

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA COLEÇÃO DE GENÓTIPOS DE
MACIEIRA DO PROGRAMA DE MELHORAMENTO DO IAPAR**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LÍVIA COSTA MARIANO

GUARAPUAVA-PR

2015

LÍVIA COSTA MARIANO

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA COLEÇÃO DE GENÓTIPOS DE
MACIEIRA DO PROGRAMA DE MELHORAMENTO DO IAPAR**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Paulo Roberto Da Silva
Orientador

Dr. Clandio Medeiros da Silva
Co-orientador

GUARAPUAVA
2015

LÍVIA COSTA MARINAO

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA COLEÇÃO DE GENÓTIPOS DE
MACIEIRA DO PROGRAMA DE MELHORAMENTO DO IAPAR**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

GUARAPUAVA-PR

2015

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

M323f Mariano, Livia Costa
Variabilidade genética de uma coleção de genótipos de macieira do programa de melhoramento do IAPAR / Livia Costa Mariano. -- Guarapuava, 2016
xiii, 49 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, 2015

Orientador: Paulo Roberto da Silva
Coorientador: Clandio Medeiros da Silva
Banca examinadora: Nelson da Silva Fonseca Junior, Renato Vasconcelos Botelho

Bibliografia

1. Agronomia. 2. Produção vegetal. 3. *Malus*. 4. ISSR. 5. Divergência genética. 6. Melhoramento de plantas. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

CDD 634.11

Livia Costa Mariano

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA COLEÇÃO DE GENÓTIPOS DE MACIEIRA DO
PROGRAMA DE MELHORAMENTO DO IAPAR**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 18 de dezembro de 2015.



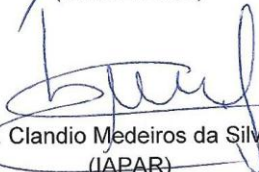
Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva
(UNICENTRO)



Dr. Nelson da Silva Fonseca Junior
(IAPAR)



Prof. Dr. Renato Vasconcelos Botelho
(UNICENTRO)



Dr. Claudio Medeiros da Silva
(IAPAR)

GUARAPUAVA-PR

2015

Aos meus pais, Edson e Maria, pelo incentivo e apoio, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força nas horas difíceis, inclusive de perdas e por me permitir concluir mais uma etapa de minha vida.

Aos meus pais Edson e Maria e a minha irmã por todo amor e incentivo.

A minha amiga Daniela que mesmo distante se fez presente todos os dias e principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Roberto Da Silva pela grande lição de vida, pelos ensinamentos e pela paciência durante o mestrado.

Ao co-orientador Prof. Dr. Clandio Medeiros da Silva por me proporcionar a desenvolver a pesquisa junto ao IAPAR.

Ao meu amigo Adriano pela ajuda nos programas e softwares, pelo apoio moral, pelo carinho e pelas aulas em estatística.

Aos amigos Verônica e Luís por compartilharem da cultura de seus países e por dividirem experiências de vida.

As colegas Renata, Daiane e Gabriela por terem me ensinado a prática laboratorial.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Representação esquemática da região amplificada por um *primer* ISSR associado a uma região de repetição AG. (Fonte: PRADEEP REDDY et al., 2002). 12

CAPÍTULO 1

Figura 1. Padrão de amplificação do *primer* ISSR UBC 836 em 10 genótipos de macieira (*Malus × domestica* Borkh). L indica o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb. A seta na esquerda indica a banda de 600 pb do Ladder. 27

Figura 2. Dendrogramas de 10 genótipos de macieira obtidos com os dados dos 26 *primers* ISSR (2A) e com os nove *primers* ISSR selecionados como os melhores para estudos genéticos na espécie (2B) . O único genótipo que teve o posicionamento alterado no dendrograma foi o 1-80-255. 30

CAPÍTULO 2

Figura 1. Dendrograma dos 60 genótipos de macieira (*Malus × domestica* Borkh) do programa de melhoramento do IAPAR obtido com os dados de nove *primers* ISSR. A linha pontilhada indica o local de corte do dendrograma para formação dos grupos. As letras a direita da figura correspondem aos grupos formados. 41

Figura 2. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) com base em dados obtidos com nove marcadores ISSR em 60 genótipos de macieira (*Malus × domestica* Borkh) do programa de melhoramento do IAPAR. A identificação de cada genótipo de acordo com o código de números aqui utilizado encontra-se na Tabela 1. 42

Figura 3. Determinação do número ótimo de K (clusters-grupos genéticos) em macieira (*Malus × domestica* Borkh) pelo método Bayesiano, com dados obtidos com nove marcadores ISSR. O ponto de intersecção entre o maior valor no eixo Y com o eixo X indica o número ótimo de K (grupos genéticos). 43

Figura 4. Distribuição dos quatro grupos genéticos (K) obtidos pela análise Bayesiana nos 60 genótipos de macieira (*Malus x domestica* Borkh) do programa de melhoramento do IAPAR. 44

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Relação dos 42 *primers* ISSR avaliados em macieira (*Malus × domestica* Borkh) com suas respectivas sequências e temperaturas de pareamento (TP)..... 25

Tabela 2. Relação dos 42 *primers* ISSR utilizados neste estudo com seus respectivos parâmetros em macieira (*Malus × domestica* Borkh). PA - produto de amplificação; NF - número de fragmentos amplificados, % P - porcentagem de polimorfismo, PIC - conteúdo de informação polimórfica, RP - poder de resolução..... 28

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Relação dos genótipos de macieira (*Malus × domestica* Borkh) do Programa de melhoramento do IAPAR - Instituto Agrônômico do Paraná, que possuem a cultivar Anna como parental. 36

Tabela 2. Relação dos genótipos de macieira (*Malus × domestica* Borkh) do Programa de melhoramento do IAPAR - Instituto Agrônômico do Paraná, que não possuem a cultivar Anna como parental e /ou não possuem informação de origem. 37

Tabela 3. Relação dos nove *primers* ISSR utilizados para estimar a variabilidade genética de 60 genótipos de macieira do Programa de Melhoramento do IAPAR, Instituto Agrônômico do Paraná. TA - Temperatura de Anelamento, NTFA - Número Total de Fragmentos amplificados, NFP - Número de Fragmentos Polimórficos e %P - Porcentagem de Polimorfismo..... 39

Tabela 4. Resultados obtidos em estudos com marcadores ISSR em macieira (*Malus × domestica* Borkh). NG - número de genótipos; NP - número de *primers* ISSR utilizados; MFP - média de fragmentos polimórficos; MP- média de polimorfismo. 40

SUMÁRIO

Resumo	i
1. Introdução	1
2. Objetivo	3
2.1. Geral	3
2.2. Específicos	3
3. Referencial teórico	4
3.1. Origem e Genética da Macieira.....	4
3.2. A Cultura da Macieira.....	4
3.3. Limitações do Cultivo da Macieira no Brasil	5
3.4. Melhoramento da Macieira	8
3.5. Marcadores Moleculares e o Melhoramento de Macieira.....	10
3.6. Referências	13
Seleção de <i>primers</i> ISSR para ESTUDOS GENÉTICOS EM MACIEIRA (<i>Malus × domestica</i> Borkh).....	20
VARIABILIDADE Genética de genótipos DE MACIEIRA (<i>Malus × domestica</i> Borkh) do PROGRAMA DE MELHORAMENTO DO IAPAR BASEADA EM MARCADORES ISSR.....	20
Seleção de <i>primers</i> ISSR para ESTUDOS GENÉTICOS EM MACIEIRA (<i>Malus × domestica</i> Borkh).....	21
RESUMO	21
4.1. INTRODUÇÃO.....	22
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.2.1. Material Vegetal e Extração do DNA	23
4.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese	23
Tabela 1.	25
4.2.3. Análises Estatísticas	25
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
Tabela 2.	28
4.4. CONCLUSÕES	30
4.5. REFERÊNCIAS	30

VARIABILIDADE Genética de Genótipos de Macieira (<i>Malus × domestica</i> Borkh) do programa de melhoramento do IAPAR BASEADA EM MARCADORES ISSR	33
RESUMO	33
5.1. INTRODUÇÃO	34
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	36
Tabela 1.	36
Tabela 2.	37
* Seed lines da progênie originada da seleção de nome PX 1033 de polinização aberta desta variedade	38
5.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese	38
5.2.3. Análises estatísticas	38
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
Tabela 3.	39
Tabela 4.	40
5.4. CONCLUSÕES	45
5.5. Referências	46
6. Considerações Finais	49

RESUMO

Lívia Costa Mariano. VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA COLEÇÃO DE GENÓTIPOS DE MACIEIRA DO PROGRAMA DE MELHORAMENTO DO IAPAR

A maçã (*Malus × domestica* Borkh) é uma das frutas mais apreciadas pelo homem. Esta espécie, por ser originária de regiões temperadas, apresenta problemas de adaptação ao Brasil. O Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) desenvolveu alguns genótipos de macieiras com baixa necessidade de frio e resistência a sarna e possui uma coleção de genótipos que ainda não foi caracterizada quanto a variabilidade existente. O uso de técnicas moleculares pode auxiliar nesta caracterização. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo a caracterização genética-molecular da coleção de genótipos do IAPAR (CGI). Para as análises moleculares o DNA de 60 genótipos foi extraído e amplificado utilizando *primers* ISSR. Primeiramente, para seleção dos melhores *primers* para macieira, foram avaliados 42 *primers* em 10 genótipos e calculados os valores de PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica) e RP (Poder de Resolução) após realizadas comparações do agrupamento obtido com os dados de todos os *primers* avaliados com o agrupamento obtido com os dados dos *primers* selecionados. Após, os *primers* selecionados foram avaliados nos 60 genótipos da coleção de genótipos do IAPAR. Com os dados obtidos foram feitas análises de agrupamento, de Coordenadas Principais (PCoA) e análise Bayesiana. Com base nos valores de PIC e RP foram selecionados os *primers* ISSR (UBC-815, UBC-817, UBC-823, UBC-834, UBC-807, UBC-826, UBC-836, UBC-843 e UBC-873). O agrupamento obtido dos 10 genótipos de macieira foi altamente semelhante com os dados dos *primers* selecionados e com os dados de todos os *primers*. A avaliação destes nove *primers* ISSR nos 60 genótipos permitiu observar que a similaridade genética entre os genótipos varia de 11% (entre os genótipos 53-80-149 e Castel Gala) a 80% (entre os genótipos Fuji Suprema e 2-80-59). A similaridade média entre todos os genótipos foi de 46%. O dendrograma obtido resultou na formação de dois grupos, evidenciando alta variabilidade genética. A análise de Coordenadas Principais (PCoA) demonstrou alta variabilidade genética na CGI. A análise Bayesiana evidenciou que esta variabilidade genética está distribuída em quatro grupos genéticos. Os dados aqui obtidos poderão auxiliar os melhoristas na escolha de genótipos para realização de cruzamentos para obtenção de cultivares superiores.

Palavras-chave: *Malus*, ISSR, Divergência Genética, Melhoramento de Plantas.

ABSTRACT

Livia Costa Mariano. GENETIC VARIABILITY OF AN APPLE GENOTYPES COLLECTION OF THE IAPAR BREEDING PROGRAM

The apple (*Malus × domestica* Borkh) is one of the fruits most appreciated by the humans. This species, being originally from temperate regions, has problem in adaptation to Brazil. The Agronomic Institute of Paraná (IAPAR) developed some apple cultivars with low chilling requirements and apple scab resistance and has a collection of genotypes that has not been characterized as the variability. The use of molecular techniques can assist with this characterization. Therefore, this study aimed to genetic-molecular characterization of the apple genotypes from IAPAR. For molecular analyzes DNA from 60 apple accessions was extracted and amplified using ISSR primers. First, to selection of the best primers for apple, 42 primers were run on 10 access and calculated the PIC (Polymorphic information Content) and RP (Resolving Power) values and perform comparisons between cluster obtained with the data of all primers with the cluster obtained with data from the selected primers. After, the selected primers were run on the 60 genotypes from IAPAR. With the data obtained were made cluster analysis, Principal Coordinate Analysis (PCoA) and Bayesian analysis. Based on the PIC and RP values were selected nine ISSR primers (UBC-815, UBC-817, UBC-823, UBC-834, UBC-807, UBC-826, UBC-836, UBC-843 and UBC-873). The clustering obtained of the 10 apple accessions was the same with the data of the nine primer and the data for all the primers. The evaluation of these nine ISSR primers in 60 accessions allowed to observe that the genetic similarity among accessions ranges from 11% (between accesses Castel Gala and 53-80-149) and 80% (between the access Fuji Supreme and 2-80-59). The average similarity between all access was 46%. The obtained dendrogram resulted in the formation of two groups, showing high genetic variability. Principal Coordinate Analysis (PCoA) also showed high genetic variability in genotypes collection from IAPAR. The Bayesian analysis showed that this genetic variability is distributed in four genetic groups. The data obtained here may assist breeders in selecting accesses to performing crosses to obtain superior cultivars.

Keywords: *Malus*, ISSR, Genetic Divergence, Plant Breeding.

1. INTRODUÇÃO

A macieira (*Malus × domestica* Borkh) é uma espécie de clima temperado com provável centro de origem no Cazaquistão, onde são encontradas a maioria dos genótipos silvestres. Devido sua origem em regiões temperadas, a temperatura adequada para indução da brotação e florescimento é abaixo de 7,2°C. Assim sendo, esta espécie apresenta problemas de adaptabilidade às condições climáticas do Brasil. Neste sentido, os programas de melhoramento de macieira do Brasil buscam principalmente por genótipos que apresentam baixa necessidade de frio e também outras características essenciais em uma cultivar, tais como resistência a doenças, produtividade e qualidade do fruto.

A produtividade e qualidade dos frutos está diretamente relacionada com a capacidade adaptativa de uma cultivar ao ambiente onde é cultivada assim como a resistência a doenças.

No Brasil, o IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná) é pioneiro no desenvolvimento de genótipos de macieira que combinam baixa necessidade de frio, resistência a sarna e conseqüentemente, boa produtividade e qualidade de fruto. Neste sentido, o Programa de Melhoramento de Macieira do IAPAR lançou as cultivares Eva-IAPAR 75, Anabela- IAPAR 76, Carícia – IAPAR 77 e IPR Julieta, que se adaptam bem em locais com baixa incidência de frio (de 100 a 500 UF), apresentam resistência a sarna, boa produtividade e qualidade de frutos. Nos cruzamentos realizados que originaram os materiais acima citados e outros cruzamentos feitos por pesquisadores do IAPAR foram obtidos em torno de uma centena de genótipos, sendo que muitos destes ainda não foram caracterizados para necessidade de frio e resistência a sarna.

Visando dar continuidade a avaliação deste genótipos, os melhoristas do IAPAR estão conduzindo a campo avaliações de necessidade de frio, resistência a sarna, produtividade e qualidade de frutos. O objetivo é a identificação de materiais promissores para serem utilizados em novos cruzamentos visando a obtenção de genótipos com as características acima mencionadas.

O uso da biotecnologia associada ao melhoramento convencional possibilita acelerar o desenvolvimento de genótipos que atendem as características tanto do produtor como do mercado com economia de tempo e custos. Este motivo levou a ampla incorporação de técnicas biotecnológicas aos programas de melhoramento ao redor do mundo.

Para a caracterização dos acessos da coleção de genótipos é comum a utilização de avaliações de campo associadas a marcadores moleculares. Neste sentido, o uso de marcadores moleculares baseados em DNA é uma ferramenta potencial desde que se utilize nas análises materiais com conhecida característica desejável. Estes marcadores servem como ancoradores para agrupar indivíduos de acordo com proximidade genética. Estas informações podem ser exploradas pelos melhoristas para o planejamento de cruzamentos visando acelerar a obtenção de genótipos superiores.

Dentre os marcadores disponíveis, os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) são muito utilizados, pois são robustos, apresentam baixo custo, são de fácil condução e possuem alta repetibilidade. Estes marcadores são muito utilizados para avaliar a diversidade genética inter e intraespecífica em diversas espécies, inclusive da família Rosaceae.

Neste sentido, a caracterização genética de genótipos de macieira do Programa de Melhoramento do IAPAR, poderá fornecer informações que quando combinadas com dados de campo, serão úteis aos melhoristas para o planejamento de cruzamentos com maior probabilidade de obtenção de genótipos de macieira superiores, melhores adaptadas às condições sul-brasileiras.

2. OBJETIVO

2.1. Geral

Estimar a variabilidade genética de 60 genótipos macieira do Programa de Melhoramento do IAPAR (Instituto Agronômico do Paraná) utilizando marcadores moleculares ISSR.

2.2. Específicos

- Selecionar os melhores *primers* ISSR com valores superiores de Informação Polimórfica (PIC) e poder de resolução (RP) em macieira;
- Disponibilizar uma matriz de similaridade genética par-a-par dos genótipos de macieira avaliados;
- Estimar o número grupos genéticos a que pertence os genótipos avaliados.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Origem e Genética da Macieira

A macieira (*Malus × domestica* Borkh) pertence à família Rosaceae, subfamília Pomoideae, compreendendo 100 gêneros e em torno de 2.000 espécies espalhadas pelo Mundo (EPAGRI, 2006).

Vários nomes científicos foram dados a macieira ao longo da história, mas em 1803 todas as denominações foram anuladas ficando *Malus x domestica* Borkh, atendendo determinação do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (EPAGRI, 2002).

A macieira é uma planta alógama e diplóide com número de cromossomos $2n=34$. No entanto, dentro do gênero *Malus* são encontradas espécies triplóides, tetraplóides e hexaplóides, que surgiram espontaneamente (PETRI et al., 2008; PEREIRA-LORENZO, S et al., 2009).

Considine et al. (2012) caracterizaram a auto-poliploidização em *Malus* e confirmaram que a aneuploidia excedeu a euploidia e que os óvulos só contribuem para euploidização e os gametas masculinos contribuem para ambos. A aneuploidização contribui para processo evolutivo e diversidade genética com maior base para a seleção natural, o que ajuda na compreensão da evolução, especiação e domesticação da *Malus*.

O centro de origem da macieira é o Cazaquistão e Ásia Central, mais especificamente, o centro de origem primário do gênero *Malus* está localizado na Ásia menor, Cáucaso, Ásia Central, Himalaia Indiano, Paquistão e oeste da China, onde ocorrem pelo menos 25 a 47 espécies nativas de *Malus* (YAN et al., 2008; KELLERHALS, 2009; HOFER et al., 2014). Estudos genéticos com DNA do cloroplasto sobre a domesticação das espécies concluíram que a macieira cultivada atualmente é mais próxima do gênero silvestre *Malus*. Esta conclusão está baseada na identificação de uma sequência de 18 pb que se encontra duplicada tanto nas espécies selvagens do gênero *Malus* como nas espécies cultivadas de maçã (HARRIS et al., 2002).

3.2. A Cultura da Macieira

A produção mundial de maçã no ano de 2013 foi de 123.147.200 t em uma área de 321.668 ha e no mesmo ano o Brasil produziu 1.335.478 t numa área de 38.284 ha (FAO, 2015).

A dispersão da macieira pelo mundo ocorreu por meio dos colonizadores europeus e no Brasil a cultura da macieira teve início na década de 70 (EMBRAPA, 2004). A cultura se dispersou chegando até a região sudeste do país, fato este que ocorreu em 1990, principalmente devido ao lançamento de genótipos mais adaptadas às regiões mais quentes (CHAGAS et al., 2012).

No Brasil, segundo Kreuz et al. (2006), Fachinello (2011) e IBGE (2014), atualmente o cultivo da macieira concentra-se na Região Sul, passando pelo estado do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, e chegando atualmente até os estados de Minas Geras, São Paulo e Bahia.

O estado do Paraná é responsável por 4,4% da produção nacional de maçã, sendo que a região de Palmas representa o 4º pólo da produção nacional. As principais cultivares produzidas no Brasil são Gala e Fuji. No estado do Paraná predomina as cultivares Gala e Eva em função das condições climáticas (EPAGRI, 2002). A produção em 2012 neste estado foi de 47.203 t em uma área colhida de 1.484 ha

Para produtividade adequada da macieira é fundamental que ocorra a quebra da dormência que depende das condições abióticas da região, pois a produção de frutos está relacionada com o número de flores e a área foliar. Em locais que não apresentam as condições climáticas adequadas ao desenvolvimento das plantas, as macieiras podem apresentar má formação de gemas e frutos, enfolhamento lento, encurtamento de internódios, clorose foliar, suscetibilidade a doenças, menor vida útil da planta, aumento na acidez e diminuição da fragrância e sabor do fruto (BRUCKNER, 2002).

Em um experimento realizado por Chagas et al. (2012), conduzido no Leste Paulista, a cultivar Gala apresentou baixa produtividade, demonstrando a necessidade de genótipos adaptados a regiões mais quentes, sendo este, um importante fator a ser buscado pelos programas de melhoramento.

No Brasil, além dos problemas abióticos, a cultura da macieira está sujeita ao ataque de inúmeras doenças, típicas de clima tropical, e dentre estas uma de maior importância é a sarna (FURLAN et al., 2010).

3.3. Limitações do Cultivo da Macieira no Brasil

A maçã é uma fruta de clima temperado (invernos frios com média -5°C e verões amenos com média de 15°C). No entanto, é também cultivada em regiões de clima subtropical ($20-25^{\circ}\text{C}$) e com inverno menos rigoroso ($0-10^{\circ}\text{C}$) e até em clima do semiárido do Nordeste como a cidade de Petrolina-PE. Nestas regiões a macieira vem apresentando problemas de adaptação climática (LOPES et al., 2012).

Para indução de boa produtividade a macieira necessita de pelo menos 60% de exposição à luz e uma certa quantidade de horas de frio. Esta exigência de unidades de frio (HF - horas de frio) acumuladas pode variar de 200 a 1.400 horas dependendo da cultivar. No Brasil, para determinar as unidades de frio um aparelho chamado termógrafo é usado, o qual faz uma leitura calculando o tempo em que a temperatura ficou igual ou abaixo de $7,2^{\circ}\text{C}$ durante o período de Outono e Inverno (Maio a Setembro) e vem sendo utilizado para classificar as cultivares quanto à exigência do frio (EPAGRI, 2002).

Devido a origem em clima temperado, a macieira enfrenta dificuldades de adaptação ao clima Brasileiro. Dentre os principais problemas podemos citar a alta necessidade de frio para floração dos genótipos e alta incidência de sarna da macieira (BERNARDI et al., 2004).

Na busca de variedades mais adaptadas às condições climáticas do Brasil os melhoristas tem procurado desenvolver genótipos que tenham baixa necessidade de frio hibernal (250 a 400 horas de frio), capazes de superar a dormência juntamente com a elevada exigência de horas de calor para o início da floração (POMMER e BARBOSA, 2009).

Para indução de boa produtividade a macieira necessita de pelo menos 60% de exposição à luz e uma certa quantidade de horas de frio. GUAK e NEILSEN (2013) testaram 7 diferentes temperaturas em macieira Gala para quebra de dormência por 1320 horas e obtiveram as melhores curvas de temperatura entre -2°C e $5,5^{\circ}\text{C}$.

Flaishman et al. (2015) e Wisniewski et al. (2008) analisaram a expressão dos genes no ciclo celular e expansão da célula causada pelo stress térmico em *Malus domestica* durante o desenvolvimento do fruto, levando a acreditar que tais informações contribuirão para desenvolvimento de novas cultivares com melhor tolerância a altas temperaturas. Ainda, de acordo com Schmitz et al. (2014), a temperatura tem efeito sobre as distribuições de gemas laterais e zonas de ramificação, no retardo da senescência e consequentemente favorecendo a persistência da folha durante o inverno.

No Brasil a diminuição do número de horas de frio vem sendo observada por vários pesquisadores que acreditam na hipótese de que este evento afeta não só o padrão

fenológico da espécie como também a produtividade das cultivares de clima temperado (ASSAD et al., 2004). A influência da temperatura na fenologia de cultivares de macieira entre várias safras na região de Vacaria foi avaliada em um trabalho onde foram observadas não só a influência da temperatura do ar bem como o número de dias entre os eventos fenológicos à medida em que ocorre a diminuição da temperatura mínima do ar (FIORAVANÇO et al., 2010).

Para sanar os problemas de regiões com condições climáticas inadequadas a produção de macieira, estratégias como utilização de produtos químicos para indução de brotamento e floração vem sendo utilizados na quebra da dormência da macieira (PETRI et al., 2011). Em um trabalho realizado em Londrina-PR, ROBERTO et al. (2006) utilizaram concentrações diferentes de Cianamida hidrogenada na cultivar Eva e obtiveram bom resultado com concentração de 0,50% associada a óleo mineral. Mas devido aos efeitos tóxicos causados por este produto no profissional que faz a aplicação, alternativas vem sendo estudadas e testadas.

Os efeitos tóxicos da Cianamida hidrogenada para os agricultores e a adoção da produção orgânica das macieiras exige a redução e/ou restrição de produtos químicos para a quebra da dormência. Neste sentido, a ausência de alternativas para contornar a insuficiência de horas de frio nos invernos amenos é um fator limitante na produção sustentável de maçã em regiões de inverno ameno (SANHUEZA et al., 2003).

A sarna da macieira é outro problema bastante relevante na produção de maçã no Brasil. Esta doença causada pelo fungo *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., ataca as folhas e frutos da macieira e pode levar a perda de até 100% da produção (BONETI et al., 2002). Nas folhas os primeiros sintomas caracterizam-se pelo aparecimento de manchas de cor verde-oliva nas superfícies abaxial e adaxial. Folhas severamente infectadas caem prematuramente, comprometendo a produção de gemas florais, o crescimento dos frutos e a maturação, com consequências importantes no ciclo seguinte da planta. Já nos frutos jovens esta doença causa deformações, rachaduras e queda precoce do mesmo (BONETI et al., 2002). Quando o fruto consegue atingir a maturação sem queda, a doença ainda apresenta problemas no armazenamento pós-colheita, pois as pequenas manchas da doença, presente nos frutos colhidos, podem aumentar de tamanho durante o armazenamento e levar ao apodrecimento do mesmo (BONETI et al., 2002).

O controle desta doença tem sido feita com a utilização de fungicidas (BONETI et al., 2002). No entanto, além de apresentar problemas para o ambiente, para o agricultor e consumidor, o surgimento de raças do patógeno com resistência aos fungicidas têm

dificultado o controle. Neste sentido, o uso de genótipos resistentes desenvolvidas pelo melhoramento genético é uma das alternativas mais promissoras.

Para reverter esta situação e superar os problemas enfrentados no cultivo da macieira no Brasil, a busca de genótipos mais adaptados às condições climáticas do Brasil que tenham baixa necessidade de frio hiberna (250 a 400 horas de frio a temperaturas abaixo de 7,2°C), resistência a sarna e boas características de mercado torna-se um desafio para o melhoramento.

3.4. Melhoramento da Macieira

O melhoramento genético da macieira visa a busca por maior produtividade, resistência a doenças, conservação do fruto na pós-colheita e atributos exigidos pelo mercado consumidor (PEREIRA-LORENZO, S. et al., 2009; LI et al., 2011; LONGHI et al., 2013)

Para o lançamento de uma cultivar são necessários anos de pesquisa, pois a seleção de características de interesse só podem ser avaliadas após o término do período juvenil que é 4 a 10 anos após o plantio (BRUCKNER, 2002).

A conservação dos recursos genéticos é de fundamental importância para assegurar a disponibilidade de variabilidade genética para as futuras gerações. Vários estudos de identificação de genes de interesse em *Malus* têm sido focados em resistência a doenças como sarna, oídio e características de interesse agrônomo, os quais já foram identificados em vários genótipos de macieira. Esses materiais podem ser utilizados em programas de melhoramento para obtenção de genótipos tolerantes/resistentes e obtenção de espécies adaptadas às necessidades de cultivo (menor necessidade de mão-de-obra e alta produtividade) trazendo segurança ao consumidor e uma economia de tempo e custos de produção (PASA et al., 2013).

O germoplasma pode ser definido como o conjunto de genótipos de uma espécie, ou seja, conjunto de genótipos que podem doar genes para determinada espécie e ser passado de geração em geração (MONTALVÁN e FARIA, 1999). O investimento e desenvolvimento de coleções de germoplasma de macieira está crescendo, visando ao melhoramento genético da espécie, como resistência a doenças e qualidade de frutos (KUMAR et al., 2012; LIANG et al., 2015).

Os Bancos de Germoplasma tem como objetivo o levantamento quantitativo dos genótipos e grupos taxonômicos, obtenção e conservação de genótipos, avaliação dos

materiais bem como sua caracterização. Em 2006 os países com bancos de germoplasma de macieira eram 12 com 21013 genótipos listados (BROWN et al., 2003; LATEUR et al., 2006).

Na Bélgica, foi feito um trabalho com macieiras selvagens (*Malus sylvestris*) com o auxílio de microssatélites e estudos de fatores antropogênicos e fluxo gênico. Os resultados apontaram a fragilidade dos genótipos ancestrais da macieira ao fluxo gênico e a vulnerabilidade à mudança na diversidade de insetos visitantes bem como importância da conservação destes genótipos e sua utilização nos programas de melhoramento (CORNILLE et al., 2015).

Dentre os programas de melhoramento genético de macieira e de conservação do material genético no Brasil estão os Bancos de germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Uva e Vinho), Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) e do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR).

O IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná) desenvolveu as cultivares Anabela, Julieta, Carícia e Eva, que necessitam de baixa incidência de unidade de frio (UF) para floração (100 a 450 UF) e são resistentes a à sarna da macieira. Os cruzamentos que originaram esses genótipos geraram outras dezenas de materiais que não foram avaliados quanto a essas características. Assim, acredita-se que dentre estes materiais há genótipos promissores para uso no melhoramento para obtenção de genótipos com maior adaptabilidade. O uso da biotecnologia associados a avaliações de campo pode auxiliar os melhoristas a identificar e planejar cruzamentos mais promissores para obtenção de materiais superiores de macieira.

A adoção de novas ferramentas da biotecnologia que permitem reduzir o tempo para seleção de novos genótipos de macieira e reduzir o número de genótipos a serem mantidos até a idade reprodutiva bem como a diminuição de mão-de-obra torna-se de suma importância para os programas de melhoramento da macieira (MALIEPAARD et al., 1998; BERNARDI et al., 2004).

Várias pesquisas utilizando técnicas biotecnológicas tem sido realizadas para estudo de coleções de germoplasma de macieira ao redor do mundo como por exemplo podemos citar: identificação de um novo alelo para baixa necessidade de frio em maçãs na América do Sul (MATITYAHU et al., 2005); caracterização do Banco de Germoplasma da Espanha quanto às características agrônômicas ligadas as condições climáticas como seca e baixa necessidade de frio (REIG et al., 2015); incorporação de

materiais selvagens de macieira no Banco de Germoplasma da Coréia para identificação de genes de resistência à doenças (BAEK e CHOI, 2013). Estes trabalhos mostram o quanto a associação da biotecnologia com o melhoramento clássico é vantajoso para o melhoramento genético.

Dentre as técnicas moleculares, o uso de marcadores moleculares tem se destacado no auxílio aos melhoristas, seja para a caracterização de bancos de germoplasma, ou mesmo na seleção assistida (RIBEIRO et al., 2012).

3.5. Marcadores Moleculares e o Melhoramento de Macieira

Os marcadores moleculares são segmentos de DNA capazes de diferenciar dois ou mais indivíduos (MILACH, 1998). Vários marcadores vêm sendo utilizados e desenvolvidos com o intuito de identificar as regiões do genoma ligadas a alguma característica de interesse agrônomo (CAIXETA et al., 2006). Estes marcadores permitem não só a seleção de características de interesse em gerações segregantes precoces mas também a caracterização da variabilidade genética de uma ou mais populações e/ou espécies.

A popularização do uso de marcadores moleculares advém das necessidades da detecção de polimorfismo diretamente no DNA. Os primeiros marcadores utilizados em estudos genéticos, e que são muito utilizados até os dias de hoje, foram características morfológicas, que sofrem influência do ambiente (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995). Com os marcadores moleculares é possível evidenciar diferenças que são herdadas geneticamente entre indivíduos analisando diretamente o DNA (MILACH, 1998). Os marcadores apresentam neutralidade fenotípica, raramente exibem interações epistáticas e cobrem boa parte do genoma (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998).

Diversas técnicas moleculares apresentam a capacidade de avaliarem diferentes regiões do genoma, essas técnicas podem ser baseadas na amplificação por PCR (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*) ou hibridização de ácidos nucleicos. Dentre eles se destacam: RFLP (do inglês: *Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (do inglês: *Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (do inglês: *Amplified Fragment Length Polymorphism*), microssatélites ou SSR (do inglês: *Simple Sequence Repeat*) e ISSR (do inglês: *Inter-Simple Sequence Repeat*). Deve-se ressaltar que cada marcador tem suas características peculiares que devem ser levadas em consideração na escolha do

qual utilizar em uma análise. Os Marcadores RAPD são os mais simples e baratos para serem utilizados, no entanto apresentam problemas sérios de repetibilidade (MILACH, 1999; BUSO et al., 2003; ALZATE-MARIN et al., 2005; BORÉM e FRITSHE NETO, 2013).

Os Marcadores AFLP são extremamente robustos, revelando grande quantidade de *loci* e com alta repetibilidade, no entanto são extremamente elaborados e com custo elevado. Os marcadores microssatélites, uma vez que existam *primers* disponíveis, são de alta repetibilidade, custo médio, no entanto o processo para obtenção dos *primers* é laborioso e caro. Os marcadores ISSR combinam a facilidade do RAPD com a robustez dos marcadores AFLP e SSR sendo assim recomendado para trabalhos que requerem confiabilidade sem alto custo para as análises (MILACH, 1999; BUSO et al., 2003; ALZATE-MARIN et al., 2005; BORÉM e FRITSHE NETO, 2013)

Marcadores ISSR consistem em uma técnica baseada em PCR que envolve a amplificação do DNA com um único *primer* (Figura 1) entre duas regiões de repetição idênticas orientada na direção oposta (PRADEEP REDDY et al., 2002).

O marcador molecular ISSR é uma técnica simples, eficiente e barata. Apresentam herança dominante, e é baseado na amplificação de regiões aleatórias no genoma. Marcadores moleculares ISSR representam uma das classes mais recentes e foi desenvolvida a partir da necessidade de explorar repetições sem a utilização de sequenciamento do DNA (ZIETKIEWICZ et al., 1994; CAIXETA et al., 2006).

Outra característica importante dos marcadores ISSR são os produtos de amplificação que têm aproximadamente 200 - 2000 pb de comprimento facilitando a análise em gel (BORNET e BRANCHARD, 2001; REDDY et al., 2002). Apresenta alta reprodutibilidade, quando comparados com outros marcadores baseados em PCR não específico como, por exemplo, o RAPD (WOLFE e LISTON, 1998).

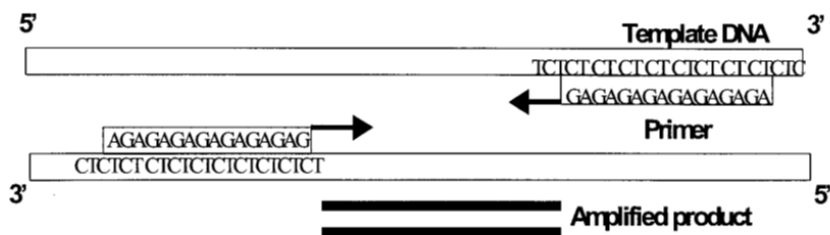


Figura 1. Representação esquemática da região amplificada por um *primer* ISSR associado a uma região de repetição AG. (Fonte: PRADEEP REDDY et al., 2002).

Os marcadores ISSR têm sido utilizados para estimar a diversidade genética inter e intra-específica em diversas espécies. Devido à facilidade de uso, sua abundância e a ampla dispersão no genoma, tem sido empregado para estudar populações relacionadas geneticamente (HUANG e SUN, 2000; DESHPANDE et al., 2001). Além disso, também tem sido utilizado em estudos de *fingerprinting*, seleção assistida por marcadores, filogenia e mapeamento genético.

O uso de marcadores moleculares em macieira tem sido bastante amplo, vão desde a utilização de marcadores de primeira geração como RAPD (ERTURK et al., 2010) até marcadores de terceira geração como SNPs (do inglês *Single Nucleotide Polimorphism*), que conseguem identificar a variação de apenas um nucleotídeo no genoma (CHAGNÉ et al., 2008) e DART (do inglês *Diversity Arrays Technology*) (SCHOUTEN et al., 2012). Estes marcadores estão sendo utilizados para diversos fins como, por exemplo, estudos de diversidade genética em bancos de germoplasma, construção de mapas gênicos, identificação/localização/marcação de caracteres de interesse (conferidos por genes e QTLs), montagem do genoma e variações estruturais no genoma (KHAN et al., 2012; BIANCO et al., 2014; KHAJURIA et al., 2014).

Um bom exemplo do sucesso no uso de marcador em macieira foi a identificação de um marcador SSR associado a resistência a doença causada por *Alternaria Blotch*. A avaliação da progênie do cruzamento de uma cultivar resistente (Huacui) com uma suscetível (Golden Delicious) permitiu identificar um marcador microssatélite associado ao gene de resistência, disponibilizando uma nova ferramenta para seleção assistida para a característica (LI et al., 2011).

Outro exemplo foi a análise de variabilidade genética em cultivares de maçã demonstrando a eficiência dos marcadores ISSR para *Malus* (SMOLIK e KRZYSZTOSZEK, 2010) e o uso de marcadores ISSR associados a marcadores SNPs para mapear gene *Co* em *Malus Pumila Mill* (ZHU et al., 2007).

O uso de marcadores ISSR em frutas de clima temperado como uvas (PEPINELI et al., 2014) e pêras (MONTE-CORVO et al., 2001) apresentaram resultados satisfatórios evidenciando a eficácia do uso de marcadores ISSR.

Embora seja vasta a gama de aplicações dos marcadores moleculares em estudo com macieira, referindo as coleções de germoplasma, uma das principais aplicações é a

caracterização da diversidade genética disponível. Isto se torna extremamente relevante, pois a diversidade genética dos genótipos pode ser relacionada com características agronômicas (FALEIRO, 2007) e é um fator relevante para a elaboração de cruzamentos.

A coleção de genótipos de macieira do Programa de Melhoramento do IAPAR ainda não foi caracterizada com marcadores moleculares. Como estes genótipos são oriundos de cruzamentos envolvendo os mesmos parentais de genótipos já identificados com boas características de baixa necessidade de frio e resistência a sarna, acredita-se que há outros materiais nesta coleção tenham potencial para o desenvolvimento de genótipos com tais características. O uso de marcadores moleculares ISSR associados a avaliações de campo pode auxiliar na identificação destes genótipos e planejamento de cruzamentos promissores.

3.6. Referências

- ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 333-342, 2005.
- ASSAD, E.D.; PINTO, H.S.; ZULLO JUNIOR, J.; ÁVILA, A.D. Impacto das mudanças climáticas no zoneamento agroclimático do café no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1057-1064, 2004.
- BAEK, D.E.; CHOI, C. Identification of resistance gene analogs in Korean wild apple germplasm collections. **Genetics and molecular research**, v. 12, n. 1, p. 483-93, 2013.
- BERNARDI, J.; DENARDI, F.; HOFFMANN, A. Cultivares e porta-enxertos. In: NACHTIGALL, G. R. (Ed.). **Maçã: Produção**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. 32-46 p.
- BIANCO, L.; CESTARO, A.; SARGENT, D.J.; BANCHI, E.; DERDAK, S.; DI GUARDO, M.; SALVI, S.; JANSEN, J.; VIOLA, R.; GUT, I.; LAURENS, F.; CHAGNE, D.; VELASCO, R.; VAN DE WEG, E.; TROGGIO, M. Development and validation of a 20K single nucleotide polymorphism (SNP) whole genome genotyping array for apple (*Malus x domestica* Borkh). **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110377, 2014.
- BONETI, J.I.D.S.; RIBEIRO, L.G.; KATSURAYAMA, Y. Manual de identificação de doenças e pragas da macieira. In. Florianópolis: EPAGRI, 2002. cap. 527-537,p.

BORÉM, A.; FRITSHE NETO, R. **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Viçosa: Suprema, 2013. 336 p.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 3, p. 209-215, 2001.

BROWN, S.K.; MALONEY, K.E.; FERREE, D.C.; WARRINGTON, I.J. Genetic improvement of apple: breeding, markers, mapping and biotechnology. In. **Apples: Botany, production and uses**. Cambridge: CABI Publishing, 2003. 31-59 p.

BRUCKNER, C.H. **Melhoramento de Fruteiras de Clima Temperado**. Viçosa: UFV, 2002. 186 p.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.D.C.; AMARAL, Z.D.S.; BRONDANI, R.V. Marcadores microssatélites em espécies vegetais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 7, p. 46-50, 2003.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. C., E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 9-78 p.

CHAGAS, E.A.; CHAGAS, P.C.; PIO, R.; BETTIOL NETO, J.E.; SANCHES, J.; CARMO, S.A.D.; CIA, P.; PASQUAL, M.; CARVALHO, A.D.S. Produção e atributos de qualidade de cultivares de macieira nas condições subtropicais da região Leste paulista. **Ciência Rural**, v. 42, n. 10, p. 1764-1769, 2012.

CHAGNÉ, D.; GASIC, K.; CROWHURST, R.N.; HAN, Y.; BASSETT, H.C.; BOWATTE, D.R.; LAWRENCE, T.J.; RIKKERINK, E.H.A.; GARDINER, S.E.; KORBAN, S.S. Development of a set of SNP markers present in expressed genes of the apple. **Genomics**, v. 92, n. 5, p. 353-358, 2008.

CORNILLE, A.; FEURTEY, A.; GELIN, U.; ROPARS, J.; MISVANDERBRUGGE, K.; GLADIEUX, P.; GIRAUD, T. Anthropogenic and natural drivers of gene flow in a temperate wild fruit tree: a basis for conservation and breeding programs in apples. **Evolutionary Applications**, v. 8, n. 4, p. 373-384, 2015.

DESHPANDE, K.U.; APTE, G.S.; BAHULIKAR, R.A.; LAGU, M.D.; KULKARNI, B.O.; SURESH, H.S.; SINGH, N.P.; RAO, M.K.; GUPTA, V.S.; PANT, A.; RENJEKAR, P.K. Genetic diversity across natural populations of montane plant species from the Western Ghats, India revealed by inter-simple sequence repeats. **Molecular Ecology**, n. 10, p. 2397-2408, 2001.

EMBRAPA. **Manual de segurança e qualidade para a cultura da maçã**. Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004. 81 p.

EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. 743 p.

EPAGRI. **A cultura da macieira**. 2. ed. Florianópolis: 2006.

ERTURK, U.; AKCAY, M.E.; ERTURK, U.; AKCAY, M.E. Genetic Variability in Accessions of 'Amasya' Apple Cultivar Using RAPD Markers. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 38, n. 3, p. 239-245, 2010.

FACHINELLO, J.C.; PASA, M.D.S.; SCHMTIZ, J.D.; BETEMPS, D.L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. S1, p. 109-120, 2011.

FALEIRO, F.G. **Marcadores Genético-Moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FLAISHMAN, M.A.; PELES, Y.; DAHAN, Y.; MILO-COCHAVI, S.; FRIEMAN, A.; NAOR, A. Differential response of cell-cycle and cell-expansion regulators to heat stress in apple (*Malus domestica*) fruitlets. **Plant Science**, v. 233, p. 82-94, 2015.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. 2. ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1995.

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

FIORAVANÇO, J.C.; CZERMAINSKI, A.B.C.; ALVES, S.A.M. **Condições meteorológicas e sua influência na safra de maçã 2011/12 na região de Vacaria, RS**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. 8 p. (Comunicado Técnico 123).

FURLAN, C.R.C.; DANTAS, A.C.D.M.; DENARDI, F.; BECKER, W.F.; MANTOVANI, A. 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, p. 507-514, 2010.

GUAK, S.; NEILSEN, D. Chill unit models for predicting dormancy completion of floral buds in apple and sweet cherry. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 54, n. 1, p. 29-36, 2013.

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

HOFER, M.; ELDIN ALI, M.A.M.S.; SELLMANN, J.; PEIL, A. Phenotypic evaluation and characterization of a collection of *Malus* species.(Report). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 61, n. 5, p. 943, 2014.

HUANG, J.; SUN, S.M. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, n. 7, p. 1050-1060, 2000.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal: Lavouras Permanentes**, 2014. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2012/default_perm_xls.shtm >. Acesso em: 11-01-2015.

KELLERHALS, M. Introduction to Apple (*Malus × domestica*). In: FOLTA, K. M. e GARDINER, S. E. (Eds.). **Genetics and Genomics of Rosaceae**. New York: Springer, v.6, 2009. cap. 4, 73-84 p. (Plant Genetics and Genomics: Crops and Models).

KHAJURIA, Y.P.; KAUL, S.; WAFAI, B.; DHAR, M.K. Screening of apple germplasm of Kashmir Himalayas for scab resistance genes. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 448-454, 2014.

KHAN, M.A.; HAN, Y.; ZHAO, Y.F.; TROGGIO, M.; KORBAN, S.S. A multi-population consensus genetic map reveals inconsistent marker order among maps likely attributed to structural variations in the apple genome. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e47864, 2012.

KREUZ, C.L.; SOUZA, A.; PETRI, J.L. Impacto da intensificação da densidade de plantio na rentabilidade em duas cultivares de macieira em Fraiburgo-SC. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 240-243, 2006.

KUMAR, S.; BINK, M.; VOLZ, R.; BUS, V.; CHAGNÉ, D. Towards genomic selection in apple (*Malus × domestica* Borkh.) breeding programmes: Prospects, challenges and strategies. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2012.

LATEUR, M.; MAGGIONI, L.; LIPMAN, E. **Report of a Working Group on Malus/Pyrus**. Third Meeting, 2006. Rome. Bioversity International, 25-27 de outubro de 2006. p.25-27.

LI, Y.; ZHANG, L.Y.; ZHANG, Z.; CONG, P.H.; CHENG, Z.M. A Simple Sequence Repeat Marker Linked to the Susceptibility of Apple to *Alternaria* Blotch Caused by *Alternaria alternata* Apple Pathotype. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 136, n. 2, p. 109-115, 2011.

LIANG, W.; DONDINI, L.; DE FRANCESCHI, P.; PARIS, R.; SANSAVINI, S.; TARTARINI, S. Genetic Diversity, Population Structure and Construction of a Core Collection of Apple Cultivars from Italian Germplasm. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 33, n. 3, p. 458-473, 2015.

LONGHI, S.; CAPPELLIN, L.; GUERRA, W.; COSTA, F. Validation of a functional molecular marker suitable for marker-assisted breeding for fruit texture in apple (*Malus × domestica* Borkh.). **Molecular Breeding**, v. 32, n. 4, p. 841-852, 2013.

LOPES, P.R.C.; OLIVEIRA, I.V.D.M.; SILVA-MATOS, R.R.S.D.; CAVALCANTE, Í.H.L. Caracterização fenológica, frutificação efetiva e produção de maçãs 'Eva' em clima semiárido no nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 4, p. 1277-1283, 2012.

MALIEPAARD, C.; ALSTON, F.; VAN ARKEL, G.; BROWN, L.; CHEVREAU, E.; DUNEMANN, F.; EVANS, K.; GARDINER, S.; GUILFORD, P.; VAN HEUSDEN, A. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, n. 1, p. 60-73, 1998.

MATITYAHU, A.; STERN, R.A.; SCHNEIDER, D.; GOLDWAY, M. Molecular identification of a new apple S-RNase - S29 - Cloned from 'Anna', a low-chilling-requirement cultivar. **HortScience**, v. 40, n. 3, p. 850-851, 2005.

MILACH, S. **Marcadores de DNA em Plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141 p.

MILACH, S. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina: Embrapa Semiárido**, 1999.

MONTALVÁN, R.M.; FARIA, R.T. Variabilidade genética e germoplasma. In: DESTRO, D. e MONTALVÁN, R. M. (Eds.). **Melhoramento Genético de Plantas**. Londrina: UEL, 1999. 27-38 p.

MONTE-CORVO, L.; GOULAO, L.; OLIVEIRA, C. ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, v. 126, n. 5, p. 517-522, 2001.

PASA, M.D.S.; CASTRO, C.M.; SILVA, C.P.D. Recursos genéticos de macieira. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 18, n. 1, p. 44-53, 2013.

PEPINELI, A.C.; STRIOTO, D.K.; MARINELLI, G.C.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M. SELECTION OF PRIMERS FOR ANALYSIS OF INTER SIMPLE SEQUENCE REPEATS IN THE 'ITALIA' CV. (*Vitis vinifera* L.). **Ciencia E Tecnica Vitivinicola**, v. 29, n. 2, p. 81-87, 2014.

PEREIRA-LORENZO, S.; RAMOS-CABRER, A.; FISCHER, M. Breeding apple (*Malus x domestica* Borkh). In. **Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species**. Springer, 2009. 33-81 p.

PEREIRA-LORENZO, S.; RAMOS-CABRER, A.M.; FISCHER, M. Breeding Apple (*Malus x Domestica* Borkh). In. **Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species**. Springer New York, 2009. cap. 2, 33-81 p.

PETRI, J.L.; HAWERROTH, F.J.; LEITE, G.B. Fenologia de espécies silvestres de macieira como polinizadora das cultivares Gala e Fuji. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, p. 868-874, 2008.

PETRI, J.L.; LEITE, G.B.; COUTO, M.; FRANCESCATTO, P. Avanços na cultura da macieira no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 48-56, 2011.

POMMER, C.V.; BARBOSA, W. The impact of breeding on fruit production in warm climates of Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 612-634, 2009.

PRADEEP REDDY, M.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9-17, 2002.

REDDY, M.P.; SARLA, N.; REDDY, E.A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. **Euphytica**, n. 128, p. 9-17, 2002.

REIG, G.; BLANCO, Á.; CASTILLO, A.M.; GOGORCENA, Y.; MORENO, M.Á. Phenotypic diversity of Spanish apple (*Malus x domestica* Borkh) accessions grown at the vulnerable climatic conditions of the Ebro Valley, Spain. **Scientia Horticulturae**, v. 185, n. 0, p. 200-210, 2015.

RIBEIRO, J.M.; PINTO, M.D.S.T.; D'ISEP, M.D.S.P.; OLIVEIRA, E.A.G.D. **Produção e Análise de Plantas Transgênicas: conceitos e informações básicas**. Guaíba: Agrolivros, 2012. 80 p.

ROBERTO, S.R.; KAGUEYAMA, M.H.; SANTOS, C.E.D. Indução da brotação da macieira 'Eva' em região de baixa incidência de frio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 128-130, 2006.

SANHUEZA, R.M.V.; ANDRIGUETO, J.R.; KOSOSKI, A.R. **Situação atual da produção integrada de frutas no Brasil**. In: MELO, G. W. B. e SEBBEN, S. S., Anais do 5 SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS, 2003. Bento Gonçalves. Embrapa-CNPV. p.23-25.

SCHMITZ, J.D.; GUÉDON, Y.; HERTER, F.G.; LEITE, G.B.; LAURI, P.-É. Exploring bud dormancy completion with a combined architectural and phenological analysis: the case of apple trees in contrasting winter temperature conditions. **American journal of botany**, v. 101, n. 3, p. 398, 2014.

SCHOUTEN, H.J.; VAN DE WEG, W.E.; CARLING, J.; KHAN, S.A.; MCKAY, S.J.; VAN KAAUWEN, M.P.W.; WITTENBERG, A.H.J.; KOEHORST-VAN PUTTEN, H.J.J.; NOORDIJK, Y.; GAO, Z.S.; REES, D.J.G.; VAN DYK, M.M.; JACCOUD, D.; CONSIDINE, M.J.; KILIAN, A. Diversity arrays technology (DArT) markers in apple for genetic linkage maps. **Molecular Breeding**, v. 29, n. 3, p. 645-660, 2012.

SMOLIK, M.; KRZYSZTOSZEK, O. Evaluation of genetic variability in chosen apple (*Malus x domestica* Borkh.) cultivars by ISSR-PCR analysis. **Russian Journal of Genetics**, v. 46, n. 7, p. 819-827, 2010.

WISNIEWSKI, M.; BASSETT, C.; NORELLI, J.; MACARISIN, D.; ARTLIP, T.; GASIC, K.; KORBAN, S. Expressed sequence tag analysis of the response of apple (*Malus x domestica* 'Royal Gala') to low temperature and water deficit. **Physiologia Plantarum**, v. 133, n. 2, p. 298-317, 2008.

WOLFE, A.D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematic and evolutionary biology. In: SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E., et al (Eds.). **Molecular systematic of plants: DNA sequencing**. New York: Kluwer, 1998. 1-42 p.

YAN, G.; LONG, H.; SONG, W.; CHEN, R. Genetic polymorphism of *Malus sieversii* populations in Xinjiang, China. **An International Journal**, v. 55, n. 1, p. 171-181, 2008.

ZHU, Y.; ZHANG, W.; LI, G.; WANG, T. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping the Co gene in apple (*Malus pumila* Mill.). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 371-376, 2007.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 173-183, 1994.

A parte experimental desta dissertação será apresentada em dois capítulos conforme segue:

Capítulo 1:

SELEÇÃO DE *PRIMERS* ISSR PARA ESTUDOS GENÉTICOS EM MACIEIRA
(*Malus × domestica* Borkh)

Capítulo 2:

VARIABILIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE MACIEIRA (*Malus × domestica*
Borkh) DO PROGRAMA DE MELHORAMENTO DO IAPAR BASEADA EM
MARCADORES ISSR

4. CAPITULO 1

SELEÇÃO DE *PRIMERS* ISSR PARA ESTUDOS GENÉTICOS EM MACIEIRA

(*Malus × domestica* Borkh)

RESUMO

Vários marcadores moleculares estão disponíveis para caracterização da variabilidade genética, dentre estes destaca o marcador ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*). Na literatura há um grande número de *primers* ISSR e a utilização de todos estes em um estudo torna-se inviável pelo tempo e custo das análises. Neste sentido a seleção de *primers* mais robustos se faz necessária. Este trabalho teve como objetivo selecionar entre 42 *primers* ISSR, os mais robustos para estudos genéticos em macieira. Para as análises, o DNA de 10 genótipos foi extraído e avaliado com 42 *primers* ISSR. Para cada *primer* foi calculado o PIC (Índice de Informação Polimórfica) e o RP (Poder de Resolução). Dos 42 *primers* testados, 26 (61,90%) apresentaram amplificação de qualidade e foram considerados nas análises. O número total de fragmentos amplificados pelos 26 *primers* foi de 283, resultando em média 11,23 bandas por *primer*. Destes fragmentos, 113 foram polimórficos com média de polimorfismo de 38,69%. Os valores de PIC variaram de 0,18 (UBC 889) a 0,47 (UBC 836) com média de 0,38. O RP variou de 0,4 (UBC 889 e UBC 890) a 6,2 (UBC 815) com média de 2,48 e a correlação entre os valores de PIC e RP foi de 0,53. Com base nestes valores foram selecionados os nove *primers* mais robustos em macieira (UBC 815, UBC 817, UBC 823, UBC 834, UBC 807, UBC 826, UBC 836, UBC 843 e UBC 873). O dendrograma dos 10 genótipos de macieira obtido utilizando os nove *primers* selecionados apresentou a mesma distribuição dos genótipos quando comparado com o dendrograma obtido utilizando todos os 26 *primers*. Estes dados mostram que a seleção de *primers* ISSR utilizando os índices PIC e RP foi eficiente em macieira. Em futuros estudos de variabilidade genética na espécie, a utilização destes nove *primers* produzirá resultados robustos e com economia de em torno de 70% de tempo e recursos nas análises de laboratório.

Palavra-chave: *Inter-Simple Sequence Repeat*, Conteúdo de informação de polimorfismo, Poder de resolução, Polimorfismo

4.1. INTRODUÇÃO

Na literatura há uma grande quantidade de *primers* ISSR (do inglês *Inter-Simple Sequence Repeat*) disponíveis. A utilização de todos estes *primers* para estudos genéticos é inviável, pois torna o trabalho caro e demorado. Neste sentido, é necessário realizar a seleção dos melhores *primers* para serem utilizados. A eficiência nesta seleção é decisiva para a obtenção de resultados robustos, neste sentido o uso dos índices corretos nesta etapa é fundamental (PREVOST e WILKINSON, 1999; ROLDAN-RUIZ et al., 2000).

Um marcador eficiente é aquele capaz de diferenciar indivíduos par-a-par, assim como indivíduos dentro de populações. Ainda, para um bom marcador a quantidade de polimorfismo que este detecta entre os genótipos sob investigação é um fator que deve ser considerado (GRATIVOL et al., 2011). Dentre os atributos disponíveis para seleção de *primers* o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) (ROLDAN-RUIZ et al., 2000) e o poder de resolução (RP) (PREVOST e WILKINSON, 1999) se destacam devido à complementaridade das características que estes demonstram no *primer*.

Os valores de PIC, para marcadores dominantes, podem variar de 0 a 0,5. Valores de PIC de 0,5 indicam a presença do fragmento em 50% dos genótipos e ausência em outros 50% (ROLDAN-RUIZ et al., 2000). Portanto, quanto mais próximo de 0,5 o valor de PIC, maior será a capacidade de o *primer* diferenciar um grande grupo de indivíduos e estimar a diversidade e variabilidade genética dentro e entre grupos de genótipos.

Outra característica importante de um bom marcador é a capacidade de diferenciar genótipos par-a-par. O poder de resolução (RP) possui diversas aplicações e quanto maior o valor, maior o poder de distinção entre os genótipos (PREVOST e WILKINSON, 1999). O cálculo de RP considera indiretamente o número de bandas polimórficas de um *primer*, considerando também em quantos genótipos as bandas estão presentes.

Os índices PIC e RP tem sido utilizados para seleção de *primers* em estudos de diversidade genética em *Malus* (POTTS et al., 2012; FAKHRIAN et al., 2014), *Pyrus* (DEQUIGIOVANNI et al., 2012) e gergelim (YEPURI et al., 2013).

O princípio de detecção de robustez de um marcador utilizado pelo PIC e RP é diferente. No PIC o marcador será melhor quando um determinado fragmento estiver presente em aproximadamente 50% dos genótipos em análise, conduzindo a um elevado poder em separar grupos de genótipos. Já, o RP leva em consideração o quanto determinado marcador é capaz de diferenciar um genótipo dos demais. Assim, o uso de ambos os índices permite separar grupos de genótipos assim como genótipos individuais.

Para macieira cultivada estes índices nunca foram utilizados, assim o presente trabalho teve como objetivo avaliar a robustez dos índices PIC e RP para a seleção dos melhores *primers* ISSR para estudos genéticos da espécie.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Material Vegetal e Extração do DNA

Para as análises moleculares foram coletadas quatro folhas jovens de 10 genótipos de macieira coletados aleatoriamente na Estação Experimental do IAPAR em Palmas, PR (26°27'56'' S e 51°58'33'' O). De cada genótipo foram coletadas folhas jovens e mantidas em sílica gel até o momento da extração de DNA.

Para extração de DNA, as folhas foram maceradas em nitrogênio líquido até formar um pó bem fino. O protocolo utilizado foi o descrito por DOYLE e DOYLE (1987). Foram pesados 100mg de tecido vegetal e colocados em microtubos de 1,5 mL e acrescentado 700 µL de tampão constituído por: 20mM de EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid); 0,1 M de Tris-HCl pH 8,0 [tris(hydroxymethyl)aminomethane]; 1,4 M NaCl (Sodium chloride); 2% de CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide); e 2% de PVP (Polyvinilpyrrolidone) e 2% de β-mercaptoetanol. Os microtubos foram incubados em banho-maria por 45 min a 65°C, agitados manualmente a cada 10 minutos. Após transcorrido os 45 min, foi acrescentado às amostras clorofórmio-álcoolisoamílico (24:1) e centrifugado por 10 minutos a 12.000 RPM, por duas vezes. O DNA foi precipitado com 700 µl de isopropanol gelado e subsequentemente centrifugado por 10 minutos a 12.000 RPM, seguidas de diversas lavagens com etanol gelado 99% e 75%, para a obtenção de amostras livres de contaminantes. Depois de seco o DNA foi ressuspensão em 200 µl de água ultrapura, tratado com RNase a 10 mg mL⁻¹ a 37°C por 1 hora. Após, o DNA foi precipitado com 10 µl de acetato de sódio 3M e 200 µl de etanol 99% gelado e realizadas sucessivas lavagens com etanol. Após centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm. Depois de seco o DNA foi ressuspensão em água ultrapura e armazenado a -20°C até o momento da utilização. As amostras foram quantificadas por eletroforese em gel de agarose 0,9% e coradas com brometo de etídio (0,5 µg mL⁻¹), utilizando como padrão quantidades conhecidas do DNA do Fago λ (50; 100; 200 e 400 ng).

4.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese

Para as reações de amplificação do DNA foram utilizados 42 *primers* ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC), Vancouver, Canadá (Tabela 1).

As reações de amplificação do DNA de cada genótipo via PCR, foram conduzidas em volume final de 12,5 µL contendo: 20ng de DNA, 0,2µM de *primer*, 200µM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl₂ e 1U de TaqDNA Polimerase e de tampão para PCR 1×. Para a amplificação o termociclador foi programado com um passo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 90°C por 45 segundos, temperatura de anelamento do *primer* (Tabela 1) por 30 segundos e 72°C por 60 segundos. Foi adicionado um passo final de 72°C por 10 minutos para extensão final dos fragmentos.

Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,8% corados com brometo de etídio (0,5 µg mL⁻¹). Para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb. O resultado da eletroforese foi visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado com sistema digital.

Tabela 1. Relação dos 42 *primers* ISSR avaliados em macieira (*Malus × domestica* Borkh) com suas respectivas seqüências e temperaturas de pareamento (TP).

Primer	Seqüência*	TP °C	Primer	Seqüência*	TP °C
UBC 807	(AG) ₈ T	55	UBC 848	(CA) ₈ RG	55
UBC 808	(AG) ₈ C	50	UBC 852	(CT) ₈ RA	52
UBC 809	(AT) ₈ T	55	UBC 855	(AC) ₈ YT	50
UBC 810	(GA) ₈ T	52	UBC 856	(AC) ₈ YA	55
UBC 811	(GA) ₈ C	52	UBC 857	(AC) ₈ YG	54
UBC 813	(CT) ₈ T	50	UBC 858	(TG) ₈ RT	50
UBC 814	(CT) ₈ A	50	UBC 859	(TG) ₈ RC	55
UBC 815	(CT) ₈ G	52	UBC 860	(TG) ₈ RA	52
UBC 817	(CA) ₈ A	52	UBC 861	(ACC) ₆	52
UBC 820	(GT) ₈ T	52	UBC 864	(ATG) ₆	55
UBC 822	(TC) ₈ A	53	UBC 866	C(TCC) ₅ TC	55
UBC 823	(TC) ₈ C	52	UBC 868	(GGA) ₆	53
UBC 824	(TC) ₈ G	50	UBC 873	(GACA) ₄	50
UBC 826	(AC) ₈ C	52	UBC 878	GGA(TGGA) ₃ T	52
UBC 827	(AC) ₈ G	50	UBC 881	(GGGGT) ₃	53
UBC 828	(TG) ₈ A	50	UBC 886	VDV(CT) ₇	55
UBC 834	(AG) ₈ YT	52	UBC 889	DBD(AC) ₇	54
UBC 835	(AG) ₈ YC	54	UBC 890	VHV(GT) ₇	54
UBC 836	(AG) ₈ YA	53	UBC 891	HVH(TG) ₇	54
UBC 840	(GA) ₈ YT	54	UBC 899	CATGGTGTGG TCATTGTTCCA	55
UBC 843	(CT) ₈ RA	54	UBC 900	ACTTCCCCACA GGTTAACACA	55

* Y = (C,T); R = (A, G); H = (A, C, T); B = (C, G, T); V = (A, C, G); D = (A, G, T)

4.2.3. Análises Estatísticas

Cada loco amplificado foi analisado de acordo com a presença (1) ou ausência (0) da banda. As informações acerca do polimorfismo seguiram o critério de Ott (1992) que considera os fragmentos presentes em mais de 5% ou em menos de 95% dos indivíduos como polimórficos. A porcentagem de polimorfismo foi calculada para cada *primer* dividindo o número de fragmentos polimórficos pelo número total de fragmentos amplificados.

Para identificar os melhores *primers* ISSR em macieira, foram calculados para cada *primer* o PIC e o RP.

Os valores de PIC foram calculados de acordo com ROLDAN-RUIZ et al. (2000), pela seguinte equação:

$$PIC_i = 2 f_i(1-f_i)$$

onde

f_i = frequência dos fragmentos presentes no marcador no mesmo *locus*

1-fi = frequência de fragmentos ausentes no marcador no mesmo *locus*

O RP de cada *primer* foi calculado de acordo com PREVOST e WILKINSON (1999):

$$RP = \sum l_b$$

onde

$$l_b = 1 - [2 \times | 0,5 - p |], \text{ sendo:}$$

p = proporção de genótipos que contém a banda.

A seleção dos melhores *primers* para estudos de variabilidade genética de macieira foi conduzida de forma que primeiramente foram organizados os *primers* de acordo com os maiores valores de cada um dos dois índices. Em seguida foram selecionados os *primers* que apresentaram melhores valores de PIC e RP.

Para avaliar a aplicabilidade dos índices PIC e RP e a robustez dos *primers* ISSR selecionados, foi estimada a variabilidade genética e desenhado o dendrograma dos 10 genótipos de macieira utilizando separadamente todos os *primers* e somente os *primers* considerados melhores. Para o agrupamento dos genótipos foi calculado o coeficiente de similaridade de Jaccard utilizando o software NTSYS 2.2 (Numerical Taxonomy Analyses System) (ROHLF, 2008) e o dendrograma de similaridade entre os genótipos de macieira foi obtido pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). A robustez dos nove *primers* considerados melhores foi avaliada por análise comparativa do agrupamento dos genótipos de macieira obtidos com estes *primers* com os agrupamentos obtidos com todos os *primers*.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 42 *primers* testados, 26 (61,90%) apresentaram amplificação (Tabela 2), produzindo bandas com bom padrão de amplificação. A figura 1 mostra o padrão de amplificação do *primer* ISSR UBC 836 nos 10 genótipos de macieira avaliados.

O número total de fragmentos amplificados pelos 26 *primers* foi de 292, resultando em média 11,23 bandas por *primer*. Destes fragmentos, 113 foram polimórficos gerando média de polimorfismo de 38,69%. O *primer* UBC 856 mostrou-se com o menor número de bandas, apresentando apenas quatro bandas amplificadas enquanto que o *primer* UBC 868 apresentou 22 bandas. O tamanho das bandas variou de 210 pb (UBC 873) a 1600 pb (UBC 856). Do total de bandas amplificadas, 113 foram

polimórficas. A média de polimorfismo por *primer* variou de 9,09 % (UBC 827 e UBC 890) e 83,33% (UBC 860 e UBC 889).

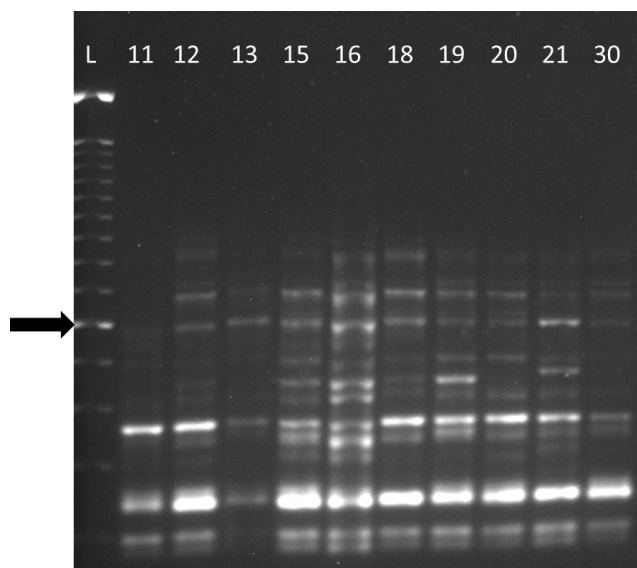


Figura 1. Padrão de amplificação do *primer* ISSR UBC 836 em 10 genótipos de macieira (*Malus × domestica* Borkh). L indica o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb. A seta na esquerda indica a banda de 600 pb do Ladder.

Os valores de PIC calculados neste estudo variaram de 0,18 (UBC 889) a 0,47 (UBC 836) com média de 0,38. O RP variou de 0,4 (UBC 889 e UBC 890) a 6,2 (UBC 815) com média de 2,48 e a correlação entre os valores de PIC e RP foi de 0,53.

Para a seleção dos *primers* ISSR mais informativos para macieira foram levados em consideração os melhores valores de PIC e RP. Com isso foram selecionados os 9 melhores *primers* (Tabela 2), sendo os *primers* UBC 815, UBC 817, UBC 823 e UBC 834 selecionados com base nos valores de PIC e os *primers* UBC 807, UBC 826, UBC 836, UBC 843 e UBC 873 com base nos valores de RP.

De acordo com Anderson et al. (1993) e Roldan-Ruiz et al. (2000) e o PIC representa a probabilidade de se encontrar o marcador (banda) nos estados de presença ou ausência. Nos marcadores dominantes os valores de PIC variam de zero (para marcadores monomórficos) até 0,50 para aqueles estiverem ausentes na metade da amostra e presente na outra metade. Ou seja, quanto mais próximo de 0,50 maior a eficiência do marcador para determinar a variabilidade genética.

Tabela 2. Relação dos 42 *primers* ISSR utilizados neste estudo com seus respectivos parâmetros em macieira (*Malus × domestica* Borkh). PA - produto de amplificação; NF - número de fragmentos amplificados, % P - porcentagem de polimorfismo, PIC - conteúdo de informação polimórfica, RP - poder de resolução.

Primer*	PA	NF	% P	PIC	RP
UBC 807	✓	20	45,00	0,34	3,00
UBC 808	-	-	-	-	-
UBC 809	-	-	-	-	-
UBC 810	-	-	-	-	-
UBC 811	-	-	-	-	-
UBC 813	✓	9	44,44	0,36	2,00
UBC 814	✓	9	22,22	0,33	1,00
UBC 815	✓	11	81,81	0,42	6,20
UBC 817	✓	10	70,00	0,39	4,00
UBC 820	✓	7	57,14	0,44	2,6
UBC 822	✓	12	25,00	0,29	1,40
UBC 823	✓	13	30,76	0,43	2,8
UBC 824	-	-	-	-	-
UBC 826	✓	11	54,54	0,4	4,00
UBC 827	✓	11	9,09	0,3	0,80
UBC 828	-	-	-	-	-
UBC 834	✓	18	38,88	0,45	5,4
UBC 835	✓	12	33,33	0,42	2,40
UBC 836	✓	13	30,76	0,47	3,2
UBC 840	-	-	-	-	-
UBC 843	✓	12	66,66	0,37	4,2
UBC 848	-	-	-	-	-
UBC 852	✓	6	50,00	0,41	2,00
UBC 855	✓	14	21,42	0,47	2,40
UBC 856	✓	4	50,00	0,46	1,6
UBC 857	✓	12	33,33	0,44	2,00
UBC 858	✓	8	50,00	0,37	2,00
UBC 859	-	-	-	-	-
UBC 860	✓	6	83,33	0,37	2,4
UBC 861	-	-	-	-	-
UBC 864	-	-	-	-	-
UBC 866	-	-	-	-	-
UBC 868	✓	22	13,63	0,39	2,00
UBC 873	✓	16	31,25	0,40	3,00
UBC 878	-	-	-	-	-
UBC 881	✓	9	33,33	0,37	1,80
UBC 886	-	-	-	-	-
UBC 889	✓	6	83,33	0,18	0,40
UBC 890	✓	11	9,09	0,32	0,40
UBC 891	✓	10	30,00	0,37	1,60
UBC 899	-	-	-	-	-
UBC 900	-	-	-	-	-

* *primers* em negrito foram considerados os melhores para estudos genéticos em Macieira de acordo com os critérios utilizados neste trabalho. ✓ com amplificação - sem amplificação

Prevost e Wilkinson (1999) definem que o RP do *primer* é um índice que caracteriza e indica seu potencial discriminatório, o qual está relacionado com a capacidade de separar genótipos de um determinado grupo. Não há um valor excelente estabelecido para este índice, portanto os *primers* são classificados de acordo com os maiores valores de RP, sendo estes os que apresentam maior capacidade de discriminar os genótipos.

Trabalhos disponíveis na literatura também mostram elevada variação nos valores de RP para *primers* ISSR em *Jathopha curcas* (TATIKONDA et al., 2009; GRATIVOL et al., 2011) e *Ipomoea batatas* (CAMARGO et al., 2013).

A seleção de *primers* só pode ser considerada eficaz quando os *primers* selecionados para uma espécie apresentam resultados semelhantes com os resultados obtidos com o uso de todos os *primers* disponíveis. Normalmente, em um estudo de diversidade genética, um elevado número de *primers* é utilizado aumentando os custos e o tempo para obtenção de resultados. ISSHIKI et al. (2008) relataram que é possível diminuir a quantidade de *primers* sem perder a eficiência nos resultados. Esses autores testaram 100 *primers* ISSR para a discriminação de oito cultivares de *Solanum melongena* e concluíram que 34 *primers* seriam suficientes para diferenciar com robustez os genótipos.

Na presente pesquisa, a partir da estimativa dos índices de PIC e RP, foram selecionados os nove *primers* ISSR mais informativos para macieira (Tabela 2). Os resultados obtidos com estes *primers* comparados com os resultados obtidos com todos os *primers* mostram que a similaridade genética e o agrupamento dos 10 genótipos de macieira utilizando os dados dos 26 *primers* e o agrupamento obtido utilizando os nove *primers* selecionados com base nos valores de PIC e RP foram muito semelhantes. Com os dados dos 26 *primers* a similaridade genética variou de 0,14 a 0,49 com média entre todos genótipos de 0,37 e com os dados dos nove *primers* selecionados a similaridade média variou de 0,16 a 0,54 com média também de 0,37. A topologia do dendrograma permaneceu a mesma (Figura 2A e 2B) com apenas o genótipo 1-80-255 tendo troca significativa de posicionamento no dendrograma. Estes dados mostram que o PIC e o RP são índices muito eficientes para a seleção de *primers* ISSR em macieira e que para a obtenção de dados robustos de variabilidade da espécie, a utilização de nove *primers* ISSR é suficiente, uma vez que a seleção e consequentemente uso de um menor número de *primers* ISSR se torna muito vantajosa por reduzir o tempo e custo das análises em laboratório, sem alterar a robustez dos resultados.

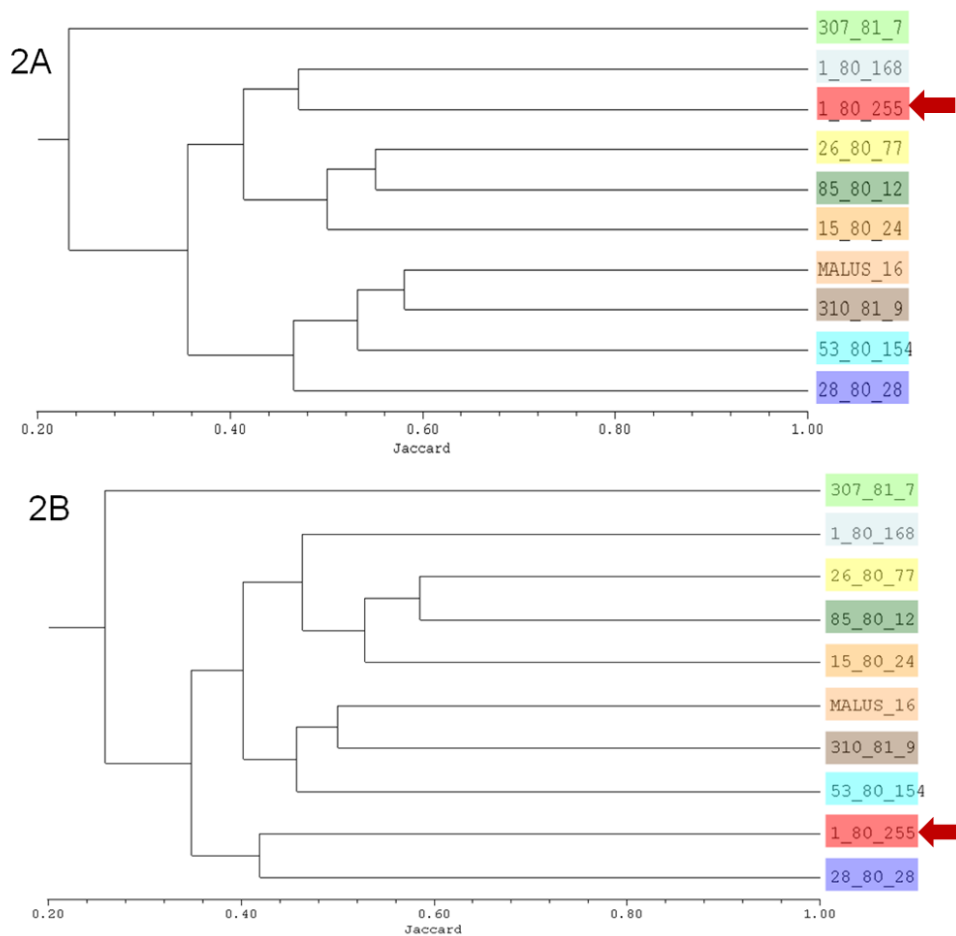


Figura 2. Dendrogramas de 10 genótipos de macieira obtidos com os dados dos 26 *primers* ISSR (2A) e com os nove *primers* ISSR selecionados como os melhores para estudos genéticos na espécie (2B) . O único genótipo que teve o posicionamento alterado no dendrograma foi o 1-80-255.

4.4. CONCLUSÕES

- Os *primers* ISSR mais informativos para estudos genéticos em macieira, baseados nos valores de PIC e RP são UBC-815, UBC-817, UBC-823, UBC-834, UBC-807, UBC-826, UBC-836, UBC-843 e UBC-873;

4.5. REFERÊNCIAS

ANDERSON, J.; CHURCHILL, G.; AUTRIQUE, J.; TANKSLEY, S.; SORRELLS, M. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome**, v. 36, n. 1, p. 181-186, 1993.

BORÉM, A.; FRITSHE NETO, R. **Biotechnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Viçosa: Suprema, 2013. 336 p.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. C., E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 9-78 p.

CAMARGO, L.K.; MOGOR, A.F.; RESENDE, J.T.; DA-SILVA, P.R. Establishment and molecular characterization of a sweet potato germplasm bank of the highlands of Parana State, Brazil. **Genet Mol Res**, v. 12, n. 4, p. 5574-88, 2013.

DEQUIGIOVANNI, G.; RECH, F.; GOMES, F.G.G.; CEROTTI, I.S.; FAORO, I.; DE OLIVEIRA, P.R.D.; QUECINI, V.; RITSCHER, P. Identification of a Simple Sequence Repeat molecular-marker set for large-scale analyses of pear germplasm. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 118-125, 2012.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

FAKHRIAN, P.; ZEINALABEDINI, M.; KHAYAM-NEKOU EI, S.M.; KIANAMIRI, S.; PIRSEYEDI, S.M. Assessment of genetic diversity and genetic relationships among 46 Iranian and non-Iranian dwarfing rootstocks of apple (*Malus X domestica* Borkh.) using microsatellite markers. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 89, n. 2, p. 121-129, 2014.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **International Journal of Plant Breeding**, v. 122, n. 1, p. 81-89, 2001.

GRATIVOL, C.; DA FONSECA LIRA-MEDEIROS, C.; HEMERLY, A.; FERREIRA, P. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 7, p. 4245-4256, 2011.

ISSHIKI, S.; IWATA, N.; KHAN, M.M.R. ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species. **Scientia Horticulturae**, v. 117, n. 3, p. 186-190, 2008.

OTT, J. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. **American Journal of Human Genetics**, v. 51, n. 2, p. 283-290, 1992.

POTTS, S.M.; HAN, Y.; KHAN, M.A.; KUSHAD, M.M.; RAYBURN, A.L.; KORBAN, S.S. Genetic Diversity and Characterization of a Core Collection of Malus Germplasm Using Simple Sequence Repeats (SSRs). **Plant Mol. Biol. Rep.**, v. 30, n. 4, p. 827-837, 2012.

PREVOST, A.; WILKINSON, M. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 1, p. 107-112, 1999.

ROHLF, F.J. **NTSYSpc: numerical Taxonomy System**. Version 2.2: Exeter Publishing, New York, 2008.

ROLDAN-RUIZ, I.; DENDAUW, J.; VANBOCKSTAELE, E.; DEPICKER, A.; DE LOOSE, M. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.) **Molecular Breeding**, v. 6, p. 125-134, 2000.

TATIKONDA, L.; WANI, S.P.; KANNAN, S.; BEERELLI, N.; SREEDEVI, T.K.; HOISINGTON, D.A.; DEVI, P.; VARSHNEY, R.K. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. **Plant Science**, v. 176, n. 4, p. 505-513, 2009.

YEPURI, V.; SURAPANENI, M.; KOLA, V.S.R.; VEMIREDDY, L.; JYOTHI, B.; DINESHKUMAR, V.; ANURADHA, G.; SIDDIQ, E. Assessment of genetic diversity in sesame (*Sesamum indicum* L.) genotypes, using EST-derived SSR markers. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 93-103, 2013.

VARIABILIDADE GENÉTICA DE GENÓTIPOS DE MACIEIRA (*Malus × domestica* Borkh) DO PROGRAMA DE MELHORAMENTO DO IAPAR BASEADA EM MARCADORES ISSR

RESUMO

A maçã é uma das frutas mais apreciadas e comercializadas em todo mundo. Os programas de melhoramento desta fruta visam a busca por sabor, aparência, tolerância ao armazenamento, resistência a doenças, maior produtividade e em regiões quentes, a baixa exigência de frio para florescimento. Todos os programas de melhoramento genético de macieira possuem suas coleções de germoplasma. Nestas coleções é esperado que contenha relevante variabilidade genética para uso do melhorista. Desta forma, o conhecimento da variabilidade da coleção de genótipos é fundamental para o sucesso de um programa de melhoramento. A coleção de germoplasma de macieira do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) ainda não teve sua variabilidade caracterizada utilizando marcadores moleculares. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo a caracterização genética-molecular dos genótipos de germoplasma do IAPAR. Para isso 60 genótipos de macieira da coleção de genótipos do IAPAR foram caracterizados com nove *primers* ISSR. A similaridade genética entre os genótipos variou de 11% entre os genótipos 53-80-149 e Castel Gala e 80% entre os genótipos Fuji Suprema e 2-80-59. A similaridade média entre todos os genótipos foi de 46%. O dendrograma obtido resultou na formação de dois grupos, evidenciando alta variabilidade genética. A análise de Coordenadas Principais (PCoA) também mostrou alta variabilidade genética na coleção de genótipos do IAPAR. A análise Bayesiana evidenciou que esta variabilidade genética está distribuída em quatro grupos genéticos. Os dados aqui obtidos poderão auxiliar os melhoristas na escolha de genótipos para realização de cruzamentos para obtenção de genótipos superiores.

Palavra-chave: Banco de Germoplasma, Dissimilaridade genética, Caracterização Molecular

5.1. INTRODUÇÃO

A macieira (*Malus × domestica* Borkh) pertence à família Rosaceae, subfamília Pomoideae, compreendendo 100 gêneros e cerca de 2.000 espécies espalhadas pelo Mundo (EMBRAPA, 1994; JAIN e PRIYADARSHAN, 2009). O centro de origem da macieira é o Cazaquistão e Ásia Central, mais especificamente, o centro de origem primário do gênero *Malus* está localizado na Ásia menor, Cáucaso, Ásia Central, Himalaia Indiano, Paquistão e oeste da China (EPAGRI, 2002).

No Brasil o cultivo da macieira concentra-se no Sul, mais precisamente nas regiões mais frias, como Vacaria (Rio Grande do Sul), São Joaquim e Fraiburgo (Santa Catarina), Palmas (Paraná).

O estado do Paraná é responsável por 4,4% da produção nacional de maçã, sendo que a região de Palmas representa o 4º polo da produção nacional. As principais cultivares produzidas no Brasil são Gala, Fuji e Eva. No estado do Paraná predomina a cultivar Gala em função das condições climáticas (IBGE, 2014).

Pela macieira ser de originária de clima temperado, a mesma apresenta problemas de adaptação no Brasil, e mais especificamente no Paraná, pois em muitos anos não há frio suficiente para induzir boa produção e as condições climáticas favorecem o surgimento de várias doenças que afetam a produtividade da macieira (LOPES et al., 2012). Ainda, com o aquecimento global esta situação poderá se agravar ainda mais, tornando-se urgente a necessidade do desenvolvimento de cultivares adaptadas às estas condições.

Para minimizar os efeitos climáticos na produção nacional de maçã os melhoristas têm procurado identificar e desenvolver genótipos que tenham baixa necessidade de frio e resistência a doenças (POMMER e BARBOSA, 2009).

As cultivares Gala e Fuji são os genótipos mais cultivados devido a aparência e o sabor dos frutos, mas altamente exigentes em horas de frio. Já as cultivares Condessa, Anna e Eva requerem menor quantidade de horas de frio (BRUCKNER, 2002).

Dentre os programas de melhoramento genético de macieira e conservação do material genético estão os bancos de germoplasma da EMBRAPA Uva e Vinho- RS, EPAGRI-SC e o IAPAR-PR.

O IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná) foi pioneiro no desenvolvimento de genótipos de macieira que necessitam baixa incidência de frio e são resistentes a sarna da macieira e mancha foliar, como é o caso das cultivares Anabela, Carícia, Julieta e Eva.

Os cruzamentos que originaram estes materiais geraram outras dezenas de materiais que não foram avaliados quanto à essas características. Assim, acredita-se que dentre estes materiais há genótipos promissores para uso no melhoramento para obtenção de cultivares superiores.

A adoção de novas ferramentas da biotecnologia e o uso de marcadores moleculares permitem reduzir o tempo para seleção de novas cultivares, reduzir o número de genótipos a serem mantidos até a idade reprodutiva bem como a diminuição de mão-de-obra (MALIEPAARD et al., 1998; MARIĆ et al., 2010; KUMAR et al., 2012). Estas contribuições são importantes em um programa de melhoramento, pois diminuem os custos e o tempo para o desenvolvimento de uma cultivar. Vários marcadores moleculares estão disponíveis na literatura, a escolha de qual utilizar depende de vários fatores, como recursos disponíveis, tempo para as análises e biologia da espécie a ser estudada.

O marcador molecular ISSR (*Inter-simple Sequence Repeat*) usa de uma técnica simples, eficiente e barata. Apresenta herança dominante, é baseado na amplificação de fragmentos distribuídos aleatoriamente no genoma. Marcadores moleculares ISSR representam uma das classes de marcadores e foram desenvolvidos a partir da necessidade de explorar repetições microssatélites sem a utilização de sequenciamento do DNA (ZIETKIEWICZ et al., 1994; CAIXETA et al., 2006). Apresentam alta reprodutibilidade, quando comparados com outros marcadores baseados em PCR não específico como, por exemplo, o RAPD (WOLFE e LISTON, 1998).

Vários pesquisadores têm utilizado os marcadores ISSR para estudos de variabilidade genética em macieira e obtido resultados robustos (GOULÃO e OLIVEIRA, 2001; SMOLIK et al., 2004; SMOLIK e KRZYSZTOSZEK, 2010; HE et al., 2011; PATHAK e DHAWAN, 2012).

A coleção de genótipos de macieira do Programa de Melhoramento do IAPAR é uma importante fonte de materiais para o melhoramento, tendo em vista que são oriundos desta coleção as cultivares Anabela, Carícia, Julieta e Eva, que são as mais recomendadas para regiões menos frias. Os cruzamentos que originaram estas cultivares, originaram vários outros genótipos que não foram avaliados para baixa necessidade de frio e resistência a doenças no entanto, acredita-se que há outros genótipos nesta coleção com potencial para o desenvolvimento de cultivares superiores. O uso de marcadores moleculares ISSR associados a dados de avaliações de campo podem auxiliar na identificação destes genótipos e no planejamento de cruzamentos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi a caracterização da variabilidade genética de genótipos de

macieira do Programa de Melhoramento do IAPAR utilizando marcadores moleculares ISSR.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material Vegetal

Para as análises moleculares foram coletados 60 genótipos de macieira, da coleção de germoplasma do IAPAR (Tabela 1 e 2). Estes genótipos são mantidos na estação Experimental do IAPAR em Palmas, PR (26°27'56'' S e 51°58'33'' O) com altitude aproximada de 1088 metros. De cada genótipo foram coletadas folhas jovens e mantidas em sílica gel até o momento da extração de DNA.

A extração do DNA foi conduzida conforme descrito no item 4.2.1 do Capítulo 1 desta dissertação.

Tabela 1. Relação dos genótipos de macieira (*Malus × domestica* Borkh) do Programa de melhoramento do IAPAR - Instituto Agrônômico do Paraná, que possuem a cultivar Anna como parental.

Codificação	Genótipo	Origem
1	31-80-5	Mollie's Delicious x Anna
2	52-80-2	Dei Argentina x Anna
3	9-80-12	Granny Smith x Anna
4	13-80-1	Freyberg x Anna
6	30-80-63	Willie Sharp x Anna
8	28-80-66	Golden Delicious x Anna
9	EVA	Anna x Gala
12	1-80-168	Prima x Anna
13	1-80-255	Prima x Anna
15	26-80-77	Super Golden Spur x Anna
16	15-80-24	Red Spur x Anna
17	27-80-54	Gala x Anna
22	6-80-28	Golden Delicious x Anna
23	28-80-14	Golden Delicious x Anna
24	2-80-33	Gala x Anna
27	1-80-146	Prima x Anna
28	2-80-54	Gala x Anna
29	1-80-277	Prima x Anna
30	28-80-28	Golden Delicious x Anna
31	1-80-185	Prima x Anna
32	4-80-15	Super Golden Spur x Anna
33	1-80-5	Prima x Anna

continua...

...continuação

Tabela 1.

Codificação	Genótipo	Origem
34	26-80-53	Super Golden Spur x Anna

35	38-80-1	WinterBanna x Anna
36	2-80-166	Gala x Anna
38	CARÍCIA	Anna x Prima
39	27-80-2	Gala x Anna
40	ANABELA	Anna x Gala
41	JULIETA	Anna x Mollie's Delicious
43	2-80-202	Gala x Anna
44	2-80-7	Gala x Anna
45	25-80-77	Golden Delicious x Anna
46	34-80-3	Belgonden x Anna
47	2-80-59	Gala x Anna
48	31-80-34	Mollie's Delicious x Anna
49	1-80-165	Prima x Anna
52	8-80-5	Royal Red Delicious x Anna
53	14-80-5	Red Delicious x Anna
54	1-80-35	Prima x Anna
56	25-80-59	Golden Delicious x Anna
57	26-80-144	Super Golden Spur x Anna
58	ANNA	Red Hadassiya x Golden delicious

Tabela 2. Relação dos genótipos de macieira (*Malus × domestica* Borkh) do Programa de melhoramento do IAPAR - Instituto Agrônômico do Paraná, que não possuem a cultivar Anna como parental e /ou não possuem informação de origem.

Codificação	Genótipo	Origem
5	303-81-27	Sem informação
7	78-80-11	Sem informação
10	284-81-21	Sem informação
11	307-81-7	Sem informação
14	MALUS-44	Seleção da Epagri
18	85-80-12	Sem informação
19	MALUS-16	Seleção da Epagri
20	310-81-9	Sem informação
21	53-80-154	P x 1033 OPS*
25	284-81-26	Sem informação
26	53-80-59	P x 1033 OPS*
37	IMPERIAL GALA	Mutação da Gala

continua...

Tabela 2.

...continuação

Codificação	Genótipo	Origem
-------------	----------	--------

42	FUJI SUPREMA	Mutação da Fuji
50	303-81-44	Sem informação
51	172-88-304	Eins Shemmer OPS
55	302-81-205	Sem informação
59	53-80-149	P x 1033 OPS*
60	CASTEL GALA	Mutação da Gala

* Seed lines da progênie originada da seleção de nome PX 1033 de polinização aberta desta variedade

5.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese

Para as reações de amplificação do DNA foram utilizados nove *primers* ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC), Vancouver, Canadá (Tabela 1), previamente selecionados no Capítulo 1 desta dissertação.

O protocolo de amplificação por PCR e eletroforese seguiram conforme descrito no item 4.2.2 do Capítulo 1 desta dissertação.

5.2.3. Análises estatísticas

Cada loco amplificado foi analisado de acordo com a presença (1) ou ausência (0) da banda. As informações acerca do polimorfismo seguiram o critério de OTT (1992) que considera os fragmentos presentes em mais de 5% ou em menos de 95% dos indivíduos como polimórficos. A porcentagem de polimorfismo foi calculada para cada *primer* dividindo o número de fragmentos polimórficos pelo número total de fragmentos amplificados.

A similaridade genética entre os genótipos foi estimada utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard por meio do software NTSYS 2.2 (Numerical Taxonomy Analysis System) (ROHLF, 2008). Após a obtenção da matriz foi calculada a similaridade média e obtido o dendrograma de similaridade pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic averages).

A análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi realizada nos software NTSYS 2.2 (ROHLF, 2008) e GenAlex (PEAKALL e SMOUSE, 2012). A análise Bayesiana, para obtenção de cluster (grupos genéticos) foi feita com o auxílio do software STRUCTURE (PRITCHARDA et al., 2010). Para determinação do número ideal de clusters (K) foram feitas simulações partindo do pressuposto que é possível a obtenção

de qualquer número de clusters de 1 a 10, onde cada simulação foi repetida 10 vezes. Para esta análise foi usado o modelo de ascendência sem mistura e as frequências alélicas foram correlacionadas por 1000 burn-in e 10000 MCMC (Markov Chain Monte Carlo) repetições após o burn-in.

Para determinação do K (número de grupos genéticos-clusters) mais provável em relação aos indicados pela análise, foram utilizados os critérios sugeridos por EVANNO et al. (2005), com o auxílio do programa Structure Harvester (EARL, 2012).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número total de fragmentos amplificados pelos nove *primers* ISSR foi de 125, com média de 13,9 fragmentos por *primer*. Destes, 57 foram polimórficos nos 60 genótipos de macieira, com média de 6,3 fragmentos polimórficos por *primer*. O *primer* UBC 807 apresentou o maior número de fragmentos amplificados e o *primer* UBC 843 o maior número de fragmentos polimórficos e também porcentagem de polimorfismo (Tabela 3). A média de polimorfismo dos nove *primers* nos 60 genótipos de macieira foi de 45,6%.

Tabela 3. Relação dos nove primers ISSR utilizados para estimar a variabilidade genética de 60 genótipos de macieira do Programa de Melhoramento do IAPAR, Instituto Agronômico do Paraná. TA - Temperatura de Anelamento, NTFA - Número Total de Fragmentos amplificados, NFP - Número de Fragmentos Polimórficos e %P - Porcentagem de Polimorfismo.

Primer	Sequência	TA °C	NTFA	NFP	% P
UBC 807	(AG)8T	52	28	9	32,1
UBC 815	(CT) ₈ G	52	18	9	50,0
UBC 817	(CA)8A	52	10	5	50,0
UBC 823	(TC)8C	52	13	8	61,5
UBC 826	(AC)8C	52	10	4	40,0
UBC 834	(AG)8CTT	52	11	4	36,4
UBC 836	(AG)8YA	53	13	6	46,2
UBC 843	(CT)8AGA	54	12	10	83,3
UBC 873	(GACA)4	50	10	2	20,0

* Y = (C,T)

Os marcadores ISSR têm apresentado resultados bastante significativos quando utilizados em estudos de variabilidade genética em macieira (Tabela 3). Estes resultados evidenciam a robustez destes marcadores em macieira. Ao comparar os resultados obtidos no presente trabalho com os dados da literatura (Tabela 4) é possível observar que embora

utilize o maior número de genótipos, a média de fragmentos polimórficos por *primer* é baixa. Este resultado é explicado devido a utilização de um número significativo de genótipos, apesar da maioria deles serem oriundos de poucos cruzamentos e ainda, quando de cruzamentos diferentes, com um dos pais em comum (Tabela 1). Ainda, os demais trabalhos são, na maioria, realizados comparando espécies diferentes do gênero *Malus* ou, ainda com grupos genéticos diferentes e silvestres. Esta característica de parentais próximos explica também o polimorfismo médio estar abaixo de 50%. Em plantas altamente heterozigotas como o caso da macieira, são esperados altos índices de polimorfismo médio.

Quando se trabalha com marcadores dominantes, como o ISSR, a porcentagem de polimorfismo observada pode ser utilizada como indicativo de variabilidade genética. Neste trabalho, este valor foi de 45,6%, índice considerado médio para uma espécie arbórea e alógama. No entanto, como explicado anteriormente, o grupo de genótipos aqui estudado é aparentado, o que pode estar contribuindo para este médio polimorfismo.

Tabela 4. Resultados obtidos em estudos com marcadores ISSR em macieira (*Malus × domestica* Borkh). NG - número de genótipos; NP - número de primers ISSR utilizados; MFP - média de fragmentos polimórficos; MP- média de polimorfismo.

Autores	NG	NP	MFP	MP
GOULÃO e OLIVEIRA (2001)	41	7	36,0	89,1%
SMOLIK e colaboradores (2004)	8	11	36,0	83,0%
SMOLIK E KRZYSZTOSK (2010)	8	17	10,7	18,5%
HE e Colaboradores (2011)	31	20	9,95	55,2%
PATHAK e DHAWAN (2012)	22	15	8,90	-
Este trabalho	60	9	6,33	45,6%

A análise da matriz de similaridade genética obtida da comparação par-a-par dos 60 genótipos de macieira permitiu identificar que a menor similaridade genética foi de 11% entre os genótipos 53-80-149 e Castel Gala e, a maior similaridade 80% entre os indivíduos Fuji Suprema e 2-80-59. A similaridade média entre todos os genótipos foi de 46%. O dendrograma obtido resultou na formação de 2 grupos (Figura 1). O grupo A foi composto pela maioria dos genótipos e neste grupo estão presentes todos os genótipos derivados da Cultivar Anna O grupo B foi constituído por apenas dois genótipos (Figura 1).

A análise conjunta do pedigree (Tabela 1 e 2) e do dendrograma obtido dos 60 genótipos de macieira mostra que há relação entre origem (parentais) dos genótipos e

agrupamento no dendrograma, pois todos os genótipos derivados de Anna estão no Grupo A.

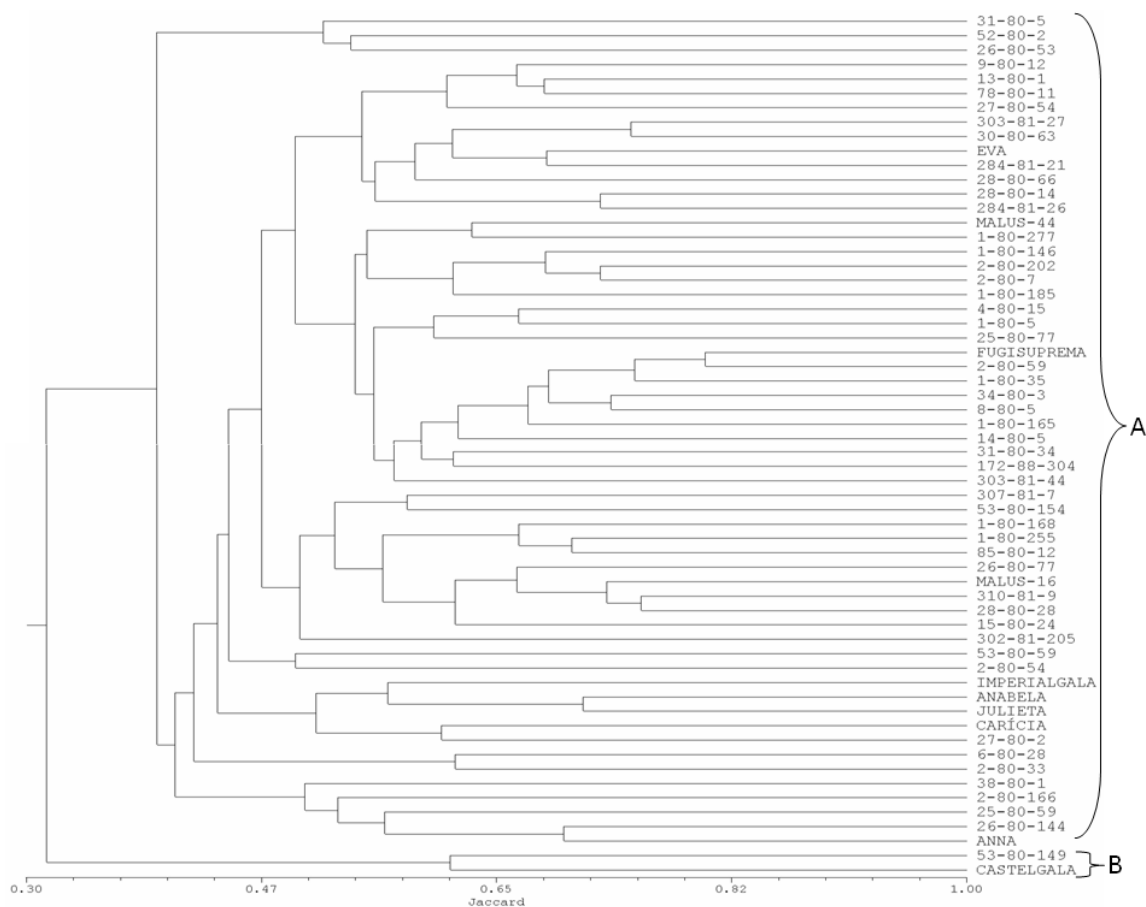


Figura 1. Dendrograma dos 60 genótipos de macieira (*Malus × domestica* Borkh) do programa de melhoramento do IAPAR obtido com os dados de nove *primers* ISSR. A linha pontilhada indica o local de corte do dendrograma para formação dos grupos. As letras a direita da figura correspondem aos grupos formados.

Com relação à similaridade média observada entre todos os genótipos (46%), pode ser considerada muito significativa para macieira, pois está abaixo das similaridades até então descritas para macieira com marcadores ISSR. Por exemplo, GOULÃO e OLIVEIRA (2001) utilizando sete *primers* ISSR avaliaram 41 genótipos comerciais de macieira e obtiveram similaridades par-a-par variando de 71 a 92%. Em trabalho estudando oito cultivares de macieira com 11 *primers* ISSR foi observada a similaridade mínima entre pares de cultivares de 60% (SMOLIK et al., 2004). O mesmo grupo, em outro estudo, observou similaridades par-a-par variando de 65 a 85% (SMOLIK e KRZYSZTOSZEK, 2010). Em outro trabalho com *Malus*, a avaliação de 31 genótipos

com 20 *primers* ISSR encontrou similaridade variando de 70 a 94% (ZHANG et al., 2012). A comparação destes dados da literatura com os obtidos neste trabalho mostram que a coleção de genótipos do Programa de melhoramento de macieira do IAPAR apresenta elevado valor genético com significativa variabilidade.

A análise de PCoA (Figura 2) corrobora com os resultados obtidos no dendrograma, evidenciando que há ampla variabilidade genética nos genótipos analisados do programa de melhoramento do IAPAR. Esta conclusão é possível devido os genótipos estarem dispersos por todos os quadrantes (coordenadas) do gráfico. Neste sentido é possível concluir que a variabilidade não está restrita a um grupo de genótipos e sim, distribuída nos genótipos.

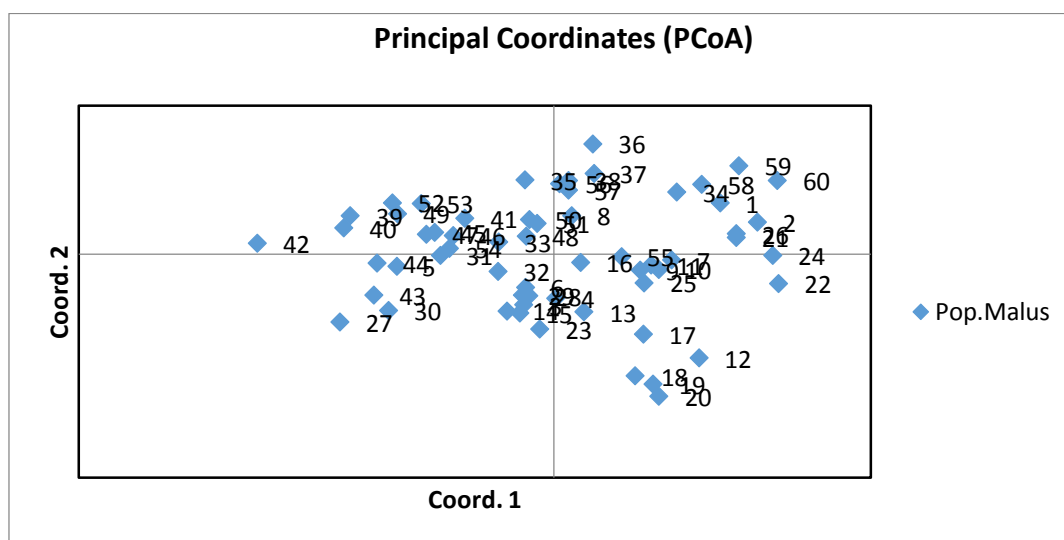


Figura 2. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) com base em dados obtidos com nove marcadores ISSR em 60 genótipos de macieira (*Malus × domestica* Borkh) do programa de melhoramento do IAPAR. A identificação de cada genótipo de acordo com o código de números aqui utilizado encontra-se na Tabela 1.

Nas simulações feitas pelo programa STRUCTURE com abordagem Bayesiana, o número de K (Clusters, grupos genéticos) foi definido como quatro (Figura 3). A distribuição dos genótipos nos quatro grupos genéticos obtidos pela análise Bayesiana (Figura 4) demonstrou que na maioria dos indivíduos há o predomínio de um grupo genético (Figura 4). Estes resultados mostram que há variabilidade nos genótipos, no entanto esta variabilidade está dispersa entre os genótipos, ou seja, a coleção de genótipos apresenta alta variabilidade quando considerado todos os genótipos, no entanto ao considerar apenas um genótipo, este apresenta baixa variabilidade.

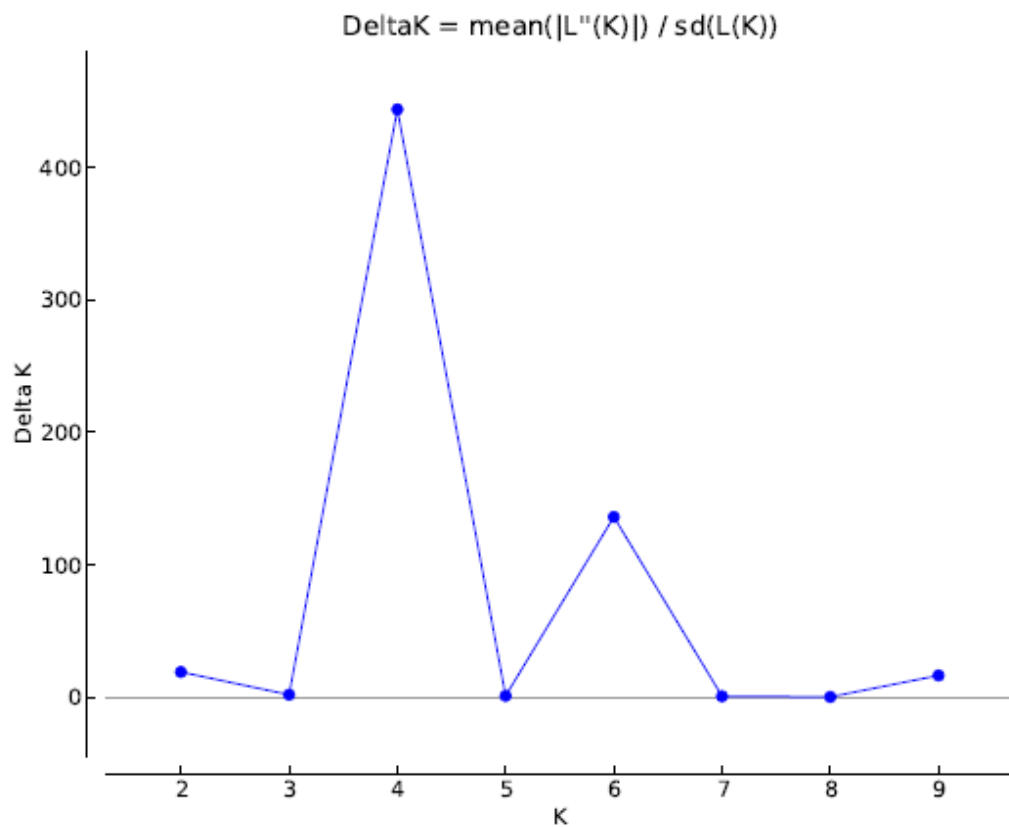


Figura 3. Determinação do número ótimo de K (clusters-grupos genéticos) em macieira (*Malus × domestica* Borkh) pelo método Bayesiano, com dados obtidos com nove marcadores ISSR. O ponto de intersecção entre o maior valor no eixo Y com o eixo X indica o número ótimo de K (grupos genéticos).

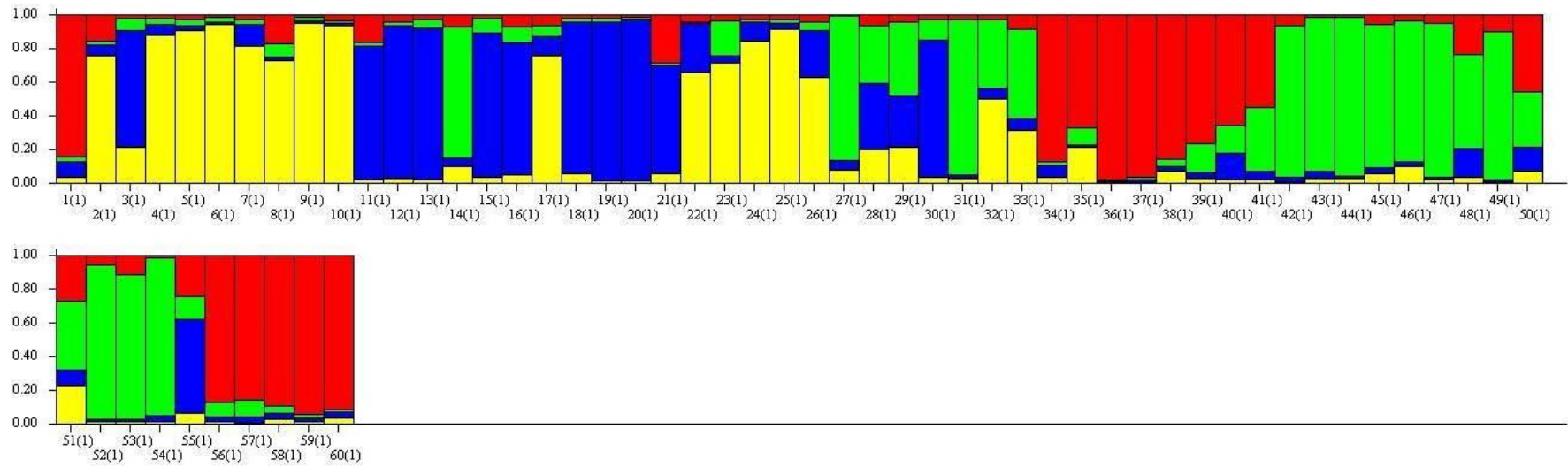


Figura 4. Distribuição dos quatro grupos genéticos (K) obtidos pela análise Bayesiana nos 60 genótipos de macieira (*Malus x domestica* Borkh) do programa de melhoramento do IAPAR.

A variabilidade genética é a base de todo programa de melhoramento de plantas (MILACH, 1998; MARIĆ et al., 2010). Neste sentido, a coleção de genótipos de macieira do IAPAR apresenta alto potencial para a obtenção de cultivares superiores, pois apresenta alta variabilidade genética. Ainda é importante ressaltar que nesta coleção há cultivares importantes para o melhoramento para baixa necessidade de frio e resistência a sarna. Assim, os dados obtidos neste trabalho tanto de agrupamento, como de grupos genéticos juntamente com dados que estão sendo obtidos no campo poderão auxiliar os melhoristas na escolha de genótipos para realização de cruzamentos para obtenção de cultivares adaptadas as condições climáticas atuais e/ou que venham a surgir com o aquecimento global.

5.4. CONCLUSÕES

- Os genótipos de macieira do programa de melhoramento genético do IAPAR avaliados neste trabalho apresentam alta variabilidade genética;
- Os genótipos aqui avaliados pertencem a quatro grupos genéticos.
- Há relação entre grau de parentesco entre os genótipos de macieira aqui avaliados e agrupamento no dendrograma.

5.5. REFERÊNCIAS

- BRUCKNER, C.H. **Melhoramento de Fruteiras de Clima Temperado**. Viçosa: UFV, 2002. 186 p.
- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. C., E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 9-78 p.
- EARL, D.A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation genetics resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.
- EMBRAPA. **A cultura da maçã**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 107 p. (Coleção Plantar, 19).
- EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. 743 p.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.
- GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **International Journal of Plant Breeding**, v. 122, n. 1, p. 81-89, 2001.
- HE, P.; LI, L.; LI, H.; WANG, H.; YANG, J.; WANG, Y. Genetic analysis of wild apple resources in Shandong province based on inter-simple sequence repeats (ISSR) and sequence-specific amplification polymorphism (S-SAP) markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 46, p. 9501-9508, 2011.
- IBGE. **Produção Agrícola Municipal: Lavouras Permanentes**, 2014. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2012/default_perm_xls.shtm. Acesso em: 11-01-2015.
- JAIN, S.M.; PRIYADARSHAN, P. **Breeding plantation tree crops: tropical species**. Springer, 2009.
- KUMAR, S.; CHAGNÉ, D.; BINK, M.C.A.M.; VOLZ, R.K.; WHITWORTH, C.; CARLISLE, C. Genomic Selection for Fruit Quality Traits in Apple (*Malus × domestica* Borkh.) (Genomic Selection in Apple). **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36674, 2012.
- LOPES, P.R.C.; OLIVEIRA, I.V.D.M.; SILVA-MATOS, R.R.S.D.; CAVALCANTE, Í.H.L. Caracterização fenológica, frutificação efetiva e produção de maçãs 'Eva' em clima

semiárido no nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 4, p. 1277-1283, 2012.

MALIEPAARD, C.; ALSTON, F.; VAN ARKEL, G.; BROWN, L.; CHEVREAU, E.; DUNEMANN, F.; EVANS, K.; GARDINER, S.; GUILFORD, P.; VAN HEUSDEN, A. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, n. 1, p. 60-73, 1998.

MARIĆ, S.; LUKIĆ, M.; CEROVIĆ, R.; MITROVIĆ, M.; BOŠKOVIĆ, R. Application of molecular markers in apple breeding. **Genetika**, v. 42, n. 2, p. 359-375, 2010.

MILACH, S. **Marcadores de DNA em Plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141 p.

OTT, J. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. **American Journal of Human Genetics**, v. 51, n. 2, p. 283-290, 1992.

PATHAK, H.; DHAWAN, V. ISSR assay for ascertaining genetic fidelity of micropropagated plants of apple rootstock Merton 793. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 48, n. 1, p. 137-143, 2012.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012.

POMMER, C.V.; BARBOSA, W. The impact of breeding on fruit production in warm climates of Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 612-634, 2009.

PRITCHARDA, J.K.; WENA, X.; FALUSHB, D. **Structure**. Version 2.3: University of Chicago/University of Oxford, 2010.

ROHLF, F.J. **NTSYSpc: numerical Taxonomy System**. Version 2.2: Exeter Publishing, New York, 2008.

SMOLIK, M.; KRZYSZTOSZEK, O. Evaluation of genetic variability in choosen apple (*Malus x domestica* Borkh.) cultivars by ISSR-PCR analysis. **Russian Journal of Genetics**, v. 46, n. 7, p. 819-827, 2010.

SMOLIK, M.; RZEPKA-PLEVNES, D.; STANKIEWICZ, I.; CHEŁPINSKI, P.; KOWALCZYS, K. Analysis of genetic similarity of apple tree cultivars. **Folia Horticulturae**, v. 16, n. 2, p. 87-94, 2004.

WOLFE, A.D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematic and evolutionary biology. In: SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E., et al (Eds.). **Molecular systematic of plants: DNA sequencing**. New York: Kluwer, 1998. 1-42 p.

ZHANG, Q.; LI, J.; ZHAO, Y.; KORBAN, S.; HAN, Y. Evaluation of Genetic Diversity in Chinese Wild Apple Species Along with Apple Cultivars Using SSR Markers. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, n. 3, p. 539-546, 2012.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 173-183, 1994.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A seleção dos melhores *primers* para macieira permitiu uma diminuição no tempo e no custo das análises da variabilidade genética dos genótipos de macieira do programa de melhoramento do IAPAR sem perda da qualidade dos resultados.

O IAPAR possui uma coleção de genótipos de macieira que foram obtidos de cruzamentos que originaram algumas cultivares com baixa necessidade de frio e resistência a sarna. O uso dos marcadores ISSR permitiu a classificação destes genótipos em grupos genéticos, o que pode facilitar por parte dos melhoristas a escolha de genótipos para realização de cruzamentos objetivando a obtenção de novos genótipos mais adaptados ao clima do Brasil.