. Além disso, dentre os caracteres avaliados não foram consideradas as características adotadas como critério de seleção no programa de melhoramento, como a resistência a doenças, requerimento em frio e tempo de conservação dos frutos em câmara fria.

A caracterização com base no fenótipo é essencial, permitindo a distinção entre cultivares quando avaliadas isoladamente, entretanto, nenhuma característica foi apontada como diferenciadora, podendo ser usada como parâmetro principal para a diferenciação das cultivares.

Uma alternativa para a diferenciação entre as cultivares, seria a caracterização utilizando marcadores de DNA, avaliando as diferenças moleculares, visando a certificação da cultivar e a garantia da sua fidelidade genética.

CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR ENTRE CULTIVARES DE MACIEIRA DESENVOLVIDAS EM SANTA CATARINA

1 INTRODUÇÃO

A diferenciação entre cultivares, utilizando apenas descritores fenotípicos, pode não ser suficiente, trazendo também a problemática do efeito ambiental, que mascara ou gera diferenças que são identificadas ou não. As informações complementares a fenotipagem, podem ser fornecidas pelo material genético, por meio do emprego de ferramentas da biotecnologia.

O melhoramento da macieira, se encaixa nesse cenário, onde essas ferramentas podem complementar e auxiliar o melhoramento, como por exemplo, o uso de marcadores de DNA para a identificação e diferenciação de cultivares. Em diversos países, estes marcadores, à exemplo dos microssatélites, tem sido empregados na identificação genotípica de cultivares, visando a caracterização do germoplasma dessas regiões. Essas informações, além de permitir estudos de variabilidade genética como base para programas de melhoramento genético da espécie, contribuem para a conservação dos genótipos e permitem a proteção de cultivares, garantindo o recebimento de *royalties* pela empresa detentora da patente/proteção.

As cultivares desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri (PMGME) ainda não haviam sido alvo desses estudos, visando a caracterização e diferenciação genotípica, portanto, não apresentam seus padrões moleculares conhecidos, sendo essa, uma informação de interesse aos melhoristas e a comunidade que faz uso do material desenvolvido pela Epagri.

Portanto, o presente trabalho teve por objetivo, a caracterização e diferenciação molecular das cultivares de macieira desenvolvidas pelo PMGME, além da avaliação da efetividade do uso dessa metodologia para a diferenciação de cultivares advindas de mutações ou de hibridações.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DE DNA

Foram coletadas folhas de macieira, dos 23 genótipos avaliados (Tabela 3), no pomar da Estação Experimental da Epagri de Caçador (EECd) – SC. Os genótipos foram classificados em duas categorias, conforme o seu método de melhoramento, sendo eles: genótipos obtidos a partir de mutações espontâneas, que foram selecionadas e conduzidas até a obtenção de um genótipo estável (clone mutante), e genótipos desenvolvidos por meio de hibridações entre parentais contrastantes (híbridos).

Tabela 3 – Cultivares de macieira desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento Genético de Macieira da Epagri e suas respectivas origens ou genealogias.

CULTIVAR	DENOMINAÇÃO SIMPLIFICADA	ORIGEM / PARENTAIS (♀ x ♂)
Epagri 405 Fuji Suprema	Fuji Suprema	Mutação de Fuji para melhor cor de epiderme ^a
Epagri 407 Lisgala	Lisgala	Mutação de Gala para melhor cor de epiderme, sem estrias ^a
Castel Gala	Castel Gala	Mutação de Gala para precocidade de colheita ^a
SCS413 Fuji Precoce	Fuji Precoce	Mutação de Fuji para precocidade de colheita ^a
SCS441 Gala Gui	Gala Gui	Mutação de Star Gala para resistência à macha foliar ^b
Primícia	Primícia	D1R101T117 x D1R103T245 ^c
Princesa	Princesa	NJ-56 x Anna ^c
Epagri 402 Catarina	Catarina	Fuji x PW37T133 ^c
Epagri 403 Fred Hough	Fred Hough	NJ-76 x Coop-14 ^c
Epagri 404 Imperatriz	Imperatriz	Mollie's Delicious x Gala ^c
Epagri 406 Baronesa	Baronesa	Fuji x Princesa ^c
Epagri 408 Condessa	Condessa	Gala x M-41 ^c
Epagri 409 Duquesa	Duquesa	Anna x D1R100T147 ^c
Daiane	Daiane	Gala x Princesa ^c
Joaquina	Joaquina	NJ-76 x Coop-14 ^c
SCS416 Kinkas	Kinkas	Fuji x PW37T133 ^c
SCS417 Monalisa	Monalisa	Gala x Malus 4 ^c
SCS425 Luiza	Luiza	Epagri 404 Imperatriz x Cripps Pink ^c
SCS426 Venice	Venice	Epagri 404 Imperatriz x Epagri 406 Baronesa ^c
SCS427 Elenise	Elenise	Epagri 404 Imperatriz x CrippsPink ^c
M-10/09	M-10/09	Epagri 404 Imperatriz x CrippsPink ^a
Fuji <i>standard</i>	Fuji <i>standard</i>	Red Delicious x Ralls Janet
Royal Gala	Royal Gala	Mutação de Gala <i>standard</i> (Golden Del. x Kidd's Orange)

^a HAWERROTH; BRANCHER; KVITSCHAL, 2018; ^b FAORO, 2019; ^c DENARDI; KVITSCHAL; HAWERROTH, 2019.

FONTE: a autora, 2021.

Realizaram-se duas coletas, a primeira procedeu-se no ciclo de cultivo 2017/2018, onde as folhas foram acondicionadas em sacos plásticos, e colocadas imediatamente dentro de caixas de isopor entre bags de gelo, com temperatura

aproximada de -20°C . Em seguida, o material vegetal foi armazenado em freezer (-20°C) até o momento da extração de DNA. A segunda coleta foi realizada no ciclo produtivo 2018/2019, onde, foram acondicionadas duas folhas de cada planta em tubos "Falcon" de 50 mL, sendo imediatamente preenchidos com sílica gel (4 - 8 mm). Após a coleta, a sílica foi substituída a cada dois dias, por duas vezes, e em seguida as amostras foram mantidas à temperatura ambiente ($\cong 23^{\circ}\text{C}$) até o momento de extração do DNA, cerca de sete dias após a coleta. As duas coletas constituíram duas replicatas biológicas que foram realizadas visando a maior confiabilidade da genotipagem a ser realizada nas etapas posteriores.

Para a extração de DNA, foi empregado o protocolo CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio) 2%, desenvolvido por Doyle e Doyle (1990), com adaptações para a espécie e condições do laboratório. Aproximadamente 200 mg de tecido fresco (50 mg se tecido seco), foram acondicionadas em um tubo de alta resistência, com cinco esferas metálicas em seu interior, e em seguida acrescentado 1 mL por amostra do tampão de extração Brometo de Cetil Trimetil Amônio - CTAB a 2% (NaCl a 1,4 M; EDTA a 20 mM; Tris-HCl (pH 8,0) a 100 mM; PVP-40 a 2%) com 5 μL de β -mercaptoetanol, aquecido a 60°C . Na sequência, os tubos foram colocados no equipamento Precellys®, e o tecido foliar foi macerado utilizando a programação de 8000 rpm por 20 seg, cujo procedimento foi repetido seis vezes, com intervalos de 10 seg. Após a maceração, os tubos foram mantidos em banho-maria à 60°C por 30 min, realizando a homogeneização por inversão a cada 10 min.

Foram acrescentados 500 μL de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 (CIA) em cada tubo, e homogeneizados em mesa agitadora por 5 min a 150 rpm. Em seguida, centrifugou-se a 11500 rpm por 7 min. Após a separação das partes orgânica e aquosa, foram transferidos 800 μL do líquido sobrenadante para um tubo novo de 2 mL, e acrescentados 500 μL de CIA e 200 μL de acetato de potássio (5M) em cada tubo, os quais foram homogeneizados em mesa agitadora por 5 min a 130 rpm, e acondicionadas por 20 minutos a -20°C . Após foi realizada uma nova centrifugação a 12500 rpm por 5 min.

Foram transferidos para um tubo novo (de 1,5 mL) 750 μL do líquido sobrenadante, e adicionados 600 μL CIA (24:1), agitado em mesa agitadora por 5 min a 130 rpm e centrifugado a 12500 rpm por 5 minutos. Procedeu-se com o processo de lavagem novamente transferindo para um tubo novo de 1,5 mL, 700 μL do líquido

sobrenadante, e adicionados 600 μL CIA (24:1), agitado em mesa agitadora por 5 min a 130 rpm e centrifugado a 12500 rpm por 5 minutos

Após esta etapa foram transferidos para um tubo novo (de 1,5 mL) 500 μL do líquido, e adicionados 500 μL de álcool isopropílico ($\cong -20^\circ\text{C}$) e agitado em mesa agitadora por 5 min a 120 rpm, e mantido por aproximadamente 12 horas à -20°C . Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 12500 rpm por 5 min, e o álcool isopropílico foi descartado cuidadosamente. Foi acrescentado 500 μL de etanol a 70% ($\cong -20^\circ\text{C}$), agitado por 5 min a 120 rpm, centrifugado a 12500 rpm por 5 min. O etanol 70% foi descartado, e foram adicionados 500 μL de etanol 96% ($\cong -20^\circ\text{C}$), agitado por 5 min a 120 rpm, centrifugado a 12500 rpm por 5 min. Após o descarte do etanol 96%, os tubos foram mantidos abertos e virados sobre papel absorvente para a secagem do precipitado por aproximadamente 30 minutos. Para finalizar o processo, foi adicionado 100 μL de TE+RNAse (TE [10nM], RNAse [10 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$]), e incubados a 36°C por 30 min. Em seguida, as amostras foram deixadas por aproximadamente 12 horas na geladeira ($\cong 4^\circ\text{C}$), e finalmente armazenadas a -20°C até o momento de uso.

Após extração as amostras foram mensuradas quanto a concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) e os parâmetros de qualidade A260/A280 e A260/A230 utilizando espectrofotômetro NanodropOne® (Thermo Scientific). As amostras foram diluídas para a concentração padrão de 10 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$.

2.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Foram realizadas reações multiplex, utilizando um total de 19 pares de iniciadores SSR desenvolvidos para *Malus x domestica* Borkh., otimizados em oito painéis multiplex (Tabela 4) de acordo com a cor do fluoróforo, o tamanho do fragmento amplificado e as condições da PCR.

Tabela 4 – Iniciadores microssatélites, empregados para a genotipagem das cultivares de macieira (*Malus x domestica* Borkh.), e as suas respectivas sequências *forward* e *reverse*, sentido 5'-3', e unidades de repetição (UR). Foram organizados oito painéis multiplex (M) de acordo com a cor do fluoróforo (*Dye*) e o tamanho do fragmento amplificado (*Range*), em pares de bases (pb).

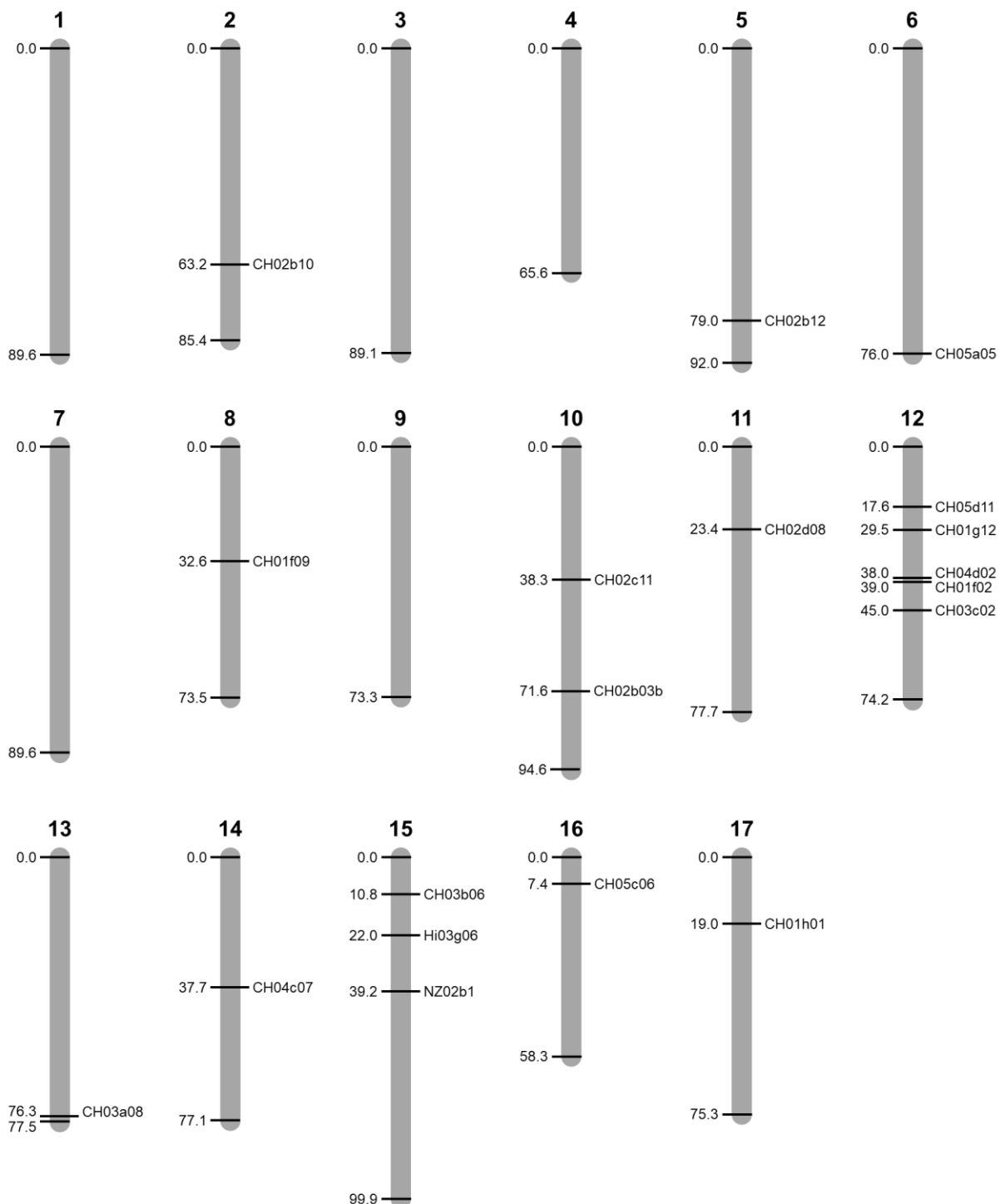
M	Loco SSR	Sequência <i>Forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>	Unidade de repetição	Dye	Range (pb)
A	CH04d02 ^a	CGTACGCTGCTTCTTTTGTCT	CTATCCACCACCCGTCAACT	(TC) ₁₉	6-FAM	118-146
	CH03a08 ^a	TTGGTTTGCTAGGAAAAGAAGG	AAGTTTATCGGGCCTACACG	(CT) ₁₉	HEX	146-218
	CH01f02 ^a	ACCACATTAGAGCAGTTGAGG	CTGGTTTGTTTTCTCCAGC	(AG) ₂₂	NED	174-206
B	CH01g12 ^a	CCCACCAATCAAAAATCACC	TGAAGTATGGTGGTGCCTTC	(AG) ₂₂	6-FAM	174-206
	CH01h01 ^a	GAAAGACTTGCACTGGGAGC	GGAGTGGGTTTGAGAAGGTT	(TC) ₂₅	HEX	114-134
	CH02c11 ^a	TGAAGGCAATCACTCTGTGC	TTCCGAGAATCCTCTTCGAC	(CT) ₁₅ CC(CT) ₈	NED	219-239
C	Hi03g06 ^b	TGCCAATACTCCCTCATTACC	GTTTAAACAGAAGTGCACCACATCC	(TC) ₇	6-FAM	182-204
	CH03b06 ^a	GCATCCTTGAATGAGGTTCACT	CCAATCACCAAATCAATGTACAC	(CT) ₂₀	HEX	111-131
	CH02d08 ^a	TCCAAAATGGCGTACCTCTC	GCAGACACTCACTCACTATCTCTC	(GA) ₂₀	VIC	210-254
D	CH05d11 ^a	CACAACCTGATATCCGGGAC	GAGAAGGTCGTACATTCTCAA	(AG) ₂₂	6-FAM	171-211
	CH02b03b ^a	ATAAGGATACAAAAACCCTACACAG	GACATGTTTGGTTGAAAAGTTG	(CT) ₂₂	HEX	77-109
	NZ02b1 ^c	CCGTGATGACAAAGTGCATGA	ATGAGTTTGTATGCCCTTGGGA	(GA) ₁₄	HEX	212-238
E	CH01f09 ^a	ATGTACATCAAAGTGTGGATTG	GGCGCTTTCCAACACATC	(AG) ₂₂	HEX	125-160
F	CH02b12 ^a	GGCAGGCTTTACGATTATGC	CCCCTAAAAGTTCACAGGC	(CT) ₂₁ TT(TC) ₅	6-FAM	101-143
	CH03c02 ^a	TCACTATTTACGGGATCAAGCA	GTGCAGAGTCTTTGACAAGGC	(CT) ₂₂	HEX	116-136
G	CH04c07 ^a	GGCCTTCCATGTCTCAGAAG	CCTCATGCCCTCCAATAACA	(AG) ₂₃	6-FAM	98-135
	CH05c06 ^a	ATTGGAAGTCTCCGTATTGTGC	ATCAACAGTAGTGGTAGCCGGT	(CT) ₆ CA(CT) ₂₀	HEX	104-126
H	CH02b10 ^a	CAAGGAAATCATCAAAGATTCAAG	CAAGTGGCTTCGGATAGTTG	(CT) ₁₉	6-FAM	121-159
	CH05a05 ^a	TGTATCAGTGGTTTGCATGAAC	GCAACTCCCAACTCTTCTTTCT	(GA) ₂₁	HEX	198-230

^a LIEBHARD *et al.*, 2002; ^b SILFVERBERG-DILWORTH *et al.*, 2006; ^c GUILFORD *et al.*, 1997.

FONTE: a autora, 2021.

Os iniciadores SSR foram selecionados tendo como base em dois trabalhos. Hawerth *et al.* (2018) realizaram testes práticos com algumas das cultivares avaliadas e foram selecionados os cinco iniciadores mais polimórficos, sendo eles, CH01f02, CH02c11, CH02d08, CH05d11 e CH04c07. Os demais iniciadores foram retirados do trabalho desenvolvido por Klabunde *et al.* (2016). Foram englobados 12 dos 17 cromossomos da macieira (Figura 3).

Figura 3. – Mapa genético da macieira, com a localização dos 19 pares de iniciadores SSR empregados neste trabalho, bem como a sua posição em cada cromossomo (cM). O mapa foi construído com base no banco de dados disponibilizado em www.rosaceae.org/search/markers.



FONTE: a autora, 2021.

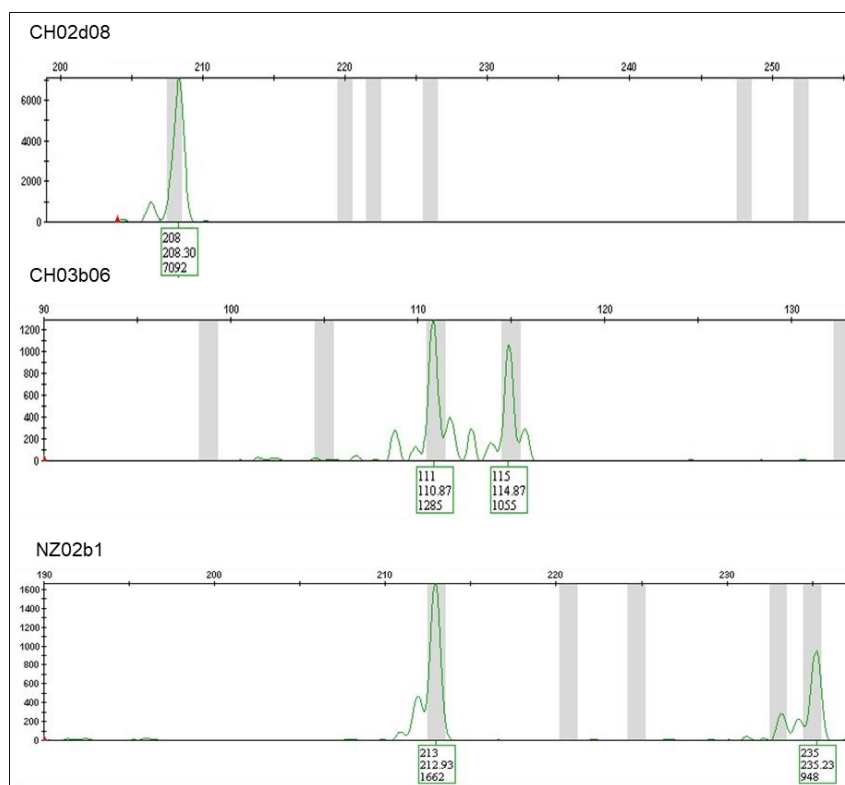
Cada reação foi composta por 1,2 ng de DNA genômico, 0,2 μ M de cada iniciador, 0,2 μ M de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, tampão (1x), 1 U de Platinum® Taq

DNA Polimerase (Invitrogen), e água ultrapura completando o volume final de 12,5 µL. As reações foram realizadas em um termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), com as seguintes condições de ciclagem: (I) desnaturação inicial: 94°C por 5 min; (II) desnaturação: 94°C por 45 seg; (III) anelamento: 60°C por 60 seg; (IV) extensão: 72°C por 60 seg; e (V) extensão final: 72°C por 7 min. Os passos II, III e IV foram realizados por 28 ciclos para os painéis A, B, C, D, F e G; 30 ciclos para o painel E; e 31 ciclos para o painel H.

2.3 ELETROFORESE CAPILAR

Para a análise dos produtos de amplificação foi utilizado o Sequenciador Automático ABI 3130 (Applied Biosystems), alimentado com reações contendo 1,0 µL de produto amplificado na PCR, 4,85 µL de formamida HI-DI™ (Applied Biosystems) e 0,15 µL de GS600 LIZ® (Applied Biosystems). Os eletroforegramas foram interpretados por meio do software GeneMapper® Id-x, v. 1.2, conforme exemplificado na Figura 4.

Figura 4 – Exemplificação da genotipagem (tamanho de alelos em pb) da cultivar Fuji Suprema com 3 marcadores microssatélites (CH02d08, CH03b06 e NZ02b1), por meio do software GeneMapper® Id-x v. 1.2. Os dados são apresentados em uma sequência de 3 números, sendo o primeiro o nome do alelo, o segundo, o tamanho do alelo e o terceiro, o tamanho do pico de amplificação em *rfu* (*relative fluorescence unit*).



FONTE: elaborado pela autora, 2019.

Além dos 23 genótipos estudados, foram genotipados 4 parentais como testemunhas, Cripps Pink, D1R103T245, NJ76 e Coop 14, visando o auxílio e garantia da genotipagem pelo operador. Os genótipos são mantidos no Banco de Germoplasma de Macieira da Epagri em Caçador/SC.

2.4 ANÁLISE DOS DADOS

Foi realizada uma avaliação por comparação entre cada um dos genótipos, para a verificação da efetividade dos marcadores microssatélites em diferenciar as cultivares. Verificou-se a capacidade de diferenciação entre os genótipos obtidos a partir de mutações, sendo Fuji Suprema e Fuji Precoce (mutações espontâneas de 'Fuji'), e Lisgala e Castel Gala (mutações espontâneas de 'Gala') e Gala Gui (mutação espontânea de Star Gala, que pé uma mutação de Royal Gala). Também foi avaliada

a capacidade dos marcadores microssatélites em diferenciar as cultivares obtidas por meio de hibridações, sendo elas, Primícia, Princesa, Catarina, Fred Hough, Imperatriz, Baronesa, Condessa, Duquesa, Daiane, Joaquina, Kinkas, Monalisa, Luiza, Venice, Elenise e Isadora.

Foi construído um dendrograma com base em uma matriz, englobando todos os marcadores SSR, onde um (1) indica a presença do alelo, e zero (0), a ausência. Os dados binários foram utilizados para o cálculo do índice de similaridade de Jaccard, e a matriz de similaridade obtida foi processada pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) para a construção do dendrograma (CAVANNA *et al.*, 2008). Foi utilizado o software “R” v. 3.6.1, pacote “

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível a determinação do padrão molecular das cultivares analisadas (Tabela 5). As duplicatas de cada cultivar apresentaram os mesmos alelos, comprovando a reprodutibilidade da caracterização molecular com o uso de marcadores microssatélites.

Tabela 5 – Caracterização molecular de genótipos de macieira desenvolvidas pela Epagri, sendo duas cultivares padrão, quatro parentais, cinco mutantes e 16 híbridos (continua).

SSR	Fuji Standart	Fuji Suprema	Fuji Precoce	Royal Gala	Lisgala	Castel Gala	Gala Gui
CH01f02	182 : 182	182 : 182	182 : 182	168 : 204	168 : 204	168 : 204	168 : 204
CH01f09	126 : 136	126 : 136	126 : 136	126 : 136	126 : 136	126 : 136	126 : 136
CH01g12	103 : 143	103 : 143	103 : 143	139 : 143	139 : 143	139 : 143	139 : 143
CH01h01	113 : 113	113 : 113	113 : 113	115 : 127	115 : 127	115 : 127	115 : 127
CH02b03b	072 : 102	072 : 102	072 : 102	068 : 072	068 : 072	068 : 072	068 : 072
CH02b10	125 : 127	125 : 127	125 : 127	119 : 125	119 : 125	119 : 125	119 : 125
CH02b12	135 : 135	135 : 135	135 : 135	123 : 135	123 : 135	123 : 135	123 : 135
CH02c11	225 : 229	225 : 229	225 : 229	213 : 229	213 : 229	213 : 229	213 : 229
CH02d08	208 : 208	208 : 208	208 : 208	222 : 252	222 : 252	222 : 252	222 : 252
CH03a08	180 : 180	180 : 180	180 : 180	186 : 214	186 : 214	186 : 214	186 : 214
CH03b06	111 : 115	111 : 115	111 : 115	115 : 133	115 : 133	115 : 133	115 : 115
CH03c02	121 : 157	121 : 157	121 : 157	121 : 123	121 : 123	121 : 123	121 : 123
CH04c07	104 : 116	104 : 116	104 : 116	092 : 132	092 : 132	092 : 132	092 : 132
CH04d02	115 : 117	115 : 117	115 : 117	117 : 129	117 : 129	117 : 129	117 : 129
CH05a05	214 : 218	214 : 218	214 : 218	218 : 218	218 : 218	218 : 218	218 : 218
CH05c06	097 : 111	097 : 111	097 : 111	111 : 119	111 : 119	111 : 119	111 : 119
CH05d11	168 : 192	168 : 192	168 : 192	168 : 168	168 : 168	168 : 168	168 : 168
Hi03g06	190 : 190	190 : 190	190 : 190	190 : 198	190 : 198	190 : 198	190 : 190
NZ02b1	213 : 235	213 : 235	213 : 235	225 : 235	225 : 235	225 : 235	225 : 235

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Tabela 6 – Caracterização molecular de genótipos de macieira desenvolvidas pela Epagri, sendo duas cultivares padrão, quatro parentais, cinco mutantes e 16 híbridos (continua).

SSR	NJ-76	Coop-14	Joaquina	Fred Hough	Catarina	Kinkas	D1R103T245	Primícia	Princesa	Condessa
CH01f02	168:178	178:182	178:182	168:182	178:182:182	178:182	168:206	168:206	168:178	168:182
CH01f09	126:126	126:130	126:126	126:126	126:126:136	126:130		108:156	126:136	126:136
CH01g12	099:139	103:143	099:103	103:139	103:103:143	103:103	139:177	101:139	125:177	103:143
CH01h01	113:115	113:117	113:115	113:115	113:113:113	113:117	111:117	111:117	101:127	117:127
CH02b03b	072:102	086:090	090:102	072:086	072:088:102	088:102	072:092	072:072	090:092	072:092
CH02b10	115:115	113:127	113:115	115:127	125:127:151	125:151	119:139	119:139	113:151	119:151
CH02b12	135:135	121:135	121:135	121:135	135:135:135	135:135	135:135	135:135	119:131	123:125
CH02c11	229:229	229:231	229:231	229:229	203:225:229	203:229	229:229	225:229	223:231	229:231
CH02d08	220:222	252:252	220:252	222:252	208:208:222	208:222	208:226	222:226	222:252	222:252
CH03a08	180:242	156:180	180:180	156:242	180:180:242	180:242	180:180	180:180	180:218	186:218
CH03b06	111:133	105:111	105:133	105:111	111:111:115	111:115	099:105	105:105	111:111	105:133
CH03c02	121:123	121:121	121:121	121:123	121:123:157	123:157	123:129	121:121	101:121	121:123
CH04c07	110:110	102:132	110:132	110:132	104:116:116	104:116	094:102	102:102	104:132	92:108
CH04d02	117:129	115:117	115:117	115:129	115:117:117	115:117	129:129	117:129	117:117	117:117
CH05a05	214:218	200:204	204:218	200:218	214:218:229	214:214	216:218	218:222	216:218	218:218
CH05c06	111:111	097:103	097:111	103:111	097:111:119	111:119	097:111	097:107	111:111	111:111
CH05d11	164:168	168:172	164:172	168:172	168:168:192	168:192	168:168	164:194	168:178	168:168
Hi03g06	176:198	176:192	192:198	176:192	190:190:190	190:192	176:192	176:176	166:194	194:198
NZ02b1	213:225	213:225	225:225	213:225	213:221:235	213:233	225:235	225:225	213:233	225:225

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Tabela 5 – Caracterização molecular de genótipos de macieira desenvolvidas pela Epagri, sendo duas cultivares padrão, quatro parentais, cinco mutantes e 16 híbridos (conclusão).

SSR	Duquesa	Daiane	Monalisa	Imperatriz	Baronesa	Cripps Pink	Venice	Luiza	Elenise	Isadora
CH01f02	182:206	168:178	168:182	182:204	168:182	178:206	168:204	182:182	204:206	204:206
CH01f09	108:134	126:136	126:134	126:136	136:136	126:126	136:136	126:136	126:136	126:126
CH01g12	103:177	143:177	103:139	103:143	125:143	099:179	125:143	103:143	99:143	143:179
CH01h01	101:117	101:115	111:115	117:127	113:127	109:115	117:127	113:117	115:127	109:127
CH02b03b	072:090	072:092	068:092	072:090	072:092	072:092	072:072	072:092	072:072	072:092
CH02b10	119:123	119:151	119:123	113:119	127:151	115:119	119:151	113:127	119:119	119:119
CH02b12	125:131	131:135	131:135	135:135	131:135	135:135	131:135	135:135	135:135	135:135
CH02c11	223:229	223:229	225:229	229:229	225:231	203:229	225:229	225:229	203:229	203:229
CH02d08	220:222	222:252	222:252	252:252	208:222	208:220	222:252	222:252	220:252	220:252
CH03a08	180:218	186:218	186:218	156:186	180:180	180:242	180:186	156:180	156:180	180:186
CH03b06	111:133	111:115	111:115	111:115	111:111	111:133	111:115	111:115	111:115	111:115
CH03c02	101:121	121:123	121:123	121:121	101:157	121:123	101:121	121:157	121:121	121:121
CH04c07	106:132	104:132	132:132	92:132	104:132	092:104	92:132	92:104	104:132	92:104
CH04d02	117:117	117:129	117:129	115:117	115:117	117:117	117:117	115:115	117:117	117:117
CH05a05	218:218	216:218	218:218	204:218	218:218	216:218	204:218	204:218	204:218	216:218
CH05c06	95:111	111:119	97:111	111:119	97:111	097:121	111:111	97:111	97:111	97:111
CH05d11	168:168	168:168	168:168	168:172	178:192	164:166	168:192	172:192	164:172	164:168
Hi03g06	166:198	166:190	190:198	190:190	190:194	176:198	190:190	190:194	176:190	176:190
NZ02b1	213:225	233:235	213:235	213:235	213:213	213:225	213:235	213:235	213:235	213:235

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

Os marcadores microssatélites não foram eficientes na diferenciação de todas as cultivares avaliadas que foram desenvolvidas a partir de mutações, estando de acordo com o esperado (GALLI *et al.*, 2005; GASI *et al.*, 2010). As cultivares Fuji Suprema e Fuji Precoce, apresentaram os mesmos alelos da Fuji *standard*, enquanto que Lisgala e Castel Gala o mesmo padrão da Royal Gala (Tabela 5).

Esse fato pode ser decorrente da localização da mutação no genoma, visto que, pode ter ocorrido em regiões específicas, próximas aos genes que controlam as características fenotípicas que as diferenciam da cultivar de origem, fazendo com que a mutação esteja fora da região de microssatélites acessados pelos iniciadores avaliados. Outro fator que pode contribuir para a igualdade do genótipo de fenótipos distintos é a epigenética, que é a alteração na expressão gênica, podendo ser herdada e não tendo alteração na sequência do DNA. Os dois principais mecanismos epigenéticos são a metilação do DNA e a modificação das histonas, ocasionando a diferenciação na expressão gênica, e por consequência a alteração do fenótipo, sem alterar o DNA (PAIVA *et al.*, 2019).

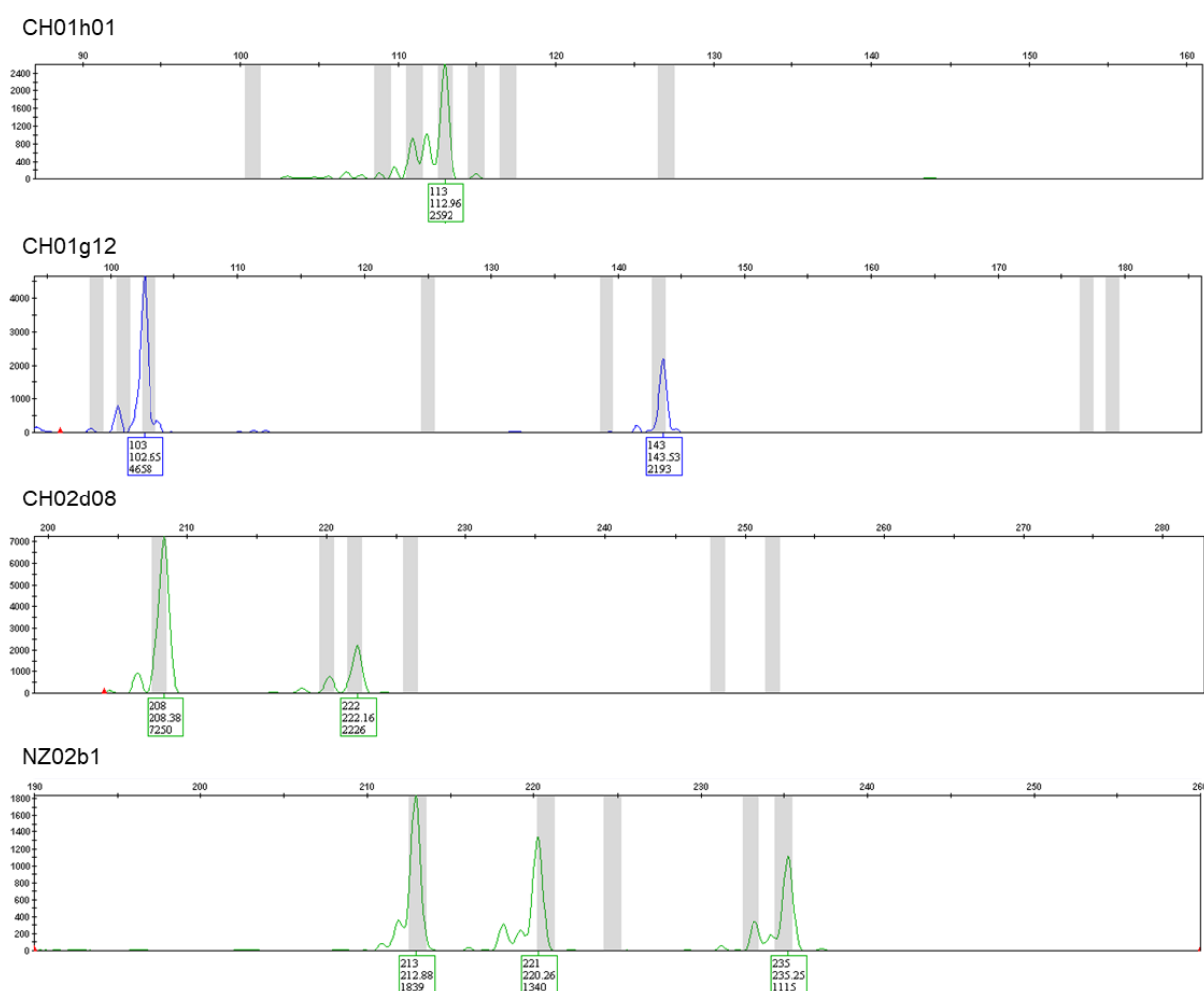
Entretanto, na cultivar Gala Gui, pôde-se realizar a diferenciação da cultivar Royal Gala observando-se dois marcadores, CH03b06 e Hi03g06, ambos localizados no cromossomo 15, em uma região próxima.

As cultivares obtidas a partir de hibridações dirigidas puderam ser diferenciadas entre si, atestando o fato de que os marcadores microssatélites podem ser empregados na caracterização molecular desses genótipos (BAN *et al.*, 2014; GALLI *et al.*, 2005; GANOPOULOS *et al.*, 2015; HOKANSON *et al.*, 1998).

Com essa análise, pôde-se confirmar que a cultivar Catarina é triploide (Tabela 5), sendo que em alguns casos não é possível identificar o terceiro alelo, visto que ele é a repetição de outro e o sequenciador não detecta a diferença (CAVANNA *et al.*, 2008). Entretanto, foi possível verificar que os picos dos alelos duplicados apresentaram uma altura, mensurada em rfu (*relative fluorescence units*), bem maior em relação ao outro alelo, fugindo do padrão do marcador, e permitindo a identificação do terceiro alelo (Figura 5). O marcador CH01h01 é homozigoto para essa cultivar, já os marcadores CH01g12 e CH02d08 apresentaram dois picos, entretanto um deles com uma rfu maior que o segundo pico, podendo-se assumir que o mais alto representa o alelo repetido, e o marcador NZ02b1, que apresentou os três alelos distintos. Na macieira, genótipos triploides geralmente são decorrentes da fertilização de um óvulo diploide, gerado por uma falha na meios e, com um pólen haploide, de

formação normal (GIANFRANCESCHI *et al.*, 1998; HAUAGGE; BRUCKNER, 2012). Era esperado que essa cultivar apresentasse um genoma triploide devido aos indícios fenotípicos como a planta vigorosa, folhas grandes, frutos grandes, dentre outras características que geralmente indicam a triploidia.

Figura 5 – Eletroforegramas de quatro marcadores microssatélites obtidos para a cultivar Catarina. Os dados são apresentados em uma sequência de 3 números, sendo o primeiro o nome do alelo, o segundo, o tamanho do alelo e o terceiro, o tamanho do pico de amplificação em *rfu* (*relative fluorescence unit*).



Fonte: elaborado pela autora, 2021.

Além da caracterização dos genótipos, os marcadores microssatélites podem ser empregados na comprovação da genealogia de genótipos de interesse. Foi possível atestar os genitores feminino e masculino das cultivares Fred Hough (NJ-76 x Coop-14), Baronesa (Fuji x Princesa), Daiane (Gala x Princesa), Joaquina (NJ-76 x

Coop-14), Venice (Imperatriz x Baronesa), Elenise (Imperatriz x CrippsPink) e Isadora (Imperatriz x Cripps Pink).

Contudo, verificou-se que a genealogia da cultivar Luiza não está de acordo com o descrito na literatura (DENARDI; KVITSCHAL; HAWERROTH, 2019). Conforme o registro, os parentais da cultivar seriam Imperatriz e Cripps Pink, entretanto, pôde-se verificar que possível o genitor masculino é a cultivar Baronesa, sendo que a cultivar Imperatriz foi confirmada como genitor feminino (Tabela 6).

Tabela 7 – Comparação entre a caracterização molecular da cultivar SCS425 Luiza (filho), seus parentais de acordo com o registro, Imperatriz (genitor feminino) e Cripps Pink (suposto genitor masculino) e o real parental masculino de acordo com o genótipo, a cultivar Baronesa (genitor masculino).

SSR	Luiza (F)	Imperatriz (GF)	Baronesa (GM)	Cripps Pink (SGM)
CH01f02	182:182	182:204	168:182	178:206
CH01f09	126:136	126:136	136:136	126:126
CH01g12	103:143	103:143	125:143	99:179
CH01h01	113:117	117:127	113:127	109:115
CH02b03b	72:92	72:90	72:92	72:92
CH02b10	113:127	113:119	127:151	115:119
CH02b12	135:135	135:135	131:135	135:135
CH02c11	225:229	229:229	225:231	203:229
CH02d08	222:252	252:252	208:222	208:220
CH03a08	156:180	156:186	180:180	180:242
CH03b06	111:115	111:115	111:111	111:133
CH03c02	121:157	121:121	101:157	121:123
CH04c07	92:104	92:132	104:132	92:104
CH04d02	115:115	115:117	115:117	117:117
CH05a05	204:218	204:218	218:218	216:218
CH05c06	97:111	111:119	97:111	97:121
CH05d11	172:192	168:172	178:192	164:166
HI03g06	190:194	190:190	190:194	176:198
NZ02b1	213:235	213:235	213:213	213:225

FONTE: elaborado pela autora, 2021.

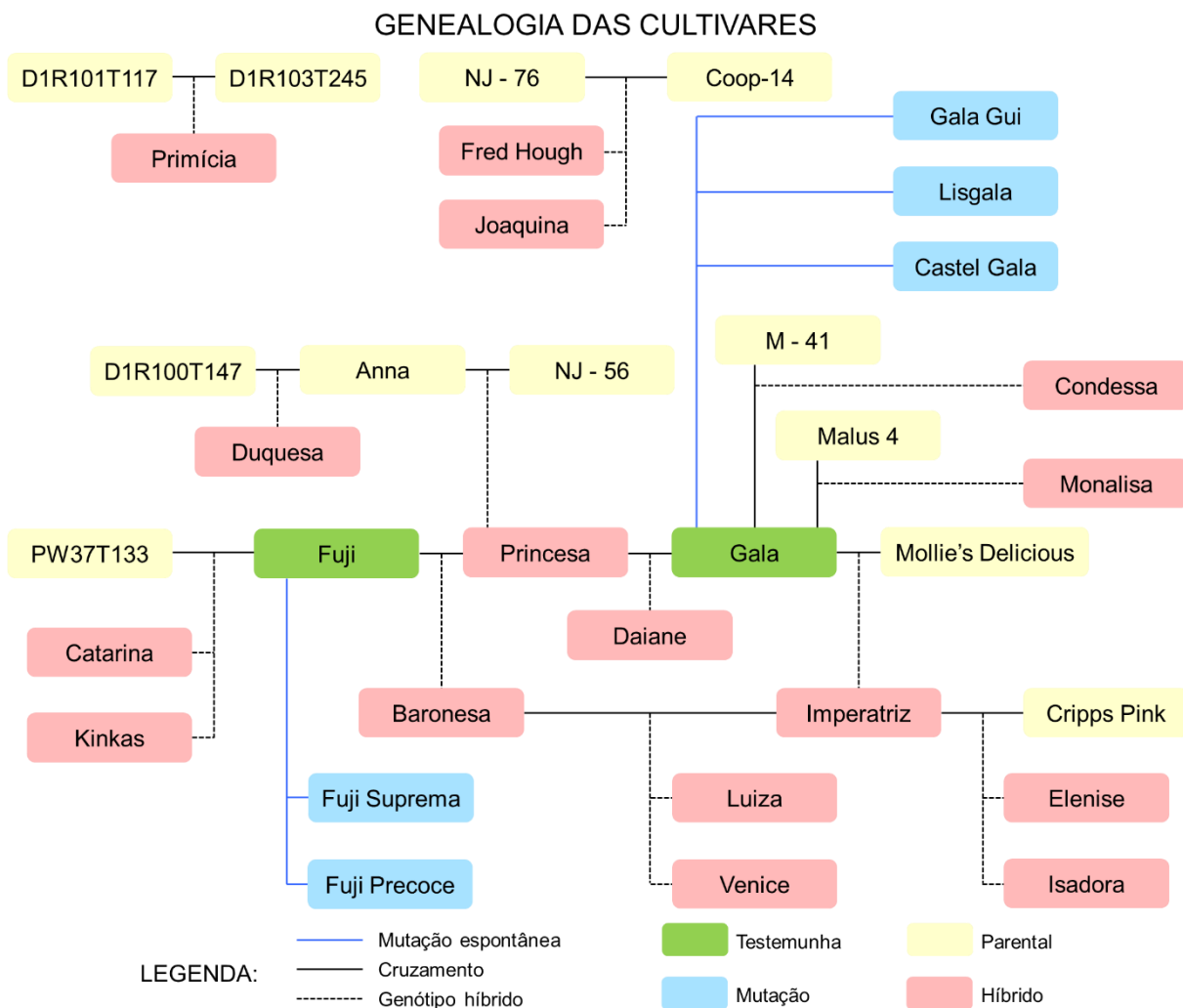
No trabalho realizado por Brancher et al. (2020) identificou um alelo S₉ de incompatibilidade na cultivar Luiza que não compõe o genótipo de nenhum de seus genitores registrados. Os autores levantaram a hipótese de troca de sementes, contaminação de pólen ou troca de híbridos no plantio, durante a rotina do Programa de Melhoramento de Macieira da Epagri. Isso pode ter ocorrido, pois no mesmo ano em que foi realizado o cruzamento entre Imperatriz x Cripps Pink, também houve outro

grande cruzamento envolvendo Imperatriz x Baronesa, e pelo fato da Baronesa possuir o alelo S₉, houve a suspeita de que este seria o genitor masculino. Portanto, com os resultados obtidos neste trabalho (Tabela 6), essas hipóteses lançadas por Brancher et al. (2020) foram confirmadas.

Esse fato comprova a importância da inclusão dos marcadores microsatélites nas atividades de rotina nos programas de melhoramento, permitindo a correção dos erros que podem ocorrer quanto à definição da genealogia, principalmente nas etapas iniciais do desenvolvimento de uma nova cultivar por meio de hibridações controladas.

Tendo como base os dados publicados por Denardi, Kvitschal e Hawerroth (2019), somados à correção dos reais parentais da cultivar Luiza, pôde-se construir a genealogia completa de todas as cultivares avaliadas (Figura 6).

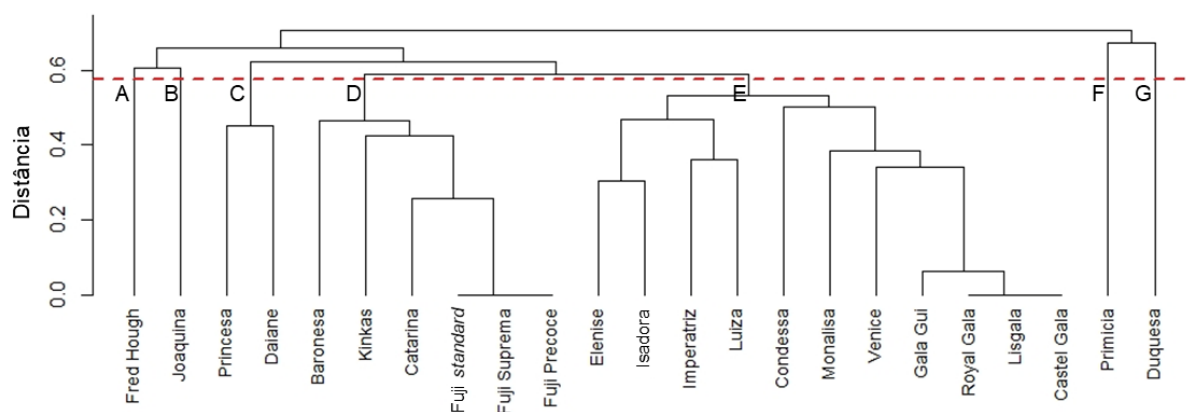
Figura 6 – Genealogia ilustrada das cultivares avaliadas no presente estudo.



Fonte: elaborado pela autora, 2019.

A análise de agrupamento, com base nos 19 marcadores microssatélites, separou as cultivares em sete grupos (Figura 7).

Figura 7 – Dendrograma de agrupamento dos 23 genótipos de macieira analisados com base nos 19 marcadores microssatélites, sendo agrupados pelo método UPGMA com base na distância de Jaccard. A linha tracejada vermelha representa a distância média entre os genótipos (0,583) e foi utilizada como ponto de corte.



Fonte: elaborado pela autora, 2021.

Foram formados quatro grupos compostos por apenas um genótipo, sendo eles Fred Hough (A), Joaquina (B), Primícia (F) e Duquesa (G), que são as quatro cultivares que apresentam os parentais mais distintos em relação as demais. O grupo C reuniu a cultivar Daliane ao seu genitor masculino, Princesa. O grupo D engloba a Fuji e suas mutações, Fuji Suprema e Fuji Precoce, bem como suas descendentes, Baronesa, Kinkas e Catarina. E por fim, o grupo E reuniu a cultivar Gala, suas mutações, Lisgala, Castel Gala e Gala Gui, suas descendentes Imperatriz, Monalisa e Condessa, e as cultivares descendentes de Imperatriz, Elenise, Venice, Luiza e Isadora, que são netas de Gala.

4. CONCLUSÃO

Os marcadores microssatélites foram capazes de diferenciar os genótipos obtidos por meio de hibridação artificial, sendo eficientes para distinguir e confirmar os parentais atribuídos. Entretanto, essa metodologia não pode ser a única adotada para a diferenciação de genótipos obtidos por meio de mutações espontâneas, sendo necessário o uso de descritores morfológicos.

O emprego dos marcadores moleculares nas atividades de rotina em programas de melhoramento pode trazer grandes vantagens. Além de complementar a caracterização fenotípica, a descrição molecular pode trazer novas informações sobre as cultivares que estão sendo desenvolvidas. Além disso, pode ser realizada a verificação da identidade genética das cultivares em viveiros e pomares comerciais, garantindo a proteção e os direitos associados aos benefícios gerados pela detenção do Certificado de Proteção de Cultivares, auxiliando no retorno de investimentos pela arrecadação de royalties.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os principais resultados gerados, podem ser destacados alguns pontos importantes:

1. A caracterização fenotípica, com base nos descritores morfoagronômicos do MAPA, é de extrema importância, e permanece sendo essencial para a diferenciação das cultivares.

2. Os marcadores microssatélites podem ser empregados na rastreabilidade de cultivares desenvolvidas a partir de hibridações controladas, gerando informações importantes para subsidiar a arrecadação de royalties ao mantenedor da cultivar.

3. A genealogia dos genótipos selecionados pode ser confirmada por meio do uso dos marcadores microssatélites, garantindo e assegurando uma maior confiabilidade aos registros.

4. As análises moleculares, podem ser empregadas como ferramentas auxiliares nos programas de melhoramento, combinando as caracterizações fenotípica e genotípica para a descrição completa de genótipos de interesse.

Portanto, para a caracterização e diferenciação entre cultivares de macieira, recomenda-se utilizar de forma conjunta os descritores morfoagronômicos e marcadores microssatélite, de forma que ambas as informações se complementem e possam diferenciar os genótipos de interesse quando avaliadas de forma conjunta.

REFERÊNCIAS

ABPM. **Anuário Brasileiro da Maçã**. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br/>>. Acesso em: 30 nov. 2020.

ALBUQUERQUE, M. L. Breve histórico da indústria da maçã no Brasil. **Agropecuária Catarinense**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 14–20, 2018.

AVIANI, D.M.; SANTOS, F.S. Uso de marcadores moleculares na proteção de cultivares. In: Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Proteção de Cultivares no Brasil**. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS, 2011. p.155-158.

BAN, S. H. *et al.* Genetic identification of apple cultivars bred in Korea using simple sequence repeat markers. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, [S. l.], v. 55, n. 6, p. 531–539, 2014.

BHAT, Z.A.; DHILLON, W.S.; RASHID, R.; BHAT, J.A.; DAR, W.A.; GANAIE, M.Y. The role of Molecular Markers in Improvement of Fruit Crops. **Notulae Scientia Biologicae**, v.2, n.2, p. 22-30, 2010.

BRANCHER, T. L. *et al.* Self-incompatibility alleles in important genotypes for apple breeding in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 1-9, 2020.

BROWN, A. G. Apples. In: MOORE, J. N.; JANICK, J. **Advances in Fruit Breeding**. Indiana, USA: Purdue University Press, 1975. p. 3-37.

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

BRUCKNER, C. H.; WAGNER JÚNIOR, A. Métodos de melhoramento de fruteiras. In: **Fundamentos do melhoramento de fruteiras**. Viçosa: UFV, 2008. p. 69–103.

CAVANNA, M. *et al.* Genetic diversity in ancient apple germplasm from northwest Italy. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, [S. l.], v. 83, n. 5, p. 549–554, 2008.

CORNILLE, A. *et al.* The domestication and evolutionary ecology of apples. **Trends in Genetics**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 57–65, 2014.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, J. A.; CARNEIRO, P. C. S. Divergência genética. In: **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2004. v. 1p. 377–413.

DAR, J. A. et al. Assessment of the Genetic Diversity of Apple (*Malus x domestica* Borkh.) Cultivars Grown in the Kashmir Valley using Microsatellite Markers. **Journal of King Saud University**, 2017.

DENARDI, F. et al. Banco ativo de germoplasma de maçã. In: BURLE, M. L. et al. Workshop de curadores de germoplasma do Brasil. **Anais...**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 423 p.

DENARDI, F.; HOUGH, L. F. Apple breeding in Brazil. **HortScience**, [S. l.], v. 22, 6, p. 1231–1233, 1987.

DENARDI, F.; KVITSCHAL, M. V.; HAWERRTOH, M. C. A brief history of the forty-five years of the Epagri apple breeding program in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 347-355, 2019.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Produção agrícola mundial**, 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en>>. Acesso em: 02 mar. 2021.

FAORO, I. D. Novo cultivar de macieira ‘SCS441 Gala Gui’: resistente à mancha foliar de *Glomerella* e frutos com boa cobertura vermelha rajada. **Agapomi**, 302 ed., 2019.

FAORO, I. D. Seleção de mutantes espontâneos de macieira 2018. Epagri, Boletim Técnico, 2018. 40 p.

FERREIRA, F. R. Germoplasma de fruteiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 1-6, 2011.

FUKUDA, W.M.G.; GUEVARA, C.L. **Descritores morfológicos e agrônômicos para a caracterização de mandioca (*Manihot esculenta* Crant.)**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMP, 1998, 38p. (EMBRAPA-CNPMP, Documentos, 78).

FURLAN, C. R. C. et al. Resistência genética dos acessos do banco de germoplasma de macieira da epagri à mancha foliar de *glomerella* (*Colletotrichum gloeosporioides*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 507-514, 2010.

GALLI, Z. *et al.* Molecular Identification of Commercial Apple Cultivars with Microsatellite Markers. **HortScience**, [S. l.], v. 40, n. 7, p. 1974–1977, 2005.

GAÑOPOULOS, I. *et al.* Diversity of morpho-physiological traits in worldwide sweet cherry cultivars of GeneBank collection using multivariate analysis. **Scientia Horticulturae**, [S. l.], v. 197, p. 381–391, 2015.

GAÑOPOULOS, I. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of apple (*Malus x domestica* Borkh) genetic resources in Greece. **Scientia Agricola**, [S. l.], v. 75, n. 6, p. 509–518, 2018.

GARKAVA-GUSTAVSSON, L. *et al.* Genetic diversity in Swedish and Finnish heirloom apple cultivars revealed with SSR markers. **Scientia Horticulturae**, v. 162, p. 43-48, 2013.

GASI, F. *et al.* Genetic assessment of apple germplasm in Bosnia and Herzegovina using microsatellite and morphologic markers. **Scientia Horticulturae**, v. 126, n. 2, p. 164-171, 2010.

GIANFRANCESCHI, L. *et al.* Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple: **Theoretical and Applied Genetics**, [S. l.], v. 96, n. 8, p. 1069–1076, 1998.

GOWER, J. C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**, v.27, n.4, p.857-874, 1971.

GUILFORD, P. *et al.* Microsatellites in *Malus X domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification: **Theoretical and Applied Genetics**, [S. l.], v. 94, n. 2, p. 249–254, 1997.

HAUAGGE, R.; BRUCKNER, C. Macieira. *In*: **Melhoramento de Fruteiras de Clima Temperado**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2012. p. 27–88.

HAWERROTH, M. C.; BRANCHER, T. L.; KVITSCHAL, M. V. Dissimilaridade entre genótipos elite de macieira da Epagri com base na caracterização fenotípica e molecular. **Agropecuária Catarinense**, v. 31, n. 3, p.67-72, 2018.

HOKANSON, S. C. *et al.* Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malusxdomestica* borkh. core subset collection: **Theoretical and Applied Genetics**, [S. l.], v. 97, n. 5–6, p. 671–683, 1998.

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

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro: IBGE. v. 30, n. 12, dez. 2017. 112 p.

IUCHI, V. L. Botânica e Fisiologia. *In: Cultura da Macieira*. Florianópolis: EPAGRI, 2006. p. 59–104.

JACKSON, J. E. **Biology of Apples and Pears**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003.

KLABUNDE, G. H. F. et al. Genetic diversity and apple leaf spot disease resistance characterization assessed by SSR markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, p. 189-196, 2016.

KVITSCHAL, M. V. *et al.* Melhoramento genético e Biotecnologia. *In: Maçã: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília: Embrapa, 2013. p. 29–40.

KVITSCHAL, M. V.; HAWERROTH, M.; BRIGHENTI, A. F. Novas variedades de maçã no Brasil: situação atual, tendências e perspectivas. **Agropecuária Catarinense**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 124–130, 2018.

LASSOIS, L. et al. Genetic Diversity, Population Structure, Parentage Analysis, and Construction of Core Collections in the French Apple Germplasm Based on SSR Markers. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 34, p. 827-844, 2016.

LIEBHARD, R. *et al.* Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). [S. l.], p. 26, 2002.

MACHADO, C. F. et al. Divergência genética de acessos de maracujá utilizando descritores quantitativos e qualitativos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 2, p. 442-449, 2015.

MARCONI, G. et al. Genetic Characterization of the Apple Germplasm Collection in Central Italy: The Value of Local Varieties. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-17, 2018.

MARIC, S.; LUKIC, M.; CEROVIC, R.1 MITROVIC, M.; BOŠKOVIC, R. Application of molecular markers in apple breeding. **Genetika**, v.42, n.2, p.359-375, 2010.

MORGANTE, M.; OLIVERI, A.M., PCR – amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v.3, n.1, p.175-182, 1993.

MOURA, M. C. C. L. et al. Algoritmo de Gower na estimativa da divergência genética em germoplasma de pimenta. **Horticultura brasileira**, v. 28, n. 2, p. 155-161,2010.

PAIVA, J. T. *et al.* Epigenética: mecanismos, herança e implicações no melhoramento animal. **Archivos de Zootecnia**, [S. l.], v. 68, n. 262, p. 304–311, 2019.

PEREIRA-LORENZO, S. et al. Analysis of Apple Germplasm in Northwestern Spain. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, n. 2, p. 67-84, 2018.

PEREIRA-LORENZO, S.; FISCHER, M.; RAMOS-CABRER, A. M.; CASTRO, I. Apple (*Malus* spp.) Breeding: Present and Future. *In*: AL-KHAYRI, J. M.; JAIN, S. M.; JOHNSON, D. V. **Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits**. V. 3. Springer, 2018. p. 3-29.

PERINI, L. J. et al. Genetic diversity among food type soybean accessions based on Gower algorithm. **Colloquium Agrariae**, v.14, n.4, p. 47-57, 2018.

PETRI, J. L. Fatores edafoclimáticos. *In*: **A Cultura da Macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2006. p. 105–112.

PRASAD, H. Studies on identification of bud sports in apple (*Malus x domestica* Borkh.). Tese. Dr. Yashwant Singh Parmar University of Horticulture and Foresti, India. 2020. Disponível em: <<https://krishikosh.egranth.ac.in/displaybitstream?handle=1/5810143541>> Acesso em: 01 de fev. De 2021.

PRATT, C. Somatic selection and chimeras. *In*: MOORE, J. N.; JANICK, J. **Methods in Fruit Breeding**. Indiana, USA: Purdue University Press, 1983. p. 172-185.

QUINTAL, S. S. R. et al. Divergência genética entre acessos de mamoeiro por meio de variáveis morfoagronômicas. **Semina: Ciências Agrárias**, c v. 33, n. 1, p. 131-142, 2012.

REVERS, L.F.; MACHADO, C.A.E. Identificação varietal e genotipagem – serviços oferecidos pelo Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Uva e Vinho. Bento Gonçalves, RS (**Comunicado técnico, 64**). 2005. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/541444/1/cot064.pdf>>. Acesso em 26 jul. 2018.

REVERS, L.F.; MACHADO, C.A.E; MARAGON, M.A.; BUFFON, V. Identificação varietal e genotipagem de macieiras utilizando testes de DNA. Bento Gonçalves, RS (**Comunicado técnico, 148**). 2013. Disponível em: < [https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/993539/1/Comunicado Tecnico148.pdf](https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/993539/1/Comunicado_Tecnico148.pdf) >. Acesso em 26 jul. 2018.

REYES-VALDÉZ, M. H. et al. An informational view of accession rarity and allele specificity in germplasm banks for management and conservation. **Plos One**, v. 13, n. 2, p. 1-15, 2018.

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

SEMAGN, K.; BJORNSTAD, A.; NDJIONDJOP, M.N. An overview of molecular marker methods for plants. **African Journal of Biotechnology**., v.5, n.25, p. 2540-2568, 2006.

SIKORSKAITE, S.; GELVONAUSKIENE, D.; STANYS, V.; BANIULIS, D. Characterization of microsatellite loci in apple (*Malus x domestica* Borkh.) cultivars. **Žemdirbystė Agriculture**, v.99, n.2, p.131-138, 2012.

SILFVERBERG-DILWORTH, E. *et al.* Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. **Tree Genetics & Genomes**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 202–224, 2006.

STORTI, A.; VIA, J. D.; BARIC, S. Comparative Molecular Genetic Analysis of Apple Genotypes Maintained in Germplasm Collections. **Erwerbs-Obstbau**, v. 54, p. 137-141, 2012.

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

UPOV - International Union for the Protection of New Varieties of Plants. 2005. **Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability**. UPOV, Geneva, Switzerland.

URRESTARAZU, J. et al.. Genetic diversity and structure of local apple cultivars from Northeastern Spain assessed by microsatellite markers. **Tree Genetics & Genomes**, 2012.

VELASCO, R. et al. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). **Nature Genetics**, v. 42, n. 10, p. 833-841, 2010.

VIDAL, A. K. F. et al. Estimative of genetic diversity in germ-plasm of elephant grass using the Gower algorithm. **Genetics and Molecular Research**, v. 17, n. 4, p. 1-11, 2018.

WAPA. World Apple and Pear Association. Disponível em: <<http://www.wapa-association.org/asp/index.asp>>. Acesso em: 16 out. 2019.

ZANELLA, C. M. et al. Microssatélites: Metodologias de identificação e análise. In: TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. (org). **Marcadores moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p. 94-117.

ANEXO A – DESCRITORES MORFOLÓGICOS E AGRONÔMICOS

SIGLA	CARACTERÍSTICA	CÓDIGO
1 PLV	Planta: vigor	1: muito fraco, 3: fraco, 5: médio, 7: forte
2 PLT	Planta: tipo	1: colunar, 2: ramificado
3 PLH	Planta: hábito	1: ereto, 2: aberto, 3: pendente, 4: muito pendente
4 PLTF	Planta: tipo de frutificação	1: unicamente nos esporões, 2: nos esporões e hastes longas, 3: unicamente nas hastes longas
5 RAE	Ramo de um ano: espessura	3: fina, 5: média, 7: grossa, 9: muito grossa
6 RACE	Ramo de um ano: comprimento do entrenó	1: muito curto, 3: curto, 5: médio, 7: longo
7 RACS	Ramo de um ano: cor da parte exposta ao sol	1: marrom-esverdeada, 2: marrom-avermelhada, 3: marrom-clara, 4: marrom, 5: marrom-escura
8 RAP	Ramo de um ano: pubescência	1: ausente ou muito fraca, 3: fraca, 5: média, 7: forte, 9: muito forte
9 RANL	Ramo de um ano: número de lenticelas	3: baixo, 5: médio, 7: alto
10 LFPR	Lâmina foliar: posição em relação ao ramo	1: ascendente, 2: horizontal, 3: descendente
11 LFC	Lâmina foliar: comprimento	1: muito curto, 3: curto, 5: médio, 7: longo
12 LFL	Lâmina foliar: largura	3: estreita, 5: média, 7: larga
13 LFCL	Lâmina foliar: razão comprimento/largura	3: pequena, 5: média, 7: grande
14 LFIV	Lâmina foliar: intensidade da coloração verde	3: fraca, 5: média, 7: forte
15 LFIM	Lâmina foliar: incisões da margem	1: crenadas, 2: bicrenadas, 3: serrilhadas tipo 1, 4: serrilhadas tipo 2, 5: biserrilhadas
16 LFPFI	Lâmina foliar: pubescência da face inferior	1: ausente ou fraca, 2: média, 3: forte
17 PC	Peciolo: comprimento	3: curto, 5: médio, 7: longo
18 PECA	Peciolo: extensão da coloração antocianínica	3: pequena, 5: média, 7: grande
19 FLC	Flor: coloração predominante na fase de balão floral	1: branca, 2: rosa-amarelada, 3: rosa-clara, 4: rosa-escura, 5: vermelha-média, 7: vermelha-escura, 7: roxa
20 FLD	Flor: diâmetro com as pétalas estendidas e posicionadas horizontalmente	1: muito pequeno, 3: pequeno, 5: médio, 7: grande
21 FLAP	Flor: arranjo de pétalas	1: separadas, 2: intermediárias, 3: sobrepostas

22	FLPE	Flor: posição dos estigmas em relação às anteras	1: abaixo, 2: no mesmo nível, 3: acima
23	FRJCA	Fruto jovem: extensão da coloração antocianínica	1: muito pequena, 3: pequena, 5: média, 7: grande, 9: muito grande
24	FRT	Fruto: tamanho	1: muito pequeno, 2: muito pequeno a pequeno, 3: pequeno, 4: pequeno a médio, 5: médio, 6: médio a grande, 7: grande, 8: grande a muito grande, 9: muito grande
25	FRA	Fruto: altura	3: baixa, 5: média, 7: alta
26	FRD	Fruto: diâmetro	3: pequeno, 5: médio, 7: grande
27	FRCD	Fruto: razão comprimento/diâmetro	1: muito pequena, 3: pequena, 5: média, 7: grande, 9: muito grande
28	FRF	Fruto: forma geral	1: cilíndrica-truncada, 2: cônica, 3: ovóide, 4: cilíndrica, 5: elipsóide, 6: globosa, 7: oblóide (achatada)
29	FROE	Fruto: ondulação da epiderme	1: ausente ou fraca, 2: moderada, 3: forte
30	FROC	Fruto: ondulação no final do cálice	1: ausente ou fraca, 2: moderada, 3: forte
31	FRT0	Fruto: tamanho do olho	3: pequeno, 5: médio, 7: grande
32	FRCS	Fruto: comprimento da sépala	3: curto, 5: médio, 7: longo
33	FRPE	Fruto: pruína na epiderme	1: ausente ou fraca, 2: moderada, 3: forte
34	FROLE	Fruto: oleosidade da epiderme	1: ausente ou fraca, 2: moderada, 3: forte
35	FRCF	Fruto: coloração de fundo	1: não visível, 2: amarela esbranquiçada, 3: amarela, 4: verde esbranquiçada, 5: verde-amarelada, 6: verde
36	FRACS	Fruto: área relativa da coloração superficial	1: ausente ou muito pequena, 3: pequena, 5: média, 7: grande, 9: muito grande
37	FRTCS	Fruto: tonalidade da coloração Superficial	1: vermelha-alaranjada, 2: vermelha-rosada, 3: vermelha, 4: vermelha-arroxeadada, 5: vermelha-amarronzada
38	FRICS	Fruto: intensidade da coloração superficial	3: clara, 5: média, 7: escura
39	FRDCS	Fruto: distribuição da coloração superficial	1: uniforme sem estrias, 2: uniforme com estrias levemente definidas, 3: uniforme com estrias claramente definidas, 4: levemente uniforme com estrias claramente definidas, 5: somente com

			estrias, 6: uniforme e variegado, 7: uniforme com estrias e variegado
40	FRLE	Fruto: largura das estrias	3: estreitas, 5: médias, 7: largas
41	FRARP	Fruto: área de russeting na cavidade peduncular	1: ausente ou pequena, 2: média, 3: grande
42	FRARF	Fruto: área de russeting nas faces	1: ausente ou pequena, 2: média, 3: grande
43	FRARCP	Fruto: área de russeting na cavidade pistilar	1: ausente ou pequena, 2: média, 3: grande
44	FRNL	Fruto: número de lenticelas	3: baixo, 5: médio, 7: alto
45	FRTL	Fruto: tamanho das lenticelas	3: pequenas, 5: médias, 7: grandes
46	FRCP	Fruto: comprimento do pedúnculo	1: muito curto, 3: curto, 5: médio, 7: longo, 9: muito longo
47	FREP	Fruto: espessura do pedúnculo	3: fina, 5: média, 7: grossa
48	FRPP	Fruto: profundidade da cavidade peduncular	3: rasa, 5: média, 7: profunda
49	FRLP	Fruto: largura da cavidade peduncular	3: estreita, 5: média, 7: larga
50	FRPCP	Fruto: profundidade da cavidade pistilar	3: rasa, 5: média, 7: profunda
51	FRLCP	Fruto: largura da cavidade pistilar	3: estreita, 5: média, 7: larga
52	FRFP	Fruto: firmeza de polpa	1: muito macia, 3: macia, 5: média, 7: firme, 9: muito firme
53	FRCLP	Fruto: coloração de polpa	1: branca, 2: creme, 3: amarelada, 4: esverdeada, 5: rosada, 6: avermelhada
54	FRAL	Fruto: abertura dos lóculos	1: fechados ou ligeiramente abertos, 2: moderadamente abertos, 3: completamente abertos
55	EIF	Época de início da floração	1: muito precoce, 3: precoce, 5: média, 7: tardia, 9: muito tardia
56	EC	Fruto: época de colheita	1: muito precoce, 3: precoce, 5: média, 7: tardia, 9: muito tardia
57	EM	Época de maturação	1: muito precoce, 2: muito precoce a precoce, 3: precoce, 4: precoce a intermediária, 5: intermediária, 6: intermediária a tardia, 7: tardia, 8: tardia a muito tardia, 9: muito tardia

Fonte: MAPA, 2012.

ANEXO B – CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

Descritor	Fuji <i>standard</i>	Royal Gala	Fuji Suprema	Lisgala	Castel Gala	Fuji Precoce	Gala Gui
PLV	7	5	5	3	6	5	5
PLT	2	2	2	2	2	2	2
PLH	2	2	2	2	2	2	2
PLTF	2	2	2	2	2	2	2
RAE	5	5	5	5	5	5	5
RACE	5	5	5	4	5	5	5
RACS	4	1	2	4	3	2	4
RAP	4	2	5	4	5	6	3
RANL	5	6	6	6	5	7	4
LFPR	2	2	2	1	2	1	1
LFC	6	5	5	5	6	5	5
LFL	5	5	5	4	6	5	5
LFCL	6	5	5	6	5	5	6
LFIV	5	4	4	5	5	4	6
LFIM	3	3	4	4	3	4	4
LFPFI	1	1	1	1	1	1	2
PC	5	5	6	6	6	5	5
PECA	3	6	7	5	3	3	5
FLC	3	4	3	3	3	3	4
FLD	6	4	3	4	6	4	5
FLAP	2	1	2	1	1	3	1
FLPE	2	2	2	1	2	1	1
FRJCA	1	1	9	4	4	2	4
FRT	6	5	6	4	5	5	4
FRA	5	5	4	5	5	4	4
FRD	6	5	6	5	6	6	4
FRCD	2	5	2	5	5	3	4
FRF	7	2	7	2	2	7	5
FROE	1	1	1	1	1	1	1
FROC	1	1	1	1	2	1	2
FRTO	3	6	3	6	1	3	4
FRCS	3	5	3	3	4	3	3
FRPE	1	2	1	2	1	1	1
FROLE	1	1	1	1	1	1	1
FRCF	6	3	3	2	3	2	3
FRACS	6	7	9	8	5	7	7
FRTCS	5	3	5	3	2	3	3
FRICS	5	6	7	6	5	5	5
FRDCS	2	3	2	1	7	6	3
FRLE	6	6	5	0	4	0	4
FRARP	3	3	2	2	2	2	2
FRARF	2	1	2	1	1	1	1
FRARCP	1	1	1	1	1	1	1

Descritor	Fuji <i>standard</i>	Royal Gala	Fuji Suprema	Lisgala	Castel Gala	Fuji Precoce	Gala Gui
FRNL	3	5	6	6	4	4	5
FRTL	7	5	5	4	5	6	3
FRCP	3	5	3	5	6	3	5
FREP	5	5	6	4	4	5	4
FRPP	6	6	7	7	6	6	5
FRLP	5	3	5	5	5	5	3
FRPCP	5	5	5	5	4	4	4
FRLCP	6	4	6	6	5	6	4
FRFP	6	5	6	4	5	6	4
FRCLP	4	2	4	2	1	2	2
FRAL	3	1	3	2	2	2	1
EIF	7	5	7	7	3	7	5
EC	6	5	6	5	2	5	5
EM	6	5	6	5	2	5	5

Fonte: elaborado pela autora, 2021.

Descritor	Princesa	Catarina	Fred Hough	Imperatriz	Baronesa	Condessa	Duquesa	Daiane
PLV	6	5	5	6	5	6	6	5
PLT	2	2	2	2	2	2	2	2
PLH	2	2	2	2	2	2	2	2
PLTF	2	2	2	2	2	2	2	2
RAE	5	5	5	6	5	6	5	5
RACE	5	5	5	5	5	5	5	4
RACS	3	4	1	3	4	4	3	4
RAP	6	4	6	7	6	6	2	6
RANL	3	6	6	5	4	4	5	4
LFPR	2	2	1	1	1	2	2	1
LFC	6	6	5	5	5	7	5	6
LFL	5	6	5	5	5	5	5	5
LFCL	6	5	5	5	5	7	5	6
LFIV	6	5	5	5	5	6	6	5
LFIM	3	4	3	3	4	3	4	3
LFPFI	1	2	2	2	2	2	1	1
PC	6	4	5	5	6	7	5	6
PECA	6	5	3	4	4	5	4	5
FLC	4	4	3	4	4	3	3	4
FLD	6	4	6	6	4	5	5	5
FLAP	1	2	1	2	1	2	3	2
FLPE	1	1	1	1	1	1	1	2
FRJCA	3	3	1	4	2	2	4	2
FRT	5	5	3	5	6	4	5	7
FRA	5	4	4	6	5	4	5	6
FRD	5	5	4	4	5	4	5	3
FRCD	5	4	5	7	5	4	5	8
FRF	2	6	2	4	6	2	2	4
FROE	1	1	1	1	2	1	1	1
FROC	2	1	1	1	1	1	1	2
FRTO	5	5	5	5	4	1	3	3
FRCS	5	3	5	3	5	3	3	5
FRPE	1	2	1	1	2	1	1	1
FROLE	2	1	1	1	1	1	1	1
FRCF	5	6	5	2	5	2	5	3
FRACS	7	5	5	7	6	6	5	6
FRTCS	4	5	5	3	3	5	2	3
FRICS	6	5	5	5	5	6	4	5
FRDCS	6	2	3	2	2	2	7	7
FRLE	0	6	6	5	5	4	5	5
FRARP	1	2	2	3	1	2	1	2
FRARF	1	1	1	1	1	1	1	1
FRARCP	1	1	1	1	1	1	1	1
FRNL	7	5	5	6	4	5	5	6
FRTL	3	6	5	5	5	5	5	4

Descritor	Princesa	Catarina	Fred Hough	Imperatriz	Baronesa	Condessa	Duquesa	Daiane
FRCP	5	3	5	5	5	5	2	4
FREP	5	5	4	6	5	4	5	6
FRPP	5	5	6	5	5	6	6	6
FRLP	3	4	3	6	3	5	3	4
FRPCP	4	5	6	4	5	3	4	5
FRLCP	5	5	5	6	5	6	5	6
FRFP	5	5	5	7	5	4	2	5
FRCLP	1	2	1	4	1	1	1	1
FRAL	2	3	1	1	2	3	2	2
EIF	3	7	7	5	7	3	3	7
EC	3	7	5	3	6	2	3	5
EM	3	7	5	3	6	2	3	5

Fonte: elaborado pela autora, 2021.

Descritor	Catarina	Joaquina	Kinkas	Monalisa	Luiza	Venice	Elenise	Isadora
PLV	5	5	5	4	6	6	6	5
PLT	2	2	2	2	2	2	2	2
PLH	2	2	2	2	2	2	2	2
PLTF	2	2	2	2	2	2	2	2
RAE	5	5	5	5	6	5	5	5
RACE	5	6	5	5	4	5	5	6
RACS	4	4	4	2	1	4	4	4
RAP	4	4	4	6	5	4	5	4
RANL	6	5	4	6	4	4	5	6
LFPR	2	1	1	1	1	1	1	1
LFC	6	5	5	6	6	6	6	5
LFL	6	5	5	4	5	5	5	4
LFCL	5	5	5	6	6	6	6	6
LFIV	5	5	5	6	6	6	6	6
LFIM	4	1	5	4	3	1	5	5
LFPFI	2	2	1	2	1	1	2	1
PC	4	5	4	5	4	5	5	4
PECA	5	3	4	6	2	3	3	3
FLC	4	3	4	3	4	4	4	3
FLD	4	5	5	6	5	5	5	3
FLAP	2	2	1	1	2	1	1	1
FLPE	1	2	2	1	1	3	1	2
FRJCA	3	2	2	1	1	2	1	1
FRT	5	6	5	4	5	5	6	4
FRA	4	5	5	4	6	5	6	4
FRD	5	6	5	4	5	5	6	4
FRCD	4	4	5	5	5	5	5	5
FRF	6	7	6	5	2	6	2	6
FROE	1	1	1	1	2	1	2	1
FROC	1	1	1	1	2	1	1	1
FRTO	5	5	4	5	5	4	6	5
FRCS	3	3	3	5	5	5	5	5
FRPE	2	2	2	1	2	2	2	1
FROLE	1	1	1	1	1	1	1	1
FRCF	6	5	6	2	4	3	2	2
FRACS	5	6	6	6	7	6	7	7
FRTCS	5	2	5	2	5	3	3	3
FRICS	5	5	6	5	6	7	5	6
FRDCS	2	7	2	6	7	2	2	2
FRLE	6	6	5	0	3	3	5	3
FRARP	2	2	1	1	1	1	2	2
FRARF	1	1	1	1	1	1	1	1
FRARCP	1	1	1	1	1	1	1	1
FRNL	5	6	5	6	4	5	4	5
FRTL	6	6	6	4	4	6	5	6

Descritor	Catarina	Joaquina	Kinkas	Monalisa	Luiza	Venice	Elenise	Isadora
FRCP	3	5	5	5	6	8	5	4
FREP	5	5	5	5	6	5	6	5
FRPP	5	5	5	5	5	4	4	6
FRLP	4	4	4	5	5	5	5	5
FRPCP	5	5	5	5	5	5	4	5
FRLCP	5	5	5	6	5	5	5	5
FRFP	5	5	5	6	7	6	6	8
FRCLP	2	2	2	2	1	2	2	2
FRAL	3	2	2	2	2	2	2	2
EIF	7	7	7	5	5	5	7	7
EC	7	5	7	5	5	6	8	6
EM	7	5	7	5	5	6	8	6

Fonte: elaborado pela autora, 2021.