

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

DESENVOLVIMENTO DE UM MAPA GENÉTICO DE LIGAÇÃO
DE MACIEIRA SATURADO PARA A REGIÃO COM
RESISTÊNCIA À MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA
(*Colletotrichum gloeosporioides*)

MAGUIDA FABIANA DA SILVA

FLORIANÓPOLIS
SANTA CATARINA-BRASIL
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

**DESENVOLVIMENTO DE UM MAPA GENÉTICO DE LIGAÇÃO
DE MACIEIRA SATURADO PARA A REGIÃO COM
RESISTÊNCIA À MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA
(*Colletotrichum gloeosporioides*)**

MAGUIDA FABIANA DA SILVA

Tese apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina sob a orientação do professor PhD. Rubens Onofre Nodari, como parte das exigências ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Área de concentração: Recursos Genéticos Vegetais, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**FLORIANÓPOLIS
SANTA CATARINA-BRASIL
2007**

Aos meus pais, Renato e Lúcia.
Aos meus irmãos Marco e Bianca.
Aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pela oportunidade de realizar o curso.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Rubens Onofre Nodari, pela orientação, pelo apoio e pelos ensinamentos.

Ao pesquisador Frederico Denardi da Epagri, pelas suas inúmeras contribuições a esse trabalho, pelo apoio incansável, por me ensinar tudo que eu sei sobre o melhoramento de macieira e por ser um exemplo de pesquisador competente e apaixonado pela profissão.

Aos professores e funcionários da Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, em especial ao professores Maurício, Miguel e Aparecido e a nossa secretária Bernadete. Suas contribuições foram fundamentais na minha formação profissional.

Ao pesquisador Yoshinori Katsurayama pelas contribuições na realização dos experimentos de inoculação e principalmente pelos ensinamentos.

Aos colegas de laboratório do início do curso: Kadine, Karine, Celso, Cristina, Natasha e os que chegaram depois Sarah, Gustavo, Taciane, Josiane. Ao pessoal da fisiologia: Alan, Luciana, Clarissa, Lírio, Taína, Carol, Neusa e tantos outros que passaram algum tempo pelo LFDGV nestes últimos quatro anos pela convivência, pela amizade e pela torcida sem os quais esse trabalho dificilmente seria realizado.

À todos os colegas que tomaram um chimarrão comigo nos bons e nos maus momentos e aos que comeram um churrasco e tomaram uma cervejinha gelada nos momentos de descontração.

Às colegas de república Andréa, Adriana Custódio e a vizinha Viviane que foram a minha família em Florianópolis, pela amizade, pelo apoio, pelos conselhos.

Aos meus amigos de longe e de perto, recentes ou antigos, aos malucos e aos normais, pois sem eles a busca dos meus sonhos não teria sentido.

SUMÁRIO

SILVA, Maguida Fabiana da,. Universidade Federal de Santa Catarina, novembro de 2007. **Desenvolvimento de um mapa genético de ligação de macieira saturado para a região com resistência à Mancha Foliar de *Glomerella* (*Colletotrichum gloeosporioides*).** Orientador: PhD Rubens Onofre Nodari

Desde a década de 80, o cultivo da macieira no Brasil vem sofrendo grandes perdas devido à Mancha foliar de *Glomerella* (MFG) causada por *Colletotrichum* spp. Esta doença tem se espalhado pelos pomares do sul do Brasil, e recentemente também pelos pomares dos Estados Unidos. Devido aos prejuízos econômicos causados pela MFG é crescente a preocupação por parte da comunidade científica em buscar o entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos na resistência a essa doença, uma vez que não existem medidas de controle químico que atendam às exigências da produção integrada (PIM). Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um mapa genético de ligação, em macieira, saturado para a região que contém o gene de resistência à Mancha Foliar de *Glomerella* (*Colletotrichum gloeosporioides*), visando contribuir para a eficiência na geração de novas cultivares de macieira resistentes a essa doença. Foi analisada reação à MFG em três populações de mapeamento (M-13/91 x M-46/94, M-13/91 x 'Gala' e 'Pink Lady' x 'Imperatriz'). Os resultados obtidos nos bioensaios indicaram a necessidade de se fazer ajustes de metodologia para incubação da MFG em cada caso. A reação identificada nas populações em estudo aponta para uma resistência monogênica recessiva, concordando, portanto, com os resultados encontrados na literatura. Contudo, os resultados encontrados também não permitem rejeitar a hipótese de segregação de 9:7. Assim, não se descarta a hipótese de que outro gene esteja interferindo nas respostas das plantas ao *Colletotricum* spp. Foi também realizada a seleção de marcadores RAPD, microsatélites e AFLP, visando mapeamento genético de macieira em duas populações segregantes. Para os marcadores RAPD a estratégia de seleção de marcadores utilizada foi o BSA. Dos 195 iniciadores RAPD testados,

nenhum apresentou produto de amplificação co-segregando com o gene de resistência a MFG. No caso dos marcadores microssatélites o polimorfismo encontrado foi abundante e dos 93 iniciadores testados, 63 foram utilizados no mapeamento genético da população M-13/91 x 'Gala'. Os marcadores AFLP apresentaram uma média de 13,1 e 10,5 fragmentos polimórficos entre os parentais das duas populações em estudo. Um mapa genético de ligação foi construído para a população proveniente do cruzamento M-13/91 x 'Gala' contendo 23 grupos de ligação abrangendo 1.179,7 cM com uma média de distância entre marcadores de 8,8 cM. O gene de resistência a MFG foi mapeado no grupo de ligação 15, próximo aos microssatélites NZ02b1 (2,1 cM), CH03b06 (6,8cM) e Hi03g06 (7,5 cM). O microssatélite NZ02b1 pode ser utilizado em programas de melhoramento de macieira, visando selecionar plantas resistentes a MFG, uma vez que o mesmo encontra-se ligado ao gene de resistência a essa doença. A frequência de recombinação relativamente baixa entre eles caracteriza este como um marcador útil para seleção indireta.

SUMMARY

SILVA, Maguida Fabiana da,. Universidade Federal de Santa Catarina, november of 2007. **Development of genetic linkage map of an apple segregating population to Glomerella Leaf Spot (*Colletotrichum gloeosporioides*)** Adviser: PhD Rubens Onofre Nodari

Since the 1980's, the apple production in Brazil has experienced great losses due to a disease, Glomerella Leaf Spot – GLS, caused by *Colletotrichum* spp., not known previously. This disease has spread to all the apple orchards of southern Brazil, and has begun to spread in the USA. Due to the great economic damage caused by GLS the demand to understand the genetic mechanisms involved in the disease's resistance is increasing, since effective chemical control measures that respect the norms of IAP are not available. In this sense, the objective of this work was the development of genetic linkage map of an apple segregating population to Glomerella Leaf Spot (*Colletotrichum gloeosporioides*) to contribute for the efficiency in the generation of new apple cultivars resistant to that disease. The GLS reaction in three mapping populations was analyzed (M13/91 x M-46/94, M-13/91 x 'Gala' and 'Pink Lady' x 'Imperatriz'). Biological assays results indicated the necessity of making adjustments of methodology for GLS incubation in each case. The reaction identified in the study populations points to a recessive monogenic control agreeing, therefore, with the results found in literature. However, the obtained results also do not allow the rejection of the segregation hypothesis of 9:7. The selection of markers RAPD, SSR and AFLP was accomplished for genetic mapping of apple in two segregating populations. For the RAPD markers the strategy of selection of markers used was BSA. Of the 195 RAPD initiators tested none presented amplification product co-segregating with the resistance gene GLS. In the case of the SSR markers the found polymorphism was abundant and among the 93 pair of primers tested, 63 were polymorphic between the parents M-13/91 and 'Gala'. The AFLP markers presented an average of 13.1 and 10.5 polymorphic fragments among the parental of the two study populations. A genetic linkage map was made for the population M-13/91 x 'Gala' covering 23 linkage groups including 1,179.7 cM with a average

distance among markers of 8.8 cM. The GLS resistance gene was mapped on linkage group 15, close to SRRs NZ02b1 (2.1 cM), CH03b06 (6.8cM) and Hi03g06 (7.5 cM). The relatively low recombination frequency among them and the resistant gene to GLS assigns to SRR-NZ02b1 a useful marker for indirect selection.

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO.....	1
2- JUSTIFICATIVA.....	2
3- OBJETIVOS.....	4
4- REVISÃO DE LITERATURA.....	5
4.1 O CULTIVO DA MACIEIRA NO BRASIL.....	5
4.2 ORIGEM E DIVERSIDADE GENÉTICA DA MACIEIRA (<i>Malus x domestica</i> Borkh.).....	8
4.3 A MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA	9
4.4 UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NO MELHORAMENTO DA MACIEIRA.....	15
4.5 MAPEAMENTO GENÉTICO DA MACIEIRA	17
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO DA SEGREGAÇÃO GENÉTICA EM MACIEIRA PARA REAÇÃO À MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA EM TRÊS POPULAÇÕES DE SEGREGANTES.....	28
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAL E MÉTODOS.....	31
Material genético.....	31
Reação a isolados da Mancha Foliar de Glomerella (<i>Colletotrichum spp</i>)..	32
RESULTADOS.....	35
DISCUSSÃO.....	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
CAPÍTULO 2: SELEÇÃO DE MARCADORES RAPD, MICROSSATÉLITES E AFLP VISANDO MAPEAMENTO GENÉTICO DE MACIEIRA EM DUAS POPULAÇÕES SEGREGANTES.....	48
INTRODUÇÃO.....	49
MATERIAL E MÉTODOS.....	51
Populações de mapeamento.....	51

Extração e quantificação de DNA.....	52
Marcadores RAPD.....	52
Marcadores microssatélites.....	53
Trasferibilidade de marcadores microssatélites de espécies do gênero <i>Prunus</i> para <i>Malus x domestica</i>	54
Marcadores AFLP.....	56
Eletroforese e análise dos marcadores.....	58
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
Marcadores RAPD.....	58
Marcadores microssatélites.....	59
Trasferibilidade de marcadores microssatélites de espécies do gênero <i>Prunus</i> para <i>Malus x domestica</i>	65
Marcadores AFLP.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
CAPÍTULO 3: CONSTRUÇÃO DE UM MAPA GENÉTICO DE LIGAÇÃO PARA UMA POPULAÇÃO SEGREGANDO PARA MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>).....	73
INTRODUÇÃO.....	74
MATERIAL E MÉTODOS.....	77
População segregante e extração de DNA.....	77
Avaliação da reação ao <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	78
Marcadores microssatélites.....	79
Marcadores AFLP.....	79
Construção do mapa genético de ligação.....	80
RESULTADOS	81
Avaliação da reação ao <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	81
Marcadores microssatélites.....	81
Marcadores AFLP.....	81
Construção do mapa genético de ligação.....	81
DISCUSSÃO.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABPM - Associação Brasileira dos Produtores de Maçã
- AFLP - Amplified Fragment Length Polimorphis – Polimorfismos de Fragmentos Amplificados
- BSA - Bovine serum albumin- Albumina do soro bovino
- Cv. - Cultivar
- EDTA - Ethylenediamine tetracetic acid- Ácido etilenodiamino tetra-acético
- Epagri - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A.
- MFG - Mancha Foliar de Glomerella
- PCR - Polymerase Chain Reaction – Reação em cadeia de polimerase
- PIM - Produção Integrada de Maçãs
- RAPD - Randon Amplified Polymorphic DNA -Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso
- SSR - Simple Sequence Repeat - Seqüências únicas repetidas (microsatélites)
- t - toneladas
- TBE - Tampão tris - ácido bórico – EDTA

1. INTRODUÇÃO

A maçã é a mais importante fruta de clima temperado comercializada “*in natura*”, tanto no contexto internacional quanto brasileiro. A estimativa da FAO da produção mundial de maçã, em 2004, era de aproximadamente 59,1 milhões de toneladas, em uma área colhida de 5,3 milhões de hectares, o que representou um incremento de 0,47% e 1,25%, respectivamente, em relação ao ano de 2003 (ICEPA, 2005).

No Brasil, a cultura da macieira é recente e se estabeleceu por meio de grandes empresas a partir de 1970 atraídas por incentivos de políticas públicas (Mello, 2004). Desde então, inúmeros desafios já foram superados possibilitando um aumento de produção de 1.528 t, em 1973, para 989.961 t na safra 2003/04 (ABPM, 2004). Contudo, ainda existem problemas que a serem superados, como a exigência em frio, cuja redução iria possibilitar um aumento na área de cultivo, e as enfermidades que atingem os pomares do nosso país, como é o caso da Mancha Foliar de *Glomerella*.

Desde sua primeira constatação, a Mancha Foliar de *Glomerella* (MFG), também conhecida como Mancha Foliar da Gala vem se espalhando por todos os pomares de maçã do sul do Brasil, sendo considerada uma das doenças mais importantes da macieira na atualidade (Katsurayama *et al.*, 2000). O uso intensivo de fungicidas por períodos prolongados possui o potencial de promover o desenvolvimento de estirpes do patógeno (*Colletotrichum* spp.) resistentes a estes produtos, devido ao efeito da seleção ou aparecimento de estirpes incessíveis a fungicidas, conseqüentemente, causando a perda de controle (King *et al.*, 1998).

Uma das medidas de controle mais eficaz é a substituição da cultivar ‘Gala’ e seus clones por variedades existentes resistentes a Mancha Foliar. Outra alternativa é o desenvolvimento de novas cultivares resistentes a essa doença. Se de um lado estas medidas são de difícil implantação, pois a ‘Gala’ representando em torno 50% da produção brasileira, é considerada cultivar padrão pela sua coloração e formato atraentes (Katsurayama *et al.*, 2004), de outro lado, o conhecimento científico é a fonte maior de soluções para os problemas agrônômicos.

Assim, conhecer as bases genéticas e o comportamento dos genes de resistência em diferentes *backgrounds* genéticos será um passo decisivo na compreensão da reação da planta a esse fungo. A possibilidade de mapear esses genes de resistência abre inúmeras possibilidades na utilização de ferramentas para acelerar a transferência desses genes para genótipos adaptados e de alta aceitação pelos consumidores.

2. JUSTIFICATIVA

A produção de maçãs no Brasil é continuamente crescente, bem como as exportações e a importância econômica da pomicultura (BRDE, 2000). No Estado de Santa Catarina a produção passou de 1.528 t colhidas na safra 1973/74, para 516 mil t na safra 2003/04 (ABPM, 2004).

Juntamente com o rápido aumento da área de cultivo da macieira, a qual já estava em quase 30 mil hectares no ano 2000, houve um aumento dos problemas fitossanitários (Katsurayama *et al.*, 2004). O controle das doenças e o custo do mesmo são fatores limitantes da cultura na atualidade, os fungicidas respondendo por cerca de 20% do custo total (Boneti *et al.*, 1999). Além do custo, os consumidores estão cada vez mais exigentes na direção de alimentos sem contaminantes, principalmente, de agrotóxicos.

Na mesma direção, o país começa a exigir que a produção agrícola deva ser pontuada pelo uso de alternativas menos degradadoras do meio ambiente. Para proteger o meio ambiente e atender as exigências dos consumidores é necessário reduzir a quantidade de agrotóxicos utilizados na pomicultura. O uso de variedades altamente resistentes às doenças fúngicas mais importantes na cultura da macieira representa uma etapa importante para minimizar o uso de fungicidas (Janse, 1993).

A solução para este impasse seria a introdução de genes de resistência na cultivar 'Gala' e outras. No entanto, o melhoramento genético da macieira é um daqueles programas de pesquisa, cujos resultados são demorados. Com a utilização das técnicas de melhoramento convencionais, os objetivos costumam ser alcançados a longo prazo (Yoshida *et al.*, 1993). Daí a necessidade de

iniciar imediatamente os estudos genéticos envolvidos com a reação da MFG, visando acelerar este processo.

Pelos métodos convencionais seria muito difícil e demorado chegar ao resultado esperado, ou seja, uma maçã com as características da 'Gala' e que ao mesmo tempo possuísse genes de resistência a Mancha Foliar de *Glomerella*. O número de gerações requeridas para tal fim depende, conjuntamente, da qualidade da fruta na qual a característica (no caso resistência à MFG) é encontrada. Considerando um mínimo de quatro anos por geração, e supondo que seriam necessários cinco retrocruzamentos, esta transferência levaria no mínimo 20 anos de trabalho (Janick *et al.*, 1996). Contudo, a disponibilidade de um mapa genético, saturado na região que contém os genes de resistência a MFG, pode facilitar enormemente um programa de retrocruzamento com auxílio da seleção assistida.

O mapeamento genético consiste em uma das estratégias mais eficazes para a realização de estudos avançados de genética, podendo facilitar a seleção assistida por marcadores, o entendimento da herança, estrutura e organização dos genomas, e estudos de evolução, introgressão, identificação e isolamento de genes. O mapa genético pode também ser muito útil no entendimento das interações entre os genes ou para o estabelecimento de evidências para alelismo. O melhoramento de cultivares de macieira visando a substituição de um único gene é quase impraticável com as técnicas convencionais de melhoramento, mas torna-se possível desde que os genes em questão tenham sido clonados (Maliepaard *et al.*, 1998).

Em todo o mundo, o mapeamento genético tem sido uma estratégia bastante utilizada para solucionar problemas relacionados a doenças causadas por fungos na cultura da macieira (Yang *et al.*, 1997; King *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1998, Patocchi *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2002; Huaracha *et al.*, 2004).

Neste contexto, o mapeamento genético da macieira possibilita a localização com precisão no genoma, dos genes de resistência à Mancha Foliar de *Glomerella*, podendo, então, os mesmos serem clonados e seqüenciados para posterior aplicação tanto na seleção assistida por marcadores, como na transferência do mesmo para cultivares suscetíveis.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um mapa genético de ligação em macieira saturado para a região que contém o gene (ou os genes) de resistência à Mancha Foliar de *Glomerella* (*Colletotrichum gloeosporioides*), visando contribuir para a eficiência na geração de novas cultivares de macieira com resistência a esta doença.

3.2 Objetivos específicos

- a) Identificar a segregação genética da reação à Mancha Foliar de *Glomerella* em, pelo menos, duas populações de mapeamento;
- b) Utilizar distintos tipos de marcadores moleculares (microsatélite, AFLP, e RAPD) para construção de mapas genéticos saturados que possam servir de base para estudos genéticos e genômicos de resistência ao *Colletotrichum*;
- c) Localizar regiões genômicas, que condicionam a reação à Mancha Foliar de *Glomerella* (*Colletotrichum gloeosporioides*);
- d) Disponibilizar metodologia para identificar e selecionar plantas resistentes com potencial de serem promovidas a cultivares ou selecionadas como doadoras de genes para programas de melhoramento genético.

3.3. Metas

- a) Desenvolver um mapa genético com a identificação de regiões genômicas portadoras de genes de resistência a Mancha Foliar de *Glomerella*;
- b) Obter pelo menos um iniciador específico para identificar plantas com resistência ao *Colletotrichum*;
- c) Identificar génotipos superiores resistentes à MFG.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 O cultivo da macieira no Brasil

A produção de maçãs no Brasil, em sua maioria, está localizada na região sul, sendo o Estado de Santa Catarina o maior produtor, com 16.348 ha plantados, produzindo 516.000 t., seguido do Rio Grande do Sul e do Paraná (ABPM, 2004). Inúmeros desafios já foram superados possibilitando um aumento de produção de 1.528 t, em 1973, para 989.961 t na safra 2003/04 (Figura1)(ABPM,2004).

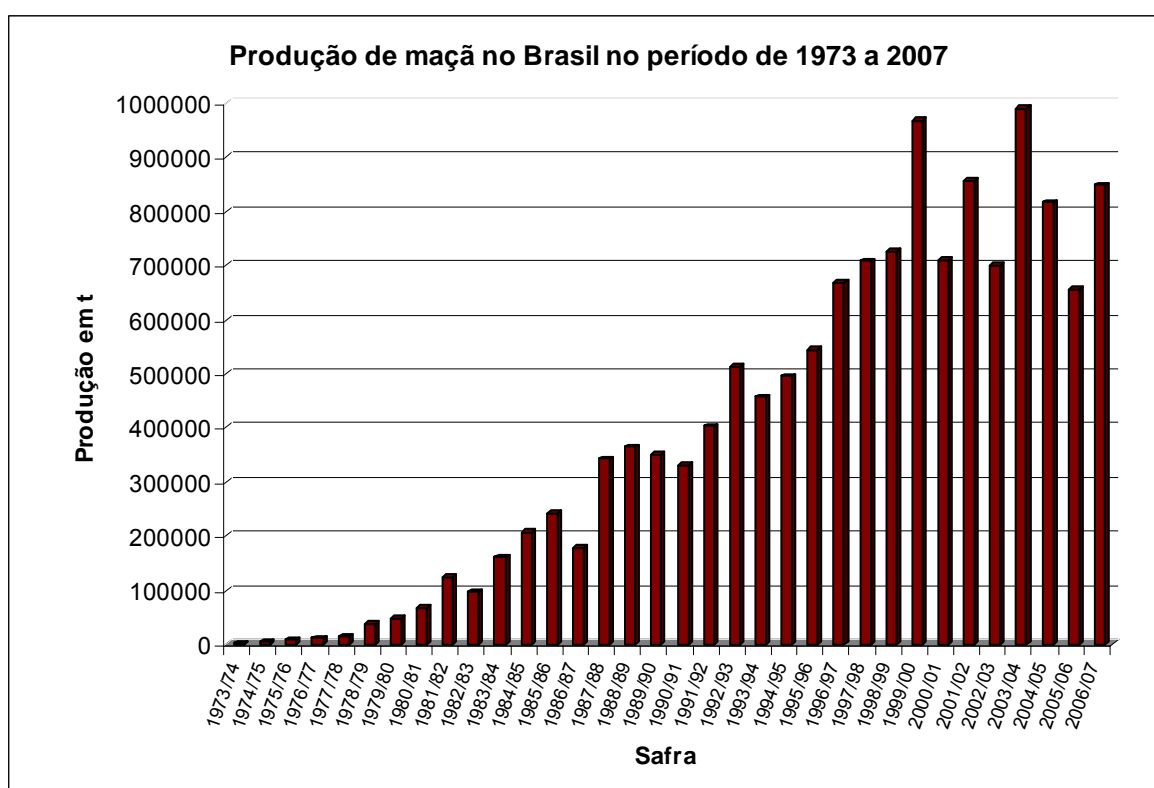


Figura 1: Produção de maçã no Brasil no período de 1973 a 2007.
Fonte: ABPM - Associação Brasileira dos Produtores de Maçãs.

O Brasil, na década de 60, importava toda a maçã consumida no país. A partir daí, os plantios foram aumentando até chegar à condição de auto-suficiência e exportação de 76.181 toneladas em 1999 (ABPM, 2004). Os nossos maiores parceiros comerciais, com participação média no período de 2000 a 2004, foram a Holanda, com 39,1%; o Reino Unido, com 12,6%; a Alemanha, com 9,2%; a Suécia, com 5,8%; a Bélgica, com 4,7%; a Itália e a

Espanha, com 3,9% cada uma, perfazendo, no conjunto, 79,2% de todas as vendas. Merecem destaque as operações comerciais mais recentes, efetivadas com os mercados da Rússia, do Japão, da Índia e do Canadá, além do aumento gradativo do volume de negócios para outros países do Continente Asiático (ICEPA, 2005).

A cada meta de crescimento da produção brasileira de maçã, a realidade consegue superar a previsão. Pomares novos continuam sendo implantados a taxa de 10 a 15% ao ano em relação à área já plantada (ABPM, 2004). Em 2003, a fatia de mercado da maçã importada no mercado interno ficou em torno de 5%. Neste mesmo ano, o Brasil teve um saldo positivo no comércio internacional de maçã de U\$22.069.944, portanto, passou de um país tradicional importador de maçã para exportador (Mello, 2004).

Alguns fatores contribuíram para o crescimento da atividade nos últimos anos, dentre os quais: a política de estímulo empreendida pelos diversos agentes da cadeia produtiva da fruta (organização do produtor, ganho de produtividade, qualidade, certificação e apresentação do produto, manutenção e conquistas de novos mercados); os fatores climáticos favoráveis (quantidade de frio suficiente e chuva no momento certo); o trabalho de polinização e a expansão da área cultivada com macieiras (em idade produtiva) (ICEPA, 2005).

O consumo “per capita” de maçãs no Brasil, passou de 2,22 kg/ano, em 1985, para 4,79 kg/ano, em 2003 (ABPM, 2004). Contudo, o consumo ainda é baixo comparado ao da Turquia e Bélgica e aos países do mercosul que apresentam consumo mais elevado, como a Argentina e o Chile (Mello, 2004). Esta alta no consumo nacional, dificilmente observada em outros produtos agrícolas, deve-se a uma série de fatores, entre os quais: aumento da população nacional, oferta de frutos mais saborosos e a preços mais competitivos que os importados, maior popularização do produto por meio de campanhas publicitárias, aumento do poder de compra e do nível cultural da população, entre outros (Boneti *et al.*, 1999).

As principais variedades cultivadas no Brasil são a ‘Gala’ (46%) e a ‘Fuji’ (45%). Além disso, grande parte dos novos plantios está sendo feita com cultivares derivadas de ‘Gala’ ou ‘Fuji’: ‘Royal Gala’, ‘Imperial Gala’, ‘Fuji Suprema’ e ‘Fuji Kiku 8’. Além destas, há outras recentemente desenvolvidas e que vêm apresentando resultados bastante satisfatórios, de acordo com a

característica buscada (resistência à sarna, cujo agente causal é *Venturia inaequalis*, precocidade sazonal de colheita, resistência na conservação, entre outras), como é o caso das cultivares 'Catarina', 'Imperatriz', 'Daiane' e 'Condessa'. A cultivar 'Gala' e suas derivadas vêm crescendo em importância a medida que aumentam as exportações brasileiras dos frutos das mesmas, pois possuem as características desejadas pelo mercado externo (BRDE, 2000).

Juntamente com o rápido aumento da área de cultivo da macieira, o qual iniciou modestamente no Brasil, chegando a quase 30 mil hectares no ano 2000, houve um aumento dos problemas fitossanitários (Katsurayama *et al.*, 2004). O controle das doenças e o custo do mesmo são fatores limitantes da cultura na atualidade, os fungicidas respondendo por cerca de 20% do total (Boneti *et al.*, 1999). Neves *et al.* (2002) constataram que a cultura da macieira se destacou no ano 2000 com um alto dispêndio de agrotóxicos de US\$494,24/ha, ficando a frente de outras fruteiras importantes como melão, uva e laranja.

Contudo, a exigência cada vez maior dos consumidores por alimentos de melhor qualidade, além da conscientização da população para necessidade de preservação do meio ambiente, tem causado uma gradual mudança nas tecnologias adotadas na produção de maçã em todo o mundo. No Brasil, duas mudanças importantes estão ocorrendo com o cultivo da macieira: a produção orgânica (Fachinelo, 2001) e a produção integrada de maçã (Protas *et al.*, 2001).

Desta forma, a produção de maçãs requer a busca constante por novas soluções tecnológicas (Boneti *et al.*, 1999). Isso implica em redução de custos, incremento de produtividade, qualificação da produção, eliminação de perdas e aumento da eficácia produtiva (BRDE, 2000).

A resistência a doenças e a menor exigência em frio, assim como a qualidade de frutos (aparência e sabor) são as características que norteiam o melhoramento de macieira no Brasil (Denardi, 2004 comunicação pessoal).

4.2 Origem e diversidade genética da macieira (*Malus x domestica* Borkh.)

A evolução da macieira deve ter iniciado há 25 milhões de anos, tendo como centro de origem a região do Cáucaso, cadeia de montanhas da Ásia entre os mares Negro e Cáspio, com 1.200 Km de extensão e altitude de 2.000 m, a oeste da China. O início do desenvolvimento das espécies atuais provavelmente ocorreu após o final da última era glacial, há 20 mil anos (Bleicher, 2002).

O gênero *Malus* possui em torno de 30 espécies, muitas das quais são cultivadas como ornamentais ou para produção de frutos (Janick *et al.*, 1996). A macieira (*Malus x domestica* Borkh.) é, provavelmente, a frutífera que engloba a maior quantidade de variedades conhecidas, pois 3 a 4 mil são cultivadas em grande escala, em diferentes partes do mundo (ABPM, 2004).

Existem evidências de que esta espécie é aloploplóide, tendo sido originada após o cruzamento entre várias espécies do gênero *Malus*. Análises eletroforéticas de isoenzimas do pólen de progênies de cruzamentos controlados e de uma progênie de auto fecundação indicaram que o genoma da macieira tem origem aloploplóide (Chevreau *et al.*, 1985). A espécie *M. sieversii* possui frutos com ampla variação de tamanho e parece ter sido a espécie doadora de pólen para dar origem à macieira cultivada. Além disso, evidências de análises dos genomas nucleares e de cloroplastos indicam que esta espécie pode ter hibridizado com *M. prunifolia*, *M. baccata*, *M. sieboldii*, *M. turkmenorum* e *M. sylvestris* para originar a macieira moderna (Juniper *et al.*, 1998). Análises das seqüências de rDNA (DNA ribossômico) e cpDNA (DNA de cloroplastos) indicam que a macieira domesticada tem relação muito próxima com uma série de espécies de *Malus* (Harris *et al.*, 2002).

Dirlewanger *et al.* (2004) compararam os mapas dos genomas de *Prunus* e *Malus*, constatando que metade do grupo de ligação 1 do genoma de *Prunus* alinha-se com os grupos de ligação L13 e L16 de *Malus*, e o restante alinha-se com o L8. Estes resultados sugerem que, se um dos ancestrais do genoma de *Malus* é fortemente relacionado ao genoma de *Prunus*. Assim, o cromossomo 1 de *Prunus* foi dividido em dois em macieira ou dois

cromossomos ancestrais de *Prunus* se fusionaram depois da separação entre os dois gêneros.

Dois eventos parecem ter sido importantes na domesticação da macieira dentro dos limites de gênero: a introdução inicial de macieira na Europa Ocidental e as hibridizações posteriores entre cultivares e entre cultivares e espécies silvestres. Baseado em dados moleculares pode-se afirmar que os membros da seção *Malus* foram importantes no processo inicial de introdução, particularmente as macieiras silvestres. A variação morfológica, bioquímica e molecular dentro das macieiras silvestres indica que seleções mais antigas de macieiras domesticadas podem ter origem diretamente do tipo silvestre, sem o envolvimento de outras espécies (Harris *et al.*, 2002).

4.3 A Mancha Foliar de Glomerella

No Brasil, o cultivo da macieira está sujeito ao ataque de doenças típicas de clima temperado como é o caso da sarna da macieira, causada por *Venturia inaequalis*. Por outro lado, devido ao inverno ameno das nossas regiões pomícolas, os pomares de macieira são estabelecidos ao lado de vários outros cultivos, situação essa que facilita a disseminação e as epidemias de doenças e pragas. Além disso, devido à cultura da macieira no país estar localizada em regiões de clima marginal para o seu cultivo, está sujeita ao ataque de doenças típicas de clima tropical, como é o caso da Mancha Foliar de Glomerella causada pelo *Colletotrichum* spp., também conhecida como Mancha Foliar da Gala (Katsurayama *et al.*, 2004).

A Mancha Foliar de Glomerella (MFG), causada por *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum* sp., *C. Gloesporiodes* e *C. acutatum*, foi relatada pela primeira vez no Paraná, em 1983 (Leite *et al.* 1988) e disseminou-se por todas as regiões do Brasil onde a macieira é cultivada. Em Santa Catarina, a MFG se estabeleceu no ciclo 1988/89, porém, até o ciclo 1996/97, ficou restrita às regiões mais quentes, com altitude inferior a 1.200 metros (Katsurayama *et al.*, 2000). No ciclo 1997/98, favorecida pela ocorrência do fenômeno “El Niño”, disseminou-se pelos pomares das regiões mais altas e frias de Santa Catarina (1.300 a 1.400 m), tornando-se uma das duas doenças mais importantes da

cultivar 'Gala' e de outras cultivares descendentes de 'Golden Delicious' (Katsurayama *et al.*, 2000; 2001).

Nos Estados Unidos, a MFG foi primeiramente relatada em 1998, quando a mesma foi observada causando sintomas severos em dois pomares da cv. Gala no oeste do estado do Tennessee (González e Sutton, 1999). Mais tarde, foram encontrados sintomas da MFG na Geórgia e Carolina do Norte. Atualmente, nos Estados Unidos, não existe um programa de controle para MFG (González e Sutton, 2004).

Apesar da disseminação globalizada das espécies de *Colletotrichum*, o sucesso das infecções em culturas perenes, estabelecidas em diferentes ecossistemas, depende da sobrevivência do patógeno fora do hospedeiro, da resistência dos tecidos vegetais e das condições ambientais. Primeiramente, a esporulação, a liberação e a dispersão dos esporos são influenciadas pela quantidade da água livre no ambiente. Pelo menos de 1 a 4 horas de alta umidade em temperaturas ótimas (20°C a 30°C) são requeridas para a germinação de esporos e a invasão dos tecidos (Lopez, 2001).

Crusius *et al.* (2002) relataram o aparecimento da MFG em pomares localizados nas regiões de cultivo de macieira no Estado do Rio Grande do Sul, nos anos de 1998 e 1999. Isolados do fungo obtidos a partir de lesões em folhas e frutos corresponderam às espécies *C. gloeosporioides* (75%), *C. acutatum* (8%) e *Colletotrichum sp.* (17%). Estes autores também constataram um aumento da severidade da doença à medida que a temperatura ambiente foi elevada de 14 para 26-28°C, sendo essas temperaturas comuns na primavera e no verão em algumas das regiões produtoras. O período de molhamento foliar parece ser o principal fator limitante no desenvolvimento da Mancha Foliar de Glomerella.

Em inoculações artificiais, todas das espécies acima citadas, causaram lesões típicas nas folhas e frutos da cultivar 'Gala', sendo uma espécie do gênero *Colletotrichum*, ainda não identificada, a mais agressiva, seguida de *C. gloeosporioides*, porém não foram observadas diferenças quanto a tipologia dos sintomas entre as espécies inoculadas (Katsurayama *et al.*, 2000).

Entretanto, em testes de patogenicidade realizados na cultivar Gala (suscetível à MFG), somente os isolados provenientes de *C. gloeosporioides* causaram sintomas típicos de MFG, tanto em folhas como nos frutos desta

cultivar. Os isolados de *C. acutatum* não causaram sintomas de MFG em folhas, mas em frutos ocasionaram sintomas típicos de Podridão Amarga (Hamada, 2005; González e Sutton, 2004).

A MFG é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões necróticas irregulares (Figura 2), associadas com intensa perda da área foliar em macieiras e, geralmente, com muita severidade na cultivar 'Gala', que é a cultivar mais plantada na região sul do Brasil (Leite *et al.*, 1988).



Figura 2: Folha da cultivar 'Gala' apresentando sintomas típicos de Mancha Foliar de Glomerella (Katsurayama, 2003, Epagri - Estação Experimental de São Joaquim).

No estágio inicial, as manchas são difusas e de cor marrom. Após alguns dias o centro da mancha torna-se necrótico, de cor marrom escura. A folha pode ficar inteiramente marrom e cair precocemente. A área colonizada pelo fungo se caracteriza por ser mais clara, apresentar borda bem definida e, geralmente, estar localizada no centro da lesão necrótica (Katsurayama *et al.*, 2000). Carvalho *et al.* (2000) observaram sintomas da doença em ramos da cultivar 'Gala', inoculados com *C. gloesporioides* 48 h após a inoculação e desfolhação ocorrendo em quatro dias depois do aparecimento dos primeiros sintomas da doença. A desfolhação debilita a macieira e, conseqüentemente, há uma significativa redução na produção nos anos subseqüentes. Nos frutos, as lesões são deprimidas, circulares de 1 a 2 mm de diâmetro, de cor marrom-clara a marrom-escura (Leite *et al.*, 1988).

Certas cultivares de macieira, como 'Fuji' e 'Red Delicious', são resistentes à MFG (Figura 3), enquanto outras são altamente suscetíveis (Leite *et al.* 1988). Deste modo, visando determinar a herança da resistência, várias cultivares foram avaliadas quanto à suscetibilidade à MFG. Todas as cultivares do Grupo 'Delicious' testadas, além da 'Catarina', 'Sansa', 'Megumi', 'Himekami' e 'Marunbakaido', entre outras, foram resistentes (R). Por outro lado, as cultivares descendentes da 'Golden Delicious', incluindo a 'Gala' e seus clones, foram suscetíveis. Entre as cultivares suscetíveis (S) não houve diferença no grau de severidade da MFG nas folhas, o que sugere que a suscetibilidade (ou a resistência) é do tipo qualitativo. Também não foi observada a ocorrência de reações intermediárias entre os genótipos estudados (Katsurayama *et al.*, 2004). Trabalhos anteriores com inoculação de plântulas de diferentes cruzamentos de 'Fuji' (R), 'Topred Delicious' (R), 'Golden Delicious' (S) e F9P46 (S), levaram a conclusão de que a reação de suscetibilidade é controlada por um único gene dominante (Katsurayama *et al.*, 2001).



Figura 3: Plantas da cultivar 'Gala' desfolhadas em razão do ataque da MFG (esquerda) ao lado de plantas da cultivar 'Fuji' (à direita) que é considerada resistente a MFG. (Katsurayama *et al.*, 2000).

A quebra de resistência não foi observada na cultivar 'Fuji', quando inoculada com 39 isolados de *Colletotrichum* diferentes, coletados nos três estados do sul do Brasil, comprovando que, neste caso, ocorre uma relação de incompatibilidade entre patógeno e hospedeiro (Hamada, 2005). Segundo a teoria gene-a-gene, esta relação decorre da presença no patógeno de um gene chamado de gene de avirulência (AVR) e sua expressão determina a produção de sinais que provocam uma resposta na planta com o gene específico de resistência (Keen, 1990). No entanto, a expressão do gene de avirulência não impede o patógeno de ser virulento para hospedeiros que não tenham o correspondente gene de resistência, como no caso observado para a cultivar 'Gala'. Flor (1956) demonstrou a complementaridade dos sistemas gênicos do hospedeiro e do patógeno. Após investigar exaustivamente as interações entre vários genótipos de linho e do fungo *Melampsora lini*, ele propôs o modelo de relação gene-a-gene. Segundo ele, a incompatibilidade acontece quando uma planta possui um gene dominante de resistência que corresponde a um gene de "virulência" (mais tarde, trabalhos biologia molecular esclareceram que na verdade se trata de um gene de avirulência), em um determinado patógeno. Uma única planta pode ter muitos genes de resistência, assim como o patógeno também pode ter vários genes de avirulência. A resposta de defesa, que evita a infecção, se dá a partir do momento em que a planta "reconhece" um particular produto do patógeno controlado pelo gene de avirulência.

Contudo, a teoria gene-a-gene é uma das formas utilizadas para explicar as interações complexas que podem ocorrer entre patógeno e hospedeiro. O que se constata na literatura, é um acúmulo de exemplos de interações entre loci e efeitos de "background" na expressão dos caracteres resistência e patogenicidade (Barrett, 1985).

Dantas *et al.* (2003) avaliaram as progênes de 11 cruzamentos entre cultivares e seleções de macieira quanto à resistência a MFG. Os autores observaram que os sintomas nas folhas foram do tipo qualitativo, não havendo diferença quanto à severidade entre as cultivares suscetíveis, reforçando a hipótese de que se trata de uma característica monogênica. Contudo, a hipótese de que um gene adicional ou um terceiro alelo estejam envolvidos na resistência a MFG não foi descartada. Neste mesmo contexto, experimentos mais recentes apontam para a existência de interações mais complexas

envolvidas na resposta ao *Colletotrichum* spp em macieira. Um estudo no qual foram avaliadas 30 cultivares e 20 populações F₁, inoculadas com o isolado SJ 197 contesta a teoria de que um único gene controla a reação ao *Colletotrichum* spp. baseando-se em desvios observados nas proporções esperadas para um gene. Como uma das principais conclusões do trabalho os autores apontam a teoria de que a resistência a *C. gloeosporioides* em macieira pode estar sendo controlada por até três genes que segregam independentemente, sendo a resistência determinada por um gene dominante (C) e outros dois genes recessivos (Dantas *et al.*, 2005).

A partir de 2001, as pesquisas com a Mancha Foliar de Glomerella passaram a constituir uma prioridade para a Associação Brasileira dos Produtores de Maçã (ABPM), com o entendimento de que os resultados alcançados até aquele momento eram pouco promissores e a busca por soluções em curto prazo era de suma importância para sobrevivência do setor, principalmente em regiões de temperatura mais elevada. Desde então, a ABPM passou a dar ênfase na busca pela resistência a partir do melhoramento genético (ABPM, 2004).

A resistência genética é considerada a estratégia mais eficaz no controle de doenças de plantas agrícolas. Há vários exemplos do seu emprego em culturas anuais e perenes, sendo o uso de variedades resistentes de grande auxílio no decréscimo de aplicações e concentrações de fungicidas (Lopez, 2001).

Neste contexto, a Universidade Federal de Santa Catarina integrou-se a este esforço iniciando trabalhos de genética e fisiologia com a macieira, com ênfase na MFG. Desta iniciativa, o primeiro mapa genético de ligação desenvolvido em uma população de macieira, segregando para resistência a Mancha Foliar de Glomerella, foi construído com base em marcadores AFLP e microssatélites. O gene de resistência ao *C. gloeosporioides* (*Cogl*) foi mapeado no grupo de ligação MF 13, a uma distância de 22,4 cM do iniciador microssatélite NZ02b1 (Dantas *et al.*, 2002). Contudo, esta distância entre a marca e o gene não permite o uso de seleção assistida para facilitar a seleção em programa de melhoramento, tampouco auxilia na clonagem do referido gene.

4.4 Utilização de marcadores moleculares no melhoramento da macieira

Embora a macieira venha sendo cultivada há séculos e seja uma das principais árvores frutíferas do mundo, estudos genéticos e de melhoramento têm sido sempre dificultados pelo longo período de cada geração, espaço, tempo e custo envolvidos na análise e manutenção de populações a campo e o modo de reprodução alógamo. Estas mesmas considerações têm estimulado o interesse na genética molecular, pois os marcadores moleculares são ferramentas muito úteis para detectar genes responsáveis por características economicamente importantes e para facilitar a seleção dessas características em programas de melhoramento (Maliepaard *et al.*, 1998).

A seleção de macieiras resistentes à doenças, portadoras ao mesmo tempo de outras características de interesse agrônômico, é tarefa muito difícil devido, principalmente, a auto-incompatibilidade e ao longo período juvenil destas plantas. A clonagem de genes de resistência pode simplificar este processo e facilitar a produção de cultivares de macieira resistentes (Patocchi *et al.*, 1999a), tanto por facilitar o retrocruzamento como por transgenia.

O fato de que os genes de resistência a doenças em plantas possuem seqüências altamente conservadas, possibilitou que os mesmos tenham sido usados para isolar análogos de genes de resistência (RGAs) por PCR, com iniciadores degenerados desenhados para os motivos altamente conservados desses genes em várias espécies de plantas economicamente importantes, inclusive em macieira (Baldi *et al.*, 2004). Estes RGAs freqüentemente são mapeados próximos a genes de resistência “de efeito maior” ou locos controladores de herança quantitativa (QTLs) e podem ser explorados como candidatos a genes de resistência ou ainda ser úteis para seleção assistida por marcadores (Baldi *et al.*, 2004; Calenge *et al.*, 2005). Eles podem também gerar informação sobre a organização e evolução de genes de resistência em genomas de plantas (Lee *et al.*, 2003). Os RGAs já mapeados em macieira (Baldi *et al.*, 2004; Calenge *et al.*, 2005) podem ser utilizados em estudos com populações segregantes buscando genes de resistência as doenças mais importantes economicamente, como a sarna da macieira e a MFG.

O desenvolvimento e a aplicação de marcadores altamente informativos, como os microssatélites, para localizar genes controlando características agrônômicas importantes é essencial para o melhoramento da macieira. Esses marcadores podem ser também utilizados para identificação de variedades e gerenciamento dos recursos genéticos (Gianfranceschini *et al.*, 1998; Goulão *et al.*, 2001).

Embora plântulas, que possuem o gene de resistência à sarna (*Vf*), por exemplo, possam ser selecionados com eficácia por técnicas tradicionais, os marcadores ligados ao gene resistência (*Vf*) podem ser utilizados para a piramidação de genes de resistência monogênica ou para a combinação de *Vf* com genes que conferem resistência parcial. Estes também marcadores podem ser muito úteis para auxiliar a seleção na ausência de inóculo do patógeno (Maliepaard *et al.*, 1998).

Com a utilização da seleção assistida por marcadores, a presença de alelos favoráveis pode ser determinada precocemente e, com isso, o tamanho da população de melhoramento pode ser drasticamente reduzido nos primeiros estágios da seleção, teoricamente por um fator 2^n , onde *n* é o número de locos sobre seleção, com alelos mostrando segregação 1:1 (Liebhard *et al.*, 2003b).

Um exemplo concreto de seleção assistida por marcadores já esta sendo utilizada em *Malus* é decorrente do trabalho de Stankiewicz e colaboradores (2002). Neste trabalho, SCARs desenvolvidos para o gene *Vf*, que confere resistência a sarna, e para o gene *PI2*, que confere resistência ao Oídio (*Podosphaera leucotricha*), foram utilizados para avaliação de uma progênie de um programa de melhoramento. Um dos genitores que apresentou resistência a *P. leucotricha*, mas não continha a marca ligada a *PI2* (que provém de *Malus zumi*), sugerindo que o mesmo pode ser utilizado como uma nova fonte de resistência ao Oídio (Stankiewicz *et al.*, 2002).

King *et al.* (1999) utilizaram marcadores moleculares para avaliar diversas seleções que contêm o gene *Vf* de *Malus floribunda*, em variados estágios de “pseudo-retrocruzamento”, procurando estimar quanto do genoma da mesma ainda era retido nas seleções. Estes autores constataram que as seleções que apresentavam maior resistência apresentam grande retenção do genoma de *M. floribunda* na região ao redor do gene *Vf*, mesmo depois de 5 a 6 gerações de introgressão.

Recentemente, projetos de genômica de macieira produziram milhares seqüências EST (seqüências expressas marcadas), nas quais agora pode-se buscar seqüências de microsatélites, que podem ser usadas para desenvolver novos marcadores (Naik *et al.*, 2006; Silfverberg-Dilworth *et al.*, 2006). Esta estratégia tem como principal vantagem o fato de que os marcadores são desenvolvidos para regiões codificadoras (Silfverberg-Dilworth *et al.*, 2006). O uso desse tipo de marcador aumenta o uso dos mapas genéticos de ligação, pois estes marcadores facilitam a transição da análise de ligação genética para a estratégia de mapeamento de candidatos a genes para dissecar características complexas (Naik *et al.*, 2006).

4.5 Mapeamento genético da macieira

Os primeiros mapas genéticos de ligação descritos em macieira foram construídos utilizando isoenzimas e RAPDs (Weeden *et al.*, 1987; Conner *et al.*, 1997). Weeden *et al.* (1987) utilizaram nove sistemas enzimáticos para construir um mapa genético para macieira. Os autores buscavam encontrar ligação entre os locos analisados e algumas características fenotípicas como resistência a sarna, além de outras doenças. Contudo, não encontraram correlação entre a herança das aloenzimas e os fenótipos resistentes.

Conner *et al.* (1997) construíram mapas de ligação em progênies de macieira utilizando uma combinação de marcadores morfológicos, RAPDs e isoenzimas. A média de distância entre os marcadores nos mapas foi em torno de 5,0 cM, sendo que um dos mapas continha 110 marcas, agrupadas em 16 grupos de ligação, e o outro mapa foi constituído com 238 marcas, arranjadas em 19 grupos de ligação.

Posteriormente, foram desenvolvidos marcadores como os microsatélites (*Simple Sequence Repeats* ou seqüências simples repetidas - SSR), sendo esse tipo de marcador abundante no genoma das espécies de *Malus* (Guilford *et al.*, 1997; Gianfranceschini *et al.*, 1998; Hokanson *et al.*, 1998; Liebhard *et al.*, 2002). Em uma biblioteca genômica construída com DNA da cultivar 'Golden Delicious', as repetições de di-nucleotídeos mais freqüentes foram (GA)₁₀ e, em geral, tri e tetra-nucleotídeos foram menos freqüentes (Hokanson *et al.*, 1998). Gianfranceschini *et al.* (1998) desenvolveram 16

iniciadores SSR para *Malus X domestica* (Borkh), que foram validados em 19 cultivares desta espécie. Estes marcadores apresentaram alto nível de polimorfismo, com 8,2 alelos por loco, proporcionando o valor de 0,78 para a heterozogozidade média. Posteriormente, foram desenvolvidos outros 140 iniciadores microssatélites dos quais 115 foram posicionados no mapa de ligação do cruzamento 'Fiesta' x 'Discovery'. A média de alelos por loco foi 6,1, sendo a heterozigosidade média de 0,74 (Liebhard *et al.*, 2002).

A maior vantagem dos marcadores microssatélites é que eles são facilmente transferíveis de um mapa para outro, sendo muito úteis também no alinhamento de mapas. O uso de marcadores baseados em PCR, como os microssatélites e AFLPs, requer pouca quantidade de DNA e oferece uma estratégia simples, rápida e reprodutível para construção de mapas transferíveis (Liebhard *et al.*, 2003a).

Hemmat *et al.* (2003) avaliaram 41 microssatélites desenvolvidos para macieira por diferentes grupos de pesquisa, analisando a transferibilidade dos mesmos para diferentes cruzamentos e para pereira (*Pyrus communis* L.). Dos iniciadores analisados, 24 foram consistentemente polimórficos e transferíveis, sendo então recomendados como “marcas-âncoras” para mapas de macieira.

Marcadores AFLP (Vos *et al.*, 1995) também têm sido empregados com sucesso para propósitos de saturação de mapas genéticos de macieira, produzindo um grande número de marcas polimórficas em poucas reações (Xu *et al.*, 2000). Apesar da técnica de AFLP ser eficiente na rápida produção de marcadores em um mapa de ligação específico, a transferibilidade de um mapa para outro é muito baixa (Liebhard *et al.*, 2003a).

Grupos de pesquisadores em todo mundo têm desenvolvido mapas do genoma da macieira. Os mapas já existentes podem ser classificados em dois grupos distintos: mapas de referência, com o objetivo de servir de base para pesquisas futuras (Maliepaard *et al.*, 1998; Liebhard *et al.*, 2003a), e mapas específicos, que visam localizar genes de interesse, como genes de resistência a doenças (Yang *et al.*, 1997; King *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1998, Patocchi *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2002; Huaracha *et al.*, 2004) ou relacionados a características de crescimento e desenvolvimento das plantas (Conner *et al.* 1998; Liebhard *et al.*, 2003b).

Um mapa de referência ideal deve conter pelo menos um “esqueleto” de marcadores codominantes como RFLPs ou microssatélites, que tem boa reproducibilidade, podendo ser transportados de uma progênie para outra e, então pode ser complementado com marcadores RAPD e AFLP para saturar as regiões do genoma de maior interesse (Maliepaard *et al.*,1998).

Liebard *et al.* (2003a) utilizaram um total de 840 marcadores, sendo 475 AFLPs, 235 RAPDs, 129 microssatélites e 1 SCAR para construir o mais avançado mapa de referência para o genoma da macieira (*Malus x domestica* Borkh.), tanto em relação à cobertura do genoma, como em relação a densidade de marcadores.

O gene *Vf*, proveniente da cultivar *Malus floribunda* 821 é responsável pela reação de resistência a sarna da macieira causada pelo fungo *Venturia inaequalis* (Che.) Wint. Esta doença que tem sido considerada a mais importante da espécie a nível mundial, tem sido alvo de um grande volume de estudos com o auxílio de ferramentas moleculares (King *et al.*,1998; Patocchi *et al.*,1999; Xu *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2002; Huaracha *et al.*, 2004). Marcadores ligados ao gene *Vf* foram utilizados para análise de bibliotecas genômicas de macieira, com objetivo de promover a clonagem do gene baseada em mapa da região de *Vf* (Patocchi *et al.*,1999b; Xu *et al.*, 2002). Contudo, não é apenas o gene *Vf* que confere resistência a Sarna. Estudos de mapeamento do gene *Vm*, que também confere resistência a essa doença, foram feitos com o intuito de encontrar um marcador associado a ele que possa ser útil na piramidação de genes de resistência e na identificação de acessos nas coleções de germoplasma de *Malus* portadores do referido gene (Cheng *et al.*, 1998).

Marcadores moleculares também foram utilizados para análise de características de crescimento e desenvolvimento em plantas juvenis de macieira. O número de regiões genômicas associadas com cada característica variou de 1 a 8 e a quantidade de variação explicada pela regressão de cada loco individual (R^2) variou de 3,9 a 24,3%, com média de 7% (Conner *et al.*,1998).

Características quantitativas quase sempre se constituem em questões de difícil resolução, em se tratando de mapeamento genético. Nesse estudo acima referido, os dois maiores problemas foram: associação de marcadores com uma característica quantitativa somente em um ano e a limitação de

marcadores dominantes em análises de locos de características quantitativas, os QTLs (Conner *et al.*, 1998). Por sua vez, a maior limitação encontrada por Liebhard *et al.* (2003b) foi o fato de que os resultados encontrados em análises de QTLs em macieira raramente podem ser comparados, pois a maioria dos mapas existentes não possuem número suficiente de regiões saturadas com marcas transferíveis, como microssatélites.

5 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MAÇÃ – ABPM. Site:<
<http://www.abpm.org.br/> > - acesso em: 20 maio 2004.

BALDI, P.; PATOCCHI, A.; ZINI, E.; TOLLER, C.; VELASCO, R.; KOMJANC, M. Cloning end linkage mapping of resistance gene homologues in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.231-239, 2004.

BARRETT, J. The gene-for-gene hypothesis parable or paradigm. **E. and Genetics of host- parasite Interations**, p. 215-225, 1985.

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

BONETI, J.I.S.; CESA, J. D.; PETRI, J. L.; HENTSCHKE, R. **Cadeias produtivas do estado de Santa Catarina: Maçã**. Boletim técnico N°105, Epagri, Florianópolis, SC, 94p., 1999.

BRDE - Banco Regional do desenvolvimento do Extremo do Sul. **Estudo sobre o setor de maçãs na região Sul do Brasil**. Diretoria de planejamento, março, 2000.

CALENGE, F.; VAN DER LINDEN, C.G.; VAN DE WEG, E.; SCHOUTEN, H. J.; VAN ARKERL, G.; DENAMCE, C.; DUREL, C.E. Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.660-668, 2005.

CARVALHO, F. M. S.; LEITE Jr., R. P.; BUENO, B. Pathogenic characterizatin of *Coletotrichum* spp. Acociated with apple diseases in southern Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.1, 2000.

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

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

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

CONNER, P. J.; BROWN, S. K.; WEEDEN, N. F. Randomly amplified polymorphic DNA-based genetic linkage maps of three apple cultivars. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 122, n.3, p. 350-359, 1997.

CRUSIUS, L. U.; FORCELINI, C. A.; SANHUEZA, R. M.V.; FERNANDES, J. M. C. Epidemiology of apple leaf spot. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.1, p. 65-70, 2002.

DANTAS, A. C. M.; VIEIRA, E. A.; BONETI, J. I.; DALBÓ, M.; NODARI, R. O. Construção de mapas genéticos de ligação em uma população de macieira (*Malus x domestica* Borkh.) segregando para a mancha foliar (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.). In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém, PA. **Anais...**, Belém, PA, 2002.

DANTAS, A.C.M.; BONETI, J. I.; KATSURAYAMA, Y.; NODARI, R.O. Herança da resistência da Mancha Foliar (*Colletotrichum Gloeosporioides* Penz.) em macieira. In: CONGRESSO BRASILEIRO MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2, Porto Seguro, 2003. **Anais...** Porto Seguro, 2003.

DIRLEWANGER, E.; GRAZIANO, E.; JOOBEUR, T.; GARRIGA-CALDERÉ, F.; COSSON, P.; HOWAD, W.; ARÚS, P. Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruitcrops. Disponível em : <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0337937101>>. Acesso em: 15 julho 2004.

FACHINELLO, J. C. Produção orgânica de frutas: limitações e oportunidades. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO,4. , Fraiburgo, SC, 2001. **Anais...**, Caçador, SC: Epagri, 2001, 201p.

GIANFRANCESCHINI, L.; SEGLIAS, N.; TARCHINI, R.; KOMJANC, M.GESSLER, C. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.1069-1076, 1998.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T. B. First Report of Glomerella Leaf Spot (*Glomerella cingulata*) of Apple in the United States. **Plant Disease**, v. 83, n. 11, p. 1074. 1999.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T. B. Population Diversity within Isolates of *Colletotrichum spp.* Causing Glomerella Leaf Spot and Bitter Rot of Apples in Three Orchards in North Carolina. **Plant Disease**, v. 88, p.1335-1340, 2004.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v. 122, p. 81-89, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic map of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testecross mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v. 137, p. 1121-1137, 1994.

GUILFORD, P.; PRAKASSH, S.; ZHU, J. M.; RIKKERINK, E.; GARDINER, S.; BASSETT, H.; FORSTER, R. Microsatellites in *Malus X domestica* (apple): abundance, polymorfism and cultivar identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.249-254, 1997.

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

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

HEMMAT, M.; WEEDEN, N. F.; BROWN, S. K. Mapping and evaluation of *Malus X domestica* microsatellites in apple and pear. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 128, n.4, p. 515-520, 2003.

HOKANSON, S. C.; SNEWC-McFADDEN, A. K.; LAMBOY, W.F.; McFERSON, J.R. Microsatellites (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus X domestica* Borkh. core subset collection. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.671-683, 1998.

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

INSTITUTO DE PLANEJAMENTO E ECONOMIA AGRÍCOLA DE SANTA CATARINA (ICEPA). Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2004-2005. Disponível em <<http://www.icepa.com.br/>> Acesso em: 20 março 2006.

JANICK, J.; CUMMINS, J.N.; BROWN, S. K.; HEMMAT, H. Apples. In: JANICK, J., MOORE, J.N. (ED.) **Fruit breeding: tree and tropical fruits**. New York: John Wiley & Sons, 1996. v.1, p, 1-78.

JANSE, J. Breeding of resistant apple varieties in the Netherlands. **Acta Horticulturae**, v. 343, 1993.

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

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S.; BECHER, W. F. B. Mancha foliar da Gala: principal doença de verão da cultura da macieira. **Agropecuária Catarinense**, V. 13, n.3, p. 14-19, 2000.

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

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I.S.; OZACA, T. Sobrevivência de *Colletotrichum goeosporioides*, agente causal da mancha foliar da gala. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, (Suplemento): 383 (Resumos), 2000.

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

KEEN, N.T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annual Review Genetics**, Palo Alto, v. 24, p 447-463, 1990.

KING, G. J.; TARTARINI, S.; BROWN, L.; GENNARI, F. Introgression of the Vf source of scab resistance and distribution of linked marked alleles within the *Malus* gene pool. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.1039-1046, 1999.

KING, G. J.; ALSTON, F. H.; BROWN, L. M.; CHEVREAU, E.; EVANS, K. M.; DUNEMANN, F.; JANSE, J.; LAURENS, F.; LYNN, J. R.; MALIEPAARD, C.;

MANGANARIS, A. G.; ROCHE, P.; SCHIMIDT, H.; TARTARINI, S.; VERHAEGH, J.; VRIELINK, R. Multiple field and glasshouse assessment increase the reliability of linkage mapping of the Vf source of scab resistance in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.699-708, 1998.

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

LEE, S.Y.; SEO, J. S.; RODRIGUEZ-LANNETTY, M.; LEE, D. H. Comparative analysis of super families of NBS-encoding disease resistance gene analogs in cultivated and wild apple species. **Molecular genetics genomics**, v. 269, p.101-108, 2003.

LIEBHARD, R.; GIANFRANCESCHINI, L.; KOLLER, B.; RYDER, C. C.; TARCHINI, R.; VAN DE WEG, E.; GESSLER, C. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Molecular Breeding**, v.10, p.217-241, 2002.

LIEBHARD, R.; KELLERHALS, M.; PFAMMATTER, W.; JERTMINI, M.; GESSLER, C. Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Plant Molecular Biology**, v.52, p.501-526, 2003b.

LIEBHARD, R.; KOLLER, B.; GIANFRANCESCHINI, L.; GESSLER, C. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.1497-1508, 2003a.

LIMA, E. B.; BLUM, L. E. B.; DEZANET, A.; ÁVILA, R. D.; WEINGÄRTNER, S.; NETO, P. H.; MARCON, M.; SIEGA, V.; AMARANTE, C. V. T.; DOMINGOS, M. D. Aspectos Epidemiológicos da Mancha Foliar da 'Gala' (2001/2002). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., Porto Seguro, 2003. **Anais...** Porto Seguro, 2003.

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

MALIEPAARD, C.; ALSTON, F. H.; VAN ARKEL, G.; BROWN, L. M.; CHEVREAU, E.; DUNEMANN, F.; EVANS, K. M.; GARDINER, S.; GUILFORD, P.; VAN HEUSDEN, A. W.; JANSE, J.; LAURENS, F.; LYNN, J. R.; MANGANARIS, A. G.; DEN NIJS, A. P. M.; PERIAM, N.; RIKKERINK, E.; ROCHE, P.; RYDER, C.; SANSVINI, J. J.; SCHMIDT, H.; TARTARINI, S.; VERHAEGH, J. J.; VRIELINK-VAN GINKEL, M.; KING, G. J. Aligning male and

female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p.60-73, 1998.

MELLO, L. M. R. **Produção e mercado de maçã**. Comunicado técnico nº 50, Embrapa, Bento Gonçalves, RS, junho, 2004.

MILCHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 9828-9832, 1991.

NAIK, S.; HAMPSON, C.; GASIC, K.; BAKKEREM, G.; KORBAN, S.S. Development and linkage mapping of E-STS and RGA markers for functional gene homologues in apple. **Genome**, v. 49, p. 959-968, 2006.

NEVES, E. M.; DAYOUB, M.; DRAGONE, D.S. Análise da demanda por defensivos pela fruticultura brasileira- 1997- 2000. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal,SP, v. 24, n.3 p. 694-696, 2002.

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

PATOCCHI, A.; VINATZER, B. A.; GIANFRANCESCHI, L.; TARTARINI, S.; ZHANG, H. B.; SANSVINI, S.; GESSLER, C. Construction of a 550 kb BAC contig spanning the genomic region containing the apple scab resistance gene Vf. **Molecular genome genetic**, v.262, p.884-891, 1999b.

PROTAS, J. F. S.; KREUZ, C. L.; FREIRE, J. M. Sistemas de produção integrada e convencional de maçã: Uma análise comparativa de custos. In.: NACTIGAL, G. R., CZERMAINSKI, A. B. C. (eds). SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS, 3., 2001, Bento Gonçalves, RS. **Anais...**, Bento Gonçalves, RS, Embrapa, 2001, 108p.

SILFVERBERG-DILWORTH, E.; MATASCI C. L.; VAN DE WEG, W. E.; VAN KAAUWEN, M. WALSER, M. P. W.; KODDE, L. P.; SOGLIO, V.; GIANFRANCESCHI, L.; DUREL, C. E.; COSTA, F.; YAMAMOTO, T.; KOLLER, B.; GESSLER, C.; PATOCCHI, A. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. **Tree Genetics & Genomes**, v. 2 p. 202–224, (2006).

STANKIEWICZ, M.; PIERA, E.; GANRONSKI, S. W. The use of molecular markers in apple breeding for disease resistance. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 7 p. 445-448, 2002.

WEEDEN, N. F.; LAMB, R.C. Genetics and linkage analysis of 19 isozyme loci in apple. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 112, n.5, p. 865-872, 1987.

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

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

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

YOSHIDA, Y.; KATSURAYAMA, Y. Melhoramento genético da macieira no Brasil: perspectiva e contribuição das cultivares japonesas. **Agropecuária Catarinense**, V. 6, n.4, p. 12-15, 1993.

CAPÍTULO 1:

Caracterização da segregação genética em macieira para reação à Mancha Foliar de Glomerella em três populações de segregantes

RESUMO

A Mancha Foliar de *Glomerella* (MFG) é considerada uma das doenças mais importantes da macieira no sul do Brasil. A preocupação em conhecer a herança genética da resistência a esta doença é crescente, pois a mesma causa grandes prejuízos nas regiões produtoras e, até o momento, não existe medida eficaz de controle químico, que atenda as exigências da produção integrada. Neste trabalho foi analisada a reação à MFG em três populações segregantes (M-13/91 x M-46/94, M-13/91 x 'Gala' e 'Pink Lady' x 'Imperatriz'), provenientes do programa de melhoramento genético da Epagri/ Estação Experimental de Caçador. Os resultados obtidos nos bioensaios indicaram a necessidade de se fazer ajustes de metodologia para inoculação da MFG em cada caso. A reação identificada nas populações em estudo aponta para uma resistência monogênica recessiva. Contudo, os valores encontrados também não permitem rejeitar as hipóteses de segregação de 9:7 ou 2:1 seja: não se descarta a hipótese de que outro gene esteja interferindo nas respostas das plantas ao *Colletotrichum* spp.

INTRODUÇÃO

Desde a primeira constatação em 1983 no Paraná, a Mancha Foliar de *Glomerella* – MFG, também conhecida como “Mancha Foliar da Gala”, causada pelo fungo *Colletotrichum* spp. (Leite *et al.*, 1988), tem sido disseminada pelos pomares de macieira do Sul do Brasil, sendo hoje considerada uma das doenças mais importantes da macieira. Segundo Boneti *et al.* (1998), a doença se manifesta durante o verão, causando lesões nas folhas e nos frutos, podendo causar desfolhamento superior a 75%, o que pode afetar seriamente a produção do ano seguinte.

Nos estados Unidos, a MFG foi primeiramente relatada em 1998, quando foram observados sintomas severos em dois pomares da cv. 'Gala' no oeste do estado do Tennessee (González e Sutton, 1999). Mais tarde, foram encontrados sintomas da MFG, nos estados da Geórgia e Carolina do Norte (González e Sutton, 2004). Ainda que a MFG e a podridão amarga pareçam ser

causadas pelo mesmo patógeno (*G.cingulata*) diferenças na morfologia, características da cultura e patogenicidade entre isolados obtidos de frutos com podridão amarga e folhas atacadas pela MFG, têm sido observadas (Taylor, 1971; Leite *et al.*, 1988; González e Sutton, 2004). Outro aspecto importante é o fato de que só recentemente a MFG foi relatada nos Estados Unidos, enquanto a podridão amarga é endêmica em muitas regiões produtoras de maçã daquele país e tem sido amplamente reportada há bastante tempo pela literatura científica. Atualmente, nos Estados Unidos não existe um programa de controle para MFG (González *et al.*, 2006).

Via de regra, a MFG ataca cultivares de macieira descendentes da 'Golden Delicious', cultivar portadora de alta suscetibilidade a esta doença. Por outro lado, descendentes da 'Delicious', em geral, não são atacadas. Dentre as cultivares afetadas, 'Gala', que é uma das mais plantadas no Sul do Brasil, apresenta alta suscetibilidade; enquanto 'Fuji', também importante nesta região, como descendente da 'Delicious', não é infectada (Katsurayama *et al.*, 1999). Uma das medidas de controle mais eficazes, seria a substituição das cultivares suscetíveis por resistentes. Devido à importância da cv. Gala, tanto no mercado interno quanto para exportação, vem crescendo a preocupação por parte dos produtores e melhoristas, no sentido de uma solução mais eficiente e de menor custo que o uso de agroquímicos no controle da MFG, sem a necessidade de abandonar esta cultivar. Uma estratégia segura e eficiente seria a introdução do gene de resistência a MFG, já conhecido em outras cultivares, via engenharia genética, na própria 'Gala' (ABPM, 2004).

Diferente da sarna da macieira, que ocorre na primavera, um dos pontos mais críticos no controle da MFG é o aumento da severidade durante o verão, no período que antecede a colheita, resultando em maior risco de contaminação da fruta por pesticidas usados no controle. Os fungicidas de efeito protetor, do grupo dos ditiocarbamatos, apresentam ação fungitóxica inespecífica e têm sido recomendados, aliados a sistemas de previsão da ocorrência da doença. Tais fungicidas são considerados os mais eficientes no controle da MFG; embora, ainda não existem fungicidas de alto poder curativo contra esta doença (Cerezine *et al.*, 1992; Katsurayama *et al.*, 2000; 2001). Além disso, as normas da Produção Integrada de Maçã – PIM, no Brasil, restringem o uso sistemático dos ditiocarbamatos. Por isto, estes produtos

devem ser usados em alternância com fungicidas de outros grupos químicos (Katsurayama *et al.*, 2004).

Assim, os elevados danos econômicos causados pela MFG indicam a necessidade de entender os mecanismos envolvidos na resistência a esta doença. Até o momento, não existem medidas eficazes de controle químico que atendam as normas da PIM. Daí a importância de se conhecer as bases genéticas e o comportamento dos genes de resistência em diferentes “backgrounds” genéticos, como passo decisivo na compreensão da reação da planta a esse fungo.

Os objetivos deste trabalho foram então: avaliar a reação à MFG em três populações segregantes e ajustar a metodologia de avaliações fenotípicas da resistência à MFG, reduzindo ao máximo os efeitos ambientais.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Neste estudo, foram utilizadas três populações segregantes. A população 1 possui 180 plantas e originou-se do cruzamento entre duas seleções resistentes à MFG: M-13/91 (R) x M-46/94.(R). A segunda população originou-se do cruzamento M-13/91 (R) x ‘Gala’ (S) e possui 116 plantas. A população número 3 originou-se do cruzamento entre ‘Pink Lady’ (S) x ‘Imperariz’ (R) e possui 94 plantas. Os cruzamentos foram realizados na Epagri/ Estação Experimental de Caçador (EECd) – SC.

As populações de plantas, previamente cultivadas em estufa durante o inverno, foram cultivadas a campo, desde 2003, no espaçamento de 1,2 m x 0,30 m, onde os tratamentos culturais restringiram-se à adubação nitrogenada e ao controle de plantas invasoras. Consoante às características genéticas dos parentais, era esperado que as populações para mapeamento, dentre muitas outras características, segregassem também para reação à MFG.

Conforme exposto anteriormente, a seleção M-13/91 é parental comum de duas das populações objetos deste estudo. Isto possibilita a comparação dos tipos de reações à MFG observadas nestas duas populações.

Reação a isolados da Mancha Foliar de *Glomerella* (*Colletotrichum* spp)

Foram testadas três metodologias diferentes de inoculação para a avaliação da reação à MFG (Figura 1). No primeiro bioensaio foram utilizadas as plantas das populações M-13/91 x M-46/94 e M-13/91 x 'Gala'. Destas populações, foram coletadas brotações de ramos terminais, de aproximadamente 25 cm, com 6 a 8 folhas, três ramos de cada planta, cada ramo foi considerado como repetição. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado.

Foi utilizado o isolado *C. gloeosporioides*. 197 SJ, proveniente da Epagri, Estação Experimental de São Joaquim. Esse isolado foi escolhido por ser bem caracterizado quanto a sua agressividade e é uma referência nos trabalhos com MFG. O isolado foi mantido em placas contendo meio BDA por 3 a 5 dias. Após este período, os conídios foram suspensos em água destilada estéril. A suspensão de conídios foi filtrada e a concentração final de conídios foi ajustada para concentração de 10^5 conídios/mL. A parte apical dos ramos foi inoculada, de forma uniforme até que os mesmos ficassem molhados, sem que escorresse o inoculo. Isso foi feito utilizando-se um compressor de ar. Durante o experimento, os ramos foram mantidos durante 120 h, em potes plásticos contendo solução de sacarose a 2%. O ambiente de incubação foi mantido com 100% de UR nas primeiras 24 h e acima de 80% nas demais, sempre sob temperatura de 24° C ($\pm 1^{\circ}$ C), com fotoperíodo de 12h. Como controle utilizaram-se os parentais das duas progênies, além da cv. Fuji (R) como controle negativo. As plantas foram avaliadas quanto à reação e suscetibilidade as 48, 72, 96 e 120 h.

No segundo bioensaio de inoculação, objetivando confirmar os resultados encontrados com ramos destacados, os indivíduos da população M-13/91 x M-46/94 foram enxertados sobre o porta-enxerto M9. Um total de 118 indivíduos foram inoculados. Foram realizadas duas inoculações, cada uma com um isolado diferente (*C. gloeosporioides* 197 SJ e um isolado de *C. acutatum*) sendo utilizadas 2 mudas de cada indivíduo, consideradas como repetições em cada inoculação. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. Aqui também os parentais do cruzamento e a cv. Gala foram utilizados como testemunhas. Os isolados foram mantidos em meio líquido à base de amido de

batata com 1% de sacarose, sob agitação em temperatura ambiente por 3 a 5 dias, conforme metodologia de rotina do laboratório de Fitopatologia da Estação Experimental de São Joaquim. Após este período, a solução foi filtrada e a concentração de conídios ajustada para 10^6 conídios/mL. Durante o experimento, as mudas foram mantidas em câmara de inoculação durante 24 h, com umidade relativa de 100% e na temperatura de 24° C. Após isto, foram transferidas para sala de crescimento, com fotoperíodo de 12 h e umidade relativa acima de 80%, mantendo-se a temperatura de 24° C ($\pm 1^\circ$ C). Os indivíduos foram avaliados para presença (suscetíveis) ou ausência (resistentes) de sintomas de MFG 48, 72, 96 e 120 h após a inoculação.

O terceiro bioensaio foi realizado também com ramos destacados, 3 ramos por planta, coletados das populações M-13/91 x 'Gala' e 'Pink Lady' x 'Imperatriz', como descrito para o bioensaio 1, constituindo-se numa variação da primeira inoculação, modificando-se o sistema de umidificação do ambiente. Após a inoculação, os ramos foram borrifados com água e em seguida envoltos com sacos plásticos. Vinte e quatro horas após, foram novamente borrifados e assim mantidos por mais 24 h. Após este período, os sacos plásticos foram removidos, mantendo-se o ambiente sem umidificação artificial até a avaliação final. Neste caso, foi utilizado um subconjunto de indivíduos da população M-13/91 x 'Gala' constituído por 40 plantas, as quais na sua maioria apresentavam sintomas não típicos da MFG na primeira avaliação. Os indivíduos foram avaliados 48, 72, 96 e 120 h após a inoculação. Neste experimento foi adicionado um ramo não inoculado de cada planta como controle negativo, além dos controles habituais, ou seja os parentais.



Figura 1: Condições das câmaras de inoculação nas diferentes metodologias de inoculação.

A) Ramos inoculados na câmara de inoculação com o umidificador em funcionamento, conforme o bioensaio1 (acima e a esquerda).

B) Mudanças na câmara de inoculação, conforme o bioensaio 2. (centro)

C) Ramos inoculados, envoltos com sacos plásticos, conforme o bioensaio 3.

RESULTADOS

No primeiro bioensaio, após 96 h de incubação, na população M-13/91 x 'Gala', as folhas mais jovens das plantas suscetíveis se apresentavam totalmente tomadas por sintomas típicos da MFG, indicando alto grau de severidade. Na Figura 2 é mostrada esta evolução dos sintomas. Observou-se que após 72 h da inoculação, os ramos apresentavam severos sintomas da doença e que com 96 h, os ramos estavam completamente tomados pela doença. Das 116 plantas inoculadas, 87 plantas foram suscetíveis e 29 resistentes, segregação esta que se desvia significativamente da proporção de 1:1 que era esperada considerando-se a hipótese já formulada anteriormente de que a resistência à MFG está sob controle monogênico. Contudo, algumas plantas consideradas suscetíveis apresentaram lesões necróticas não típicas da MFG.

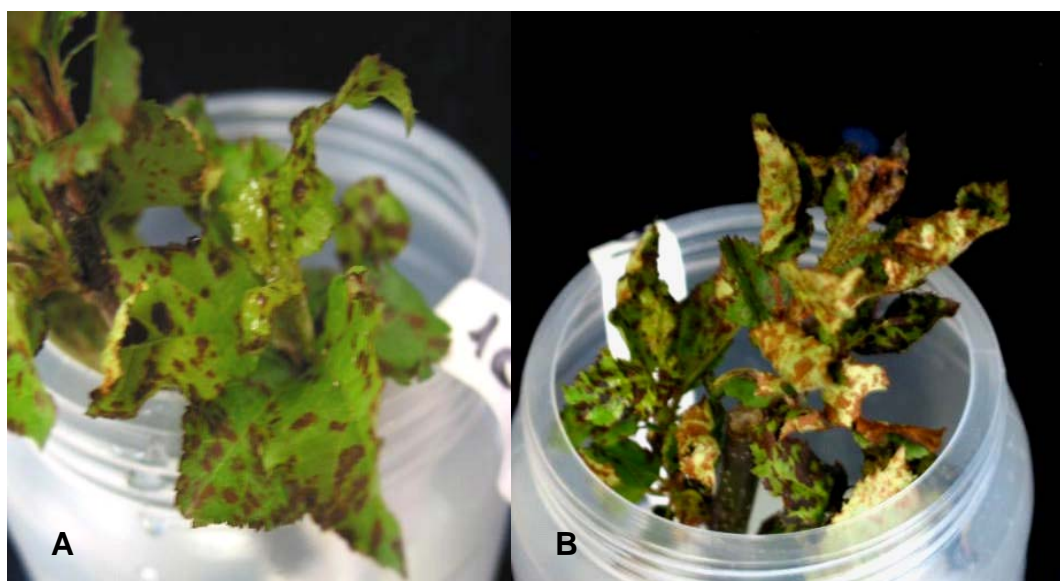


Figura 2: Evolução dos sintomas nas folhas de uma das plantas do cruzamento M-13/91 x 'Gala' (A) 72 h após a inoculação. (B) 96 h após a inoculação.

A população derivada do cruzamento M-13/91 x M-46/94, no entanto, apresentou reação diferente da população anterior. Admitindo-se a hipótese da segregação monogênica recessiva, a expectativa era de que não houvesse manifestação de sintomas da doença nesta população, pois os

dois parentais são considerados resistentes a MFG. Das 125 plantas inoculadas, 123 apresentaram manchas necróticas semelhantes aos sintomas da MFG (Figura 3), mas não idênticas, das quais isolou-se em laboratório o fungo causador da doença, *C. gloeosporioides*.

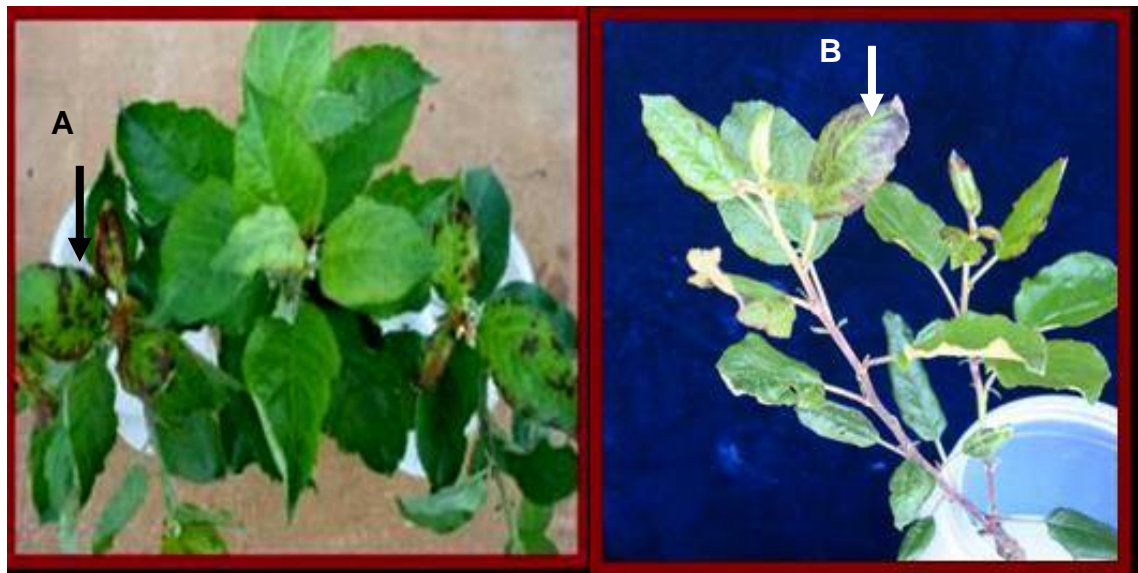


Figura 3: Lesões necróticas nas folhas de plantas provenientes do cruzamento M-13/91 x M-46/94: A) 72 h após a inoculação. B) 120 h após a inoculação.

Tanto para esta população quanto para a população anterior, a forma de distribuição da presença da doença não confirma a hipótese mais aceita atualmente, qual seja a de um gene, sendo a resistência condicionada pela dose dupla de alelos recessivos. É possível que alguns dos sintomas observados não sejam indicação de suscetibilidade, uma vez que o fungo *C. gloeosporioides* pode sobreviver como saprófita no hospedeiro (Lopes, 2001). Neste caso, as lesões podem ser causadas por outros fatores, como estresse fisiológico e excesso de umidade. Os sintomas observados ocorreram após incubação sob nebulização intermitente. É possível que as manchas necróticas tenham sido causadas pela alta umidade a qual os ramos foram submetidos.

Motivados por esta suspeita, realizou-se o segundo bioensaio com a população M-13/91 x M-46/94, desta vez utilizando-se mudas enxertadas. Esse novo desenho experimental teve por objetivo diminuir ao máximo os efeitos ambientais, permitindo assim isolar com mais precisão os componentes

genéticos da reação hospedeiro-patógeno. Neste bioensaio, as plantas não apresentaram nenhum sintoma típico da MFG, em nenhuma das repetições embora inoculados com dois diferentes isolados. Como era esperado, as manifestações de sintomas típicos ficaram restritas à 'Gala', usada como testemunha. Portanto, os resultados deste bioensaio não confirmam os resultados anteriores encontrados na população M-13/91 x M-46/94, no bioensaio realizado com ramos destacados. Desta forma, é provável que as manchas encontradas no primeiro bioensaio nesta população tenham sido causadas por estresse fisiológico.

No terceiro bioensaio, com a diminuição da umidade na câmara de incubação os sintomas causados por estresse fisiológico puderam ser sensivelmente reduzidos. As lesões necróticas atípicas da doença observadas no primeiro ensaio, nos indivíduos da população M-13/91 x 'Gala', não apareceram neste ensaio. Diante disto, corrigiu-se os valores da segregação de reação à MFG, resultando em 69 suscetíveis: 47 resistentes. A estes valores foi aplicado o teste qui-quadrado para a hipótese de segregação 1:1 resultando em um valor de $\chi^2 = 4,17$ ($P = 0,041$).

Na população 'Pink Lady' (S) x 'Imperatriz' (R) a segregação ajustou-se a proporção de 1:1, pois foram observados 51 plantas resistentes e 43 suscetíveis, com sintomas típicos da MFG (Tabela 1).

Os resultados obtidos indicaram que a metodologia de inoculação em ramos enxertados elimina significativamente a ocorrência de necroses causadas por estresse ou excesso de umidade, que é necessária quando são utilizados ramos não enxertados. Contudo, essa é uma metodologia difícil de ser implantada de forma rotineira em programas de melhoramento, pois exige grande disponibilidade de porta-enxerto e mão de obra, além do tempo de espera entre a realização da enxertia e a avaliação. Para plantas menos sensíveis como as provenientes dos cruzamentos M-13/91(R) x 'Gala'(S) e 'Pink Lady'(S) x 'Imperatriz'(R) a metodologia de inoculação em ramos destacados pode ser utilizada, tomando-se os cuidados de evitar o excesso de umidade no ambiente de incubação e de adicionar repetições não inoculadas ao experimento como controle negativo. Nestes casos, a grande vantagem desta metodologia é a praticidade e não necessidade de enxertia.

Tabela 1: Teste de hipótese de segregação em cada uma das populações avaliadas.

População*	Classes ^{1/}		Hipótese	X ²	Probabilidade
	S	R			
M-13/91 x M-46/94	0	118	0:1	0	1
M-13/91 x 'Gala'	69	47	1:1	4,17	0,04
'Pink Lady' x 'Imperatriz	43	51	1:1	0,04	0,40

^{1/} S = suscetível; R = resistente

* Foram considerados os resultados das inoculações onde não houve necrose decorrente de estresse fisiológico.

DISCUSSÃO

A teoria atual mais aceita é a de que a reação à MFG é controlada por um único gene e que a resistência é conferida pelo alelo recessivo em homozigose (Katsurayama *et al.*, 2001; Katsurayama *et al.*, 2004; Dantas *et al.*, 2003). Estudos visando determinar a herança da resistência foram conduzidos, nos quais várias cultivares foram avaliadas quanto à suscetibilidade à MFG e todas as do Grupo 'Delicious' mostraram-se resistentes. Além destas, a 'Sansa', a 'Megumi', a 'Himekami' e o 'Marunbakaido', dentre outras, também manifestaram ser resistentes (Katsurayama, *et al.*, 2004). Por outro lado, as cultivares descendentes da 'Golden Delicious', incluindo a 'Gala' e seus clones, mostraram ser suscetíveis. Entre as cultivares suscetíveis, não houve diferença no grau de severidade de ataque da MFG nas folhas, o que levou a conclusão de que a reação – resistente:suscetível - é do tipo qualitativo (Katsurayama, *et al.*, 2004). Trabalhos anteriores com inoculação de plântulas de diferentes cruzamentos de 'Fuji' (R), 'Topred Delicious' (R), 'Golden Delicious' (S) e F9P46 (S) também apontaram para a hipótese da resistência monogênica recessiva (Katsurayama *et al.*, 2001). Dantas *et al.* (2003) avaliaram as progênes de 11 cruzamentos, entre cultivares e seleções de macieira, quanto à reação à MFG. Os autores observaram que o padrão de reação nas folhas foi do tipo qualitativo, não havendo diferença quanto à severidade entre as cultivares suscetíveis.

Um estudo no qual foram avaliadas 30 cultivares e 20 populações F₁, inoculadas com o isolado SJ 197 (o mesmo utilizado neste estudo), as

proporções observadas neste trabalho entre plantas resistentes e suscetíveis sugerem que mais de um gene controla a reação ao *Colletotrichum* spp (Dantas *et al.*, 2005). Como uma das principais conclusões do trabalho, os autores apontam a teoria de que a resistência ao *C. gloeosporoides* em macieira, pode funcionar segundo o sistema gene-a-gene, de Flor, controlada por três genes que segregam independentemente, sendo a resistência determinada por um gene dominante (C) e outros dois genes recessivos. Contudo, esta hipótese é baseada apenas nos desvios encontrados nas segregações da resistência ao *C. gloeosporoides* esperadas (considerando-se a hipótese de um único gene) em algumas destas populações. Neste sentido tal hipótese necessita se validada.

Os resultados obtidos com as populações M-13/91 x M-46/94 e 'Pink Lady' x 'Imperatriz' apontam para um controle monogênico recessivo, concordando, portanto, com a maioria dos resultados encontrados na literatura (Katsurayama *et al.*, 2001; Katsurayama *et al.*, 2004; Dantas *et al.*, 2003). Contudo, os valores encontrados na população 'Pink Lady' x 'Imperatriz' também não permitem rejeitar a hipótese de segregação de 9:7. Assim, não é possível descartar a hipótese de que outro gene nuclear esteja interferindo nas respostas das plantas ao *Colletotricum* spp. Além disso, a falta de ajuste das segregações de diferentes cruzamentos em nossos ensaios não permitem eliminar a hipótese um terceiro alelo esteja envolvido na resistência à MFG, no gênero *Malus*, assim como, não permite descartar a hipótese da ocorrência de efeito materno ou ainda outros efeitos ainda não conhecidos.

As frequências observadas nas classes de reação a MFG na população M-13/91 x 'Gala' apresentaram uma baixa probabilidade de ajuste a hipótese 1:1, sugerindo que podem existir outros fatores que estão afetando a variação genética encontrada nesta população. Uma hipótese alternativa para explicar a relação 69 S: 47 R, encontrada nesta população pode ser a de ocorrência de epistasia complementar dominante, 2 S: 1 R. Neste caso o qui-quadrado ficaria em 2,7 com probabilidade de 0,1.

Outro fator importante, que deve ser observado, é o fato de que os parentais utilizados neste cruzamento são semi-compatíveis, M-13/91 possui genótipo S5S10 e 'Gala' S2S5 para o gene S (Albuquerque Jr., 2005) responsável pelo controle da característica de auto-incompatibilidade em

macieira. Neste caso, uma certa combinação de gametas dos parentais não resulta na formação de embriões o que conseqüentemente reduz não só tamanho da população gerada em aproximadamente 50%, mas também altera a proporção de tipos esperados, o que pode provocar desvios de segregação.

Desvios da proporção esperada para segregação monogênica da MFG não são raros na literatura, Dantas (2002) analisou um cruzamento entre ‘Fuji’ (R) e ‘Gala’ (S), que resultou em 963 plantas. O autor observou um excesso de plantas suscetíveis resultando em um valor de qui-quadrado de 5,5 correspondente a uma probabilidade de 0,02 quanto do ajuste à hipótese 1:1. Posteriormente, Dantas *et al.* (2005) avaliaram outro cruzamento envolvendo estes mesmos parentais com uma progênie de 891 plantas das quais 494 foram resistentes e 397 foram suscetíveis à MFG. Este excesso de resistentes resultou novamente em um elevado valor de qui-quadrado (10,56) e um baixo valor de probabilidade (0,01) para aceitar a hipótese 1:1. Nestes dois casos, cruzamentos envolvendo os mesmos parentais, ‘Fuji’ como doadora de gametas femininos e ‘Gala’ de gametas masculinos levam a conclusões completamente contraditórias, no primeiro houve excesso de suscetíveis e o contrário ocorreu no segundo cruzamento.

A realização de cruzamentos dialélicos poderia contribuir decisivamente na elucidação do controle genético da MFG. Comparações adicionais da resposta ao *Colletotrichum* spp em populações que envolvam parentais suscetíveis não descendentes do grupo ‘Golden Delicious’ permitirão melhor elucidar o controle genético da resistência à MFG, comparando-se o comportamento dos genes de resistência em diferentes “backgrounds” genéticos. Aparentemente, no caso da MFG, o controle genético da resistência é, aparentemente, bem mais complexo do que os primeiros estudos nesta área sugeriram. A confirmação da hipótese de existir apenas a segregação monogênica recessiva de reação de resistência a esta doença em macieira, certamente, limitaria a nível comercial o uso deste mecanismo de controle da MFG, devido ao iminente risco de quebra da resistência por formas mutantes desta doença – novas raças. Cita-se como exemplo, outras doenças como a sarna e o oídio da macieira.

No patossistema do oídio em macieira, a resistência conferida pelo gene *PI-2*, proveniente de *Malus zumi*, foi superada por isolados virulentos de

Podosphaera leucotricha. Este fato foi recentemente demonstrado em um pomar experimental na França, em genótipos de macieira da quarta geração após a introgressão (Caffier e Laurens 2005). A resistência proveniente de *M. zumi* foi inicialmente atribuída à um único gene dominante (Knight e Alston 1968). Contudo, estudos mais recentes demonstraram que a causa genética desta resistência é muito mais complexa. Ela depende de pelo menos 2 genes, um gene maior, *PI-2*, auxiliado por outro gene de grande efeito, ou alternativamente, por alguns de menor efeito (Alston 1976, citado por Caffier e Parisi, 2007). Outros tipos de resistência oligogênicas e monogênicas têm sido identificados em outras espécies de *Malus* como *M. robusta*. O uso de um único gene em cultivares resistentes a doenças freqüentemente resulta na seleção de patógenos virulentos, capazes de superar esta resistência. Depois que isto acontece, é importante determinar se ainda é possível utilizar este gene de resistência no melhoramento, sozinho ou em combinação com outros genes de resistência. A combinação de genes conferindo resistência quantitativa com genes maiores mostrou-se eficiente para diminuir os efeitos da quebra de resistência (Caffier e Parisi, 2007).

No caso da sarna, as pesquisas em melhoramento genético em nível mundial nas últimas décadas ficaram restritas a transferência de um único gene de resistência de efeito maior, o *Vf*, para as cultivares comerciais (King *et al.*, 1999). A rápida disseminação desta estratégia pelas regiões produtoras mundiais gerou forte pressão de seleção sobre as populações do patógeno. Isto levou a seleção natural de duas raças de *V. inaequalis*, que superaram a resistência conferida pelo gene *Vf* (Parisi *et al.*, 1993).

A existência generalizada de fontes de inóculo de *Colletotrichum* e o freqüente desenvolvimento de epidemias sob condições favoráveis, tornam menos eficazes muitas das práticas fitossanitárias, tais como a remoção e queima de folhas infectadas. A tentativa de implantação de sistemas de previsão epidemiológica para Mancha Foliar de *Glomerella* esbarra nas deficiências que ainda são encontradas nos modelos de previsão de tempo atualmente disponíveis (Katsurayama & Boneti, 2006).

O uso intensivo de fungicidas no controle da antracnose em várias culturas tem favorecido o surgimento de resistência fúngica. Aplicações não programadas podem ainda interferir na microflora natural das culturas, afetando

os mecanismos de biocontrole e favorecendo de alguma forma o aumento na severidade das doenças (Waller, 1992) Além disso, há também limitações impostas pela legislação de proteção ao consumidor quanto ao uso de fungicidas.

É inegável que o uso de variedades altamente resistentes auxilia na redução ou eliminação de pulverizações e na redução das concentrações de fungicidas. Há vários exemplos do uso da resistência genética em culturas anuais e perenes com sucesso, ainda que nestas últimas e contra espécies de *Colletotrichum*, essa resistência tenha sido alcançada apenas parcialmente sendo grandemente influenciada por outros hospedeiros e fatores ambientais (Lopes, 2001). Uma alternativa indicada para reduzir o risco de quebra de resistência e alcançar uma “resistência durável”, seria a combinação de diferentes genes, de maior e menor efeito, em uma única cultivar, ou seja o piramidamento. Segundo alguns autores, isto dificulta o aparecimento de raças capazes de quebrar a resistência conferida por esta combinação (Stankiewicz *et al.*, 2002).

No caso da macieira ainda não são conhecidas raças do patógeno causador da MFG e tampouco têm sido identificados diferentes fontes de resistência entre as cultivares estudadas. Ainda que, desvios das proporções esperadas para segregação monogênica tenham sido observados em alguns cruzamentos sugerindo que outros fatores estejam influenciando na resposta da macieira ao *Colletotrichum* pouco se sabe a esse respeito.

Conhecer isto é relevante, pois o melhoramento genético e o manejo de variedades são muito mais facilitados nas espécies onde a reação hospedeiro-patógeno é conhecida com profundidade, como no caso do feijoeiro e a antracnose. A antracnose do feijoeiro é um bom exemplo de como as relações patógeno–hospedeiro, envolvendo plantas e espécies de *Colletotrichum*, podem ser bastante complexas. Esta doença é causada por *C. lindemuthianum* sendo amplamente distribuída pelas regiões produtoras de feijão no Brasil e no mundo. Mais de 25 raças do patógeno já foram identificadas (Thomazella *et al.*, 2002) e são conhecidos atualmente 10 genes de resistência à antracnose no feijoeiro: *Co-1*, *Co-2*, *Co-3*, *Co-4*, *Co-5*, *Co-6*, *Co-7*, *Co-9*, *Co-10* e *Co-11* (Gonçalvez-Vidigal *et al.*, 2007). Alguns destes locos possuem mais de 1 alelo conferindo resistência, como o loco *Co-1* para o qual já foram identificados 5

alelos os quais exibem diferentes graus de dominância entre si (Gonçalves-Vidigal e Kelly, 2006).

Vinte quatro anos depois da sua primeira constatação, algumas perguntas a respeito da MFG continuam sem resposta. Uma delas diz respeito se esta doença é causada ou não pelo mesmo patógeno que causa a podridão amarga (lesões nos frutos de macieira causadas por *Glomerella cingulata*), se cultivares suscetíveis à podridão amarga como 'Fuji' são resistentes a MFG. A resistência apresentada por cultivares do grupo 'Delicious' como 'Fuji', uma das cultivares mais plantadas no sul do Brasil, tem sido eficiente mesmo sobre grande pressão de inóculo desde que a doença foi constada pela primeira vez em 1983 (Leite Jr. *et al.*, 1988). A quebra de resistência não foi observada na cultivar 'Fuji', mesmo quando inoculada com 39 isolados de *Colletotrichum* diferentes, coletados nos três estados do sul do Brasil, comprovando que ocorre uma relação de incompatibilidade entre patógeno e hospedeiro (Hamada, 2005).

A MFG continua sendo uma doença importante tanto nos Estados Unidos como no Brasil, entretanto, as relações genéticas entre os isolados que causam podridão amarga nos frutos e os isolados que causam MFG permanecem desconhecidas. Características morfológicas e grupos compatibilidade vegetativa (VCGs) de 486 isolados de *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, e *C. acutatum* coletados de folhas de macieira com sintomas de MFG e frutos com sintomas de podridão amarga provenientes dos Estados Unidos e do Brasil foram estudados por Gonzalez *et al.* (2006). Estes autores constataram que todos os isolados puderam causar lesões nos frutos, mas somente um limitado número de genótipos puderam causar MFG. Então, uma das hipóteses levantadas com base nestes resultados é de que os genótipos que causam a MFG podem ter se originado de populações causadoras de infecções em frutos. Isto parece ser verdadeiro, pelo menos para as amostras coletadas no Estados Unidos. Esta hipótese é suportada pelo fato de que os isolados causadores de infecções nos frutos e nas folhas possuem haplótipos de mtDNA (DNA mitocondrial) similares. Ao que tudo indica, os isolados capazes de causar MFG já existiam em baixa frequência nos Estados Unidos há bastante tempo. Se esta hipótese estiver correta, então a cultivar 'Gala' atuaria como uma forte pressão de seleção em favor destes

isolados, uma vez que o aumento do cultivo desta cultivar nos EUA coincide com a constatação da doença (Gonzalez *et al.*, 2006).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALBUQUERQUE Jr., C.L. **Caracterização molecular e morfo-fisiológica da incompatibilidade alélica entre cultivares de macieira.** 2005. 78f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MAÇÃ – ABPM. Site: <http://www.abpm.org.br/> - acesso em maio de 2004.

BONETI, J. I.; KATSURAYAMA, Y. **Doenças da Macieira.** São Paulo: BASF, 1998. 97p.

CALENGE, F.; DROUET, D.; DENANCÉ, C.; VAN DE WEG, W. E.; BRISSET, M. N.; PAULIN, J. P.; DUREL C. E. Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. **Theoretical and Applied Genetics**, v.111, p128-135, 2005.

CAFFIER, V.; LAURENS, F. Breakdown of *PI2*, a major gene of resistance to apple powdery mildew, in a French experimental orchard. **Plant Pathol**, v. 54, p.116-124, 2005.

CAFFIER, V. ; PARISI, L. Development of apple powdery mildew on sources of resistance to *Podosphaera leucotricha*, exposed to an inoculum virulent against the major resistance gene *PI-2*. **Plant Breeding**, v. 126, p. 319-322, 2007.

CEREZINE, P. C.; LEITE JR., R. P.; TSUNETTA, M. Efeito de tratamentos químicos no controle da Mancha Foliar da *Glomerella* em macieira , no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 258-267, 1992.

DANTAS, A. C. M. **Aplicação de técnicas de cultivo *in vitro*, de marcadores moleculares e bioquímicos no melhoramento genético da macieira (*Malus spp.*).** 2002. 183f. Tese (Doutorado em Fruticultura de clima Temperado), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

DANTAS, A.C.M.; VIEIRA, E.A.; NODARI, R.O.; KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. Classificação e estudo da herança de resistência *Colletotrichum Gloeosporioides*, agente causador da Mancha Foliar em macieira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., Águas de Lindóia, 2005. **Anais...** Águas de Lindóia, 2005.

DANTAS, A.C.M.; BONETI, J. I.; KATSURAYAMA, Y.; NODARI, R.O. Herança da resistência da Mancha Foliar (*Colletotrichum Gloeosporioides* Penz.) em macieira. In: CONGRESSO BRASILEIRO MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., Porto Seguro, BA, 2003. **Anais...** Porto Seguro, BA, 2003.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; KELLY, J. D. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean cultivar Widusa. **Euphytica**, v. 151p.411-419, 2006.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; SILVA, C. R; VIDIGAL FILHO, P. S.; GONELA, A.; KVITSCHAL M. V. Allelic relationships of anthracnose (*Colletotrichum lin demuthianum*) resistance in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Michelite and the proposal of a new anthracnose resistance gene, Co-11. **Genetics and Molecular Biology**, v.30 n. 3,p. 589-593, 2007.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T.B. First Report of Glomerella Leaf Spot (*Glomerella cingulata*) of Apple in the United States. **Plant Disease**, v. 83, p. 1074, 1999.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T. B. Population Diversity within Isolates of *Colletotrichum spp.* Causing Glomerella Leaf Spot and Bitter Rot of Apples in Three Orchards in North Carolina. **Plant Disease** v. 88 p.1335-1340, 2004.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T.B.; CORRELL, J.C. Clarification of the Etiology of Glomerella Leaf Spot and Bitter Rot of Apple Caused by *Colletotrichum spp.* Based on Morphology and Genetic, Molecular, and Pathogenicity Tests. **Phytopathology**, v. 96, p.: 282-992, 2006.

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

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I.S. Aspectos epidemiológicos na Mancha Foliar da Macieira cv. Gala. In.: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 2, Fraiburgo , SC, **Anais...** Epagri, Florianópolis, SC 1999. 157p.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I.S. Previsão da sarna e da mancha da Gala: sistema sempre alerta. In: SEMINÁRIO SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 7., 2006. São Joaquim, SC. **Anais...Epagri**, Florianópolis, SC. 2006,71p.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I.S.; BECHER, W.F. Mancha foliar da Gala: principal doença de verão da cultura da macieira. **Agropecuária Catarinense**, V. 13, n.3, p. 14-19, 2000.

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

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

KING, G. J.; TARTARINI, S.; BROWN. L.; GENNARI, F. Introgression of the Vf source of scab resistance and distribution of linked marked alleles within the *Malus* gene pool. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.1039-1046, 1999.

KNIGHT, R. L.; ALSTON, F. H. Sources of field immunity to mildew (*Podosphaera leucotricha*) in apple. **Can. J. Genet. Cytol**, v. 10, p. 294-298, 1968.

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

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

PARISI, L.; LESPINASSE, Y.; GUILLAUMES, J.; KRUGER, J. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due the Vf gene. **Phytopathology**, v. 83, p 533-537, 1993.

STANKIEWICZ, M.; PIERA, E.; GANRONSKI, S. W. The use of molecular markers in apple breeding for disease resistance. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 7 p. 445-448, 2002.

TAYLOR, J. A. necrotic leaf blotch and fruit rot of apple caused by strain of *Glomerella cingulata*. **Phytopathology** v.61, p. 221-224, 1971.

THOMAZELLA, C.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; VIDIGAL FILHO, P. S.; NUNES, W. M. C.; VIDA, J. B. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* races in Paraná state, Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2 p.55-60, 2002.

WALLER, J. M. *Colletotrichum* diseases of perenial and other cash crops. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (Eds.) **Colletotrichum: biology, pathology and control**. England, CAB International Wallingford, p 167-185, 1992.

CAPITULO 2:

**Seleção de marcadores RAPD, microssatélites e AFLP
visando mapeamento genético de macieira em duas populações
segregantes**

RESUMO

A macieira é um bom exemplo para demonstrar a utilidade dos marcadores moleculares, pois devido ao longo período de cada geração e ao fato de que a análise e manutenção de populações a campo são bastante trabalhosas, os avanços nos estudos de genética e de melhoramento pelas técnicas convencionais têm sido dificultados. Nestas situações, os marcadores moleculares podem ser ferramentas muito úteis para detectar genes responsáveis por características economicamente importantes e para facilitar a seleção dessas características em programas de melhoramento. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi a seleção de marcadores RAPD, microssatélites e AFLP visando mapeamento genético de macieira em duas populações. Para os marcadores RAPD, a estratégia de seleção de marcadores utilizada foi o BSA. Dos 195 iniciadores RAPD testados nenhum apresentou produto de amplificação co-segregando com o gene de resistência a MFG. No caso dos marcadores microssatélites o polimorfismo encontrado foi abundante e dos 93 iniciadores testados, 63 foram utilizados no mapeamento genético da população M-13/91 x 'Gala'. Os marcadores AFLP apresentaram em média de 13,1 e 10,5 fragmentos polimórficos entre os parentais das duas populações em estudo, respectivamente.

INTRODUÇÃO

A análise das variações das seqüências de DNA tem grande importância nos estudos de genética. Neste contexto, os marcadores moleculares são ferramentas úteis na análise da variabilidade genética e têm sido, sobretudo, de grande valia no estudo da genética e melhoramento das plantas cultivadas. Uma grande quantidade de mapas genéticos se tornou disponível, tanto para espécies animais como vegetais, e um número crescente de genes têm sido detectados com auxílio desses mapas.

Vários tipos de marcadores podem ser utilizados na construção de mapas, apresentando, contudo, diferentes propriedades: número de locos que podem ser detectados, grau de polimorfismo entre e dentro de acessos e capacidade de identificação de heterozigotos (Maliepaard *et al.*, 1998). Coelho (2000) ressaltou a importância de se considerar o conteúdo informativo dos

marcadores de natureza co-dominante (RFLPs e SSRs) em relação aos marcadores dominantes (RAPDs e AFLPs), além de aspectos como custo, tempo necessário para a realização das avaliações e dificuldades práticas inerentes à execução de cada técnica.

Uma variedade de marcadores moleculares, incluindo os de polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e microssatélites ou seqüências únicas repetidas (SSRs), tem sido desenvolvida para diferentes plantas cultivadas (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Dentre os diferentes marcadores moleculares, podemos destacar os microssatélites por sua reprodutibilidade, natureza multialélica, herança co-dominante, abundância relativa e boa cobertura do genoma. Estas características tornam os microssatélites úteis para uma variedade de aplicações na genética e melhoramento (Maliepaard *et al.*, 1998; Gianfranceschi *et al.*, 1998; Goulão *et al.*, 2001; Liebhard *et al.*, 2003b).

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

O desenvolvimento e a aplicação de marcadores altamente informativos, como os microssatélites, para localizar e rastrear genes controlando características agrônômicas importantes é essencial para o melhoramento da macieira. Esses marcadores podem ser também utilizados para identificação de variedades e gerenciamento dos recursos genéticos (Gianfranceschi *et al.*, 1998; Goulão *et al.*, 2001). Desde o final da década de 90, marcadores microssatélites passaram a ser amplamente descritos em macieira (Guilford *et al.*, 1997; Gianfranceschi *et al.*, 1998; Hokanson *et al.*, 1998; Liebhard *et al.*, 2002). Em 1998, Gianfranceschi e colaboradores desenvolveram 16 iniciadores SSR para *Malus X domestica* (Borkh), que foram validados em 19 cultivares

desta espécie. Posteriormente, foram desenvolvidos outros 140 iniciadores microssatélites, dos quais 115 foram posicionados no mapa de ligação do cruzamento 'Fiesta' x 'Discovery' (Liebhard *et al.*, 2002). Outros microssatélites ainda estão em fase de desenvolvimento pelos vários grupos de pesquisa genética desta espécie.

No caso do mapeamento genético, a maior vantagem dos marcadores microssatélites é que eles são facilmente transferíveis de um mapa para outro, sendo muito úteis também no alinhamento de mapas. O uso de marcadores baseados em PCR, como os microssatélites aliados a marcadores RAPDs e AFLPs, requer pouca quantidade de DNA e oferece uma estratégia simples, rápida e reproduzível para construção de mapas transferíveis (Liebhard *et al.*, 2003a).

A técnica chamada AFLP, descrita por Vos *et al.* (1995), surgiu como uma estratégia de "fingerprinting" baseado em DNA, na qual ocorre a amplificação seletiva de fragmentos de restrição provenientes da digestão do DNA genômico total de um indivíduo. Marcadores AFLP também têm sido empregados com sucesso para propósitos de saturação de mapas genéticos de várias espécies, como a macieira, produzindo grande número de marcas polimórficas em poucas reações (Xu *et al.*, 2000). Além disso, podem proporcionar a cobertura de regiões genômicas para as quais ainda não foram desenvolvidos marcadores microssatélites (Kenis *et al.*, 2005).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi a seleção de marcadores RAPD, microssatélites e AFLP visando mapeamento genético de macieira em duas populações segregantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Populações de mapeamento

Neste estudo foram utilizadas duas populações segregantes. A população 1 possui 180 plantas e é oriunda do cruzamento entre duas seleções de macieira: M-13/91 x M-46/94 e não segrega para MFG. A segunda população utilizada neste estudo é proveniente do M-13/91 x 'Gala', possui 116

plantas e segrega para Mancha Foliar de *Glomerella*. Os cruzamentos foram realizados na Estação Experimental de Caçador (EECd) – SC, EPAGRI.

Extração e quantificação de DNA

O DNA dos genitores e das duas populações segregantes foi extraído de folhas jovens coletadas no início do ciclo vegetativo, utilizando-se do método CTAB-2 % (Doyle e Doyle, 1987). Em cadinhos de porcelana adiciona-se aproximadamente 1 g de tecido, que é moído em nitrogênio líquido o suficiente para virar pó bem fino. Após este procedimento, acrescenta-se 3 mL tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA pH 8,0; 100 mM Tris-HCl pH 8,0 , 2% de PVP e 2% β-mercaptoetanol). A emulsão foi dividida em 3 alíquotas iguais. A estimativa da concentração de DNA extraído foi feita em gel de agarose 0,8% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, tendo como padrão DNA Fago Lambda, nas concentrações de 50, 100 e 200 ng/µl (Sambrook *et al.*, 1989). As amostras foram mantidas a -20°C até o seu uso.

Marcadores RAPD

A estratégia utilizada para selecionar os marcadores RAPD a serem utilizados no mapeamento foi a técnica de análise de “bulks” segregantes –BSA (Michelmore *et al.*, 1991). O DNA de 10 plantas resistentes a Mancha Foliar de *Glomerella* e de 10 plantas suscetíveis provenientes do cruzamento M-13/91 x ‘Gala’ foi extraído individualmente e misturado em quantidades equimolares. Uma vez obtidos os “bulks” - um para plantas resistentes e outro para suscetíveis - os mesmos foram testados, juntamente com o DNA dos parentais, com 195 iniciadores RAPD. Os iniciadores RAPD não foram testados na população proveniente do cruzamento M-13/91 x M-46/94 pois a mesma não segrega para reação à MFG.

As amplificações de RAPD foram realizadas em um volume de 13 µl contendo: 1,3 µl tampão 10X (100 mM Tris; 500 mM KCl, pH 8,3), 0,78 µl de MgCl₂ (50 mM); 4 µl de DNA (3 ng/l); 4 µl de iniciador (2,5 ng/µl); 1,04 µl BSA (10 mg/ml); 1,04 µl dNTPs (2,5 mM de cada nucleotídeo); 0,2 µl *Taq* polimerase (5 U/µl); 0,64 µl água mili-Q. Foram amplificados 195 diferentes

iniciadores decâmeros de seqüência arbitrária provenientes dos Kits A, B, C, D, E, F, G, H, I, e AN da OPERON Technologies Inc. A visualização e separação dos fragmentos amplificados foi feita em gel de agarose 1,5%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo imerso no tampão TBE 1X (100 mM Tris/100 mM ácido bórico/2 mM de EDTA pH 8,0. A corrida de eletroforese foi conduzida sob voltagem constante de 110 volts por 3 h. Os géis foram visualizados em transluminador de luz U.V.

Marcadores microssatélites

Os iniciadores de microssatélites foram selecionados das bibliotecas genômicas de macieira (cv. Royal Gala) desenvolvidas por Gianfranceschi *et al.* (1998) e por Liebhard *et al.* (2002) e da cv. 'Granny Smith' por Guilford *et al.* (1997), além das recentemente desenvolvidas Naik *et al.* (2006) e Silfverberg-Dilworth *et al.* (2006). As amplificações via PCR (reação de polimerização em cadeia) foram ajustadas para um volume final de 15 µl contendo: 3 µl de DNA (10 ng/µl), 1,75 µl de cada iniciador (2 uM) "forward" e "reverse", 1,5 µl de tampão 10 X (100 mM Tris; 500 mM KCl, pH 8,3), 1,5 µl de dNTPs (2,5 mM de cada nucleotídeo), 0,2 µl *Taq* polimerase (5 U/µl), 1,3 µl de DMSO (50%), uma concentração de MgCl₂ (entre 1,5 e 2,66 mM) otimizada para cada microssatélite e água mili-Q para completar o volume total de 15ul. Foram testadas diferentes temperaturas de anelamento (45 a 60°C). Os termocicladores foram programados para reações de PCR, com um período de desnaturação a 95°C por 5 min seguido por 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a temperatura de anelamento adequada para cada marcador (45 a 60°C) e 1 min a 72°C; seguidos de 7 min finais a 72°C e, finalmente, resfriadas a 4°C. Os padrões eletroforéticos foram avaliados quanto à presença de bandas polimórficas entre os genitores de cada cruzamento, bem como quanto à nitidez para interpretação destes padrões.

Trasferibilidade de marcadores microssatélites de espécies do gênero *Prunus* para *Malus x domestica*

Iniciadores microssatélites de damasqueiro (*Prunus armeniaca* L.), ameixeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl.), amendoeira (*Prunus dulcis*) e pessegueiro [*Prunus persica*(L.) Batsch] (Mnejja *et al.*, 2004; Hagen *et al.*, 2004; Mnejja *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2002) foram tomados ao acaso para um ensaio de transferibilidade para *Malus x domestica*, numa tentativa de serem utilizados para saturar os mapas desenvolvidos nas populações segregantes para MFG. Trinta e sete iniciadores foram testados sob temperaturas de anelamento de 50, 51 e 52⁰C. A origem e a seqüência dos iniciadores utilizados podem ser visualizados na Tabela 1. As amplificações via PCR foram feitas segundo protocolo desenvolvido por Moraes, (2005) para ameixeira, sendo ajustadas para um volume final de 13 µl contendo: 3 µl de DNA (10 ng/µl), 2 µl de cada iniciador (2 uM) “forward” e “reverse”, 1,5 µl de tampão 10 X (100 mM Tris; 500 mM KCl, pH 8,3), 0,85 µl de MgCl₂ (50 mM), 1,3 µl de dNTPs (2,5 mM de cada nucleotídeo), 0,2 µl *Taq* polimerase (5 U/µl), 1,3 µl de DMSO (50%) e 0,85 µl de água mili-Q. Os programas dos termocicladores foram os mesmos utilizados para os microssatélites de macieira.

Tabela 1: A origem, a seqüência dos iniciadores, temperatura de anelamento na espécie original, motivo repetido e autores dos iniciadores microssatélites utilizados no teste de transferibilidade.

Loco	Seqüências dos iniciadores	Ta (°C) original	Motivo repetido	Autor
Damasqueiro				
AMPA 93	F :GGAGCAGGTTTTCAAATACGAC R :GTCGGACCGGTGTACATAAACT	55	(TC) ₁₄	Hagen <i>et al.</i> , 2004
AMPA 103	F :GAAGGAGACGAAGCTGTGAAAG R :CAACACCATCCAATAACAAGC	55	(AG) ₁₀	
AMPA 105	F : CTGCTCTCACTCAACTCAATGC R : CTCCCCTACCCCTCTGTATCTC	55	(AG) ₁₁	

AMPA 107	F : TTACATTGCTGGTTTCCTTTCC R : GTGGTGTCTTGAGGCAGGTAG	51	(AC) ₁₈	
AMPA 115	F : AATTGACTTGGTCGTTGGGTAG R : AGCCTAGTTACCTTGCTTGCTC	55	(GA) ₁₁	
AMPA 121	F : TGGTGTGGTGTGTTTGAAG R : ACCAACTCCATCCACATTTCTC	55	(GA) ₉	
Ameixeira Japonesa				
CPSCT 4	F: GCTCTGAAGCTCTGCATTGA R: TTTGAAATGGCTATGGAGTACG	62	(GA) ₈	Mnejja <i>et al.</i> ,2004
CPSCT 5	F: CTGCAAGCACTGCGGATCTC R: CCCATATTCCCAACCCATTA	62	(CT) ₁₆	
CPSCT 6	F: ACAAACCAAGCACCGTCTC R: GGGCAAATGCTTACCTGTTC	62	(CT) ₁₅	
CPSCT 7	F: GTGGCCGGACGAGAGAAC R: CGATCGAATGAAGCTCAGTG	62	(GA) ₃ GC(GA) ₃ ... (GA) ₇	
CPSCT 8	F: TGGATCCAATCCAAGAGTCTG R: GCAGCAAGTTGTTCTTGGTTC	62	(GA) ₁₇	
CPSCT 10	F: TTGGGTAAATACTTTATCATTTC R: TCCCTGAATAAGGGTTGTGC	62	(TA) ₅ (CT) ₁₄	
CPSCT 11	F: ATTTGGGTTTGC GACTCAAG R: ACTCATCCCTTGCCCTTTCT	62	(CT) ₂₁	
CPSCT 12	F: ACGGGAGACTTTCCAGAAG R: CTCTCGTTTCCCTCCT	62	(GA) ₁₆	
CPSCT 16	F: CAACTCCAAGCTCTGCTCCT R: AGAGCTACACCAGCCAAAGG	62	(CT) ₁₆	
CPSCT 18	F: AGGACATGTGGTCCAACCTC R: GGGTTCCCCGTTACTTTCAT	52	(CA) ₅ (CT) ₂₀	
CPSCT 21	F: GCCACTTCGGCTAAAAGAGA R: TCCATATCTCCTCCTGTTGA	46	(GA) ₁₅	
CPSCT 22	F: TGTCTGCCTCTCATCTTAACCA R: TTCTTGAGCAGCCATCTTCT	62	(GA) ₁₃	
CPSCT 23	F: CGGGTTGACTCAGTTCCTTC R: ATTTGAGCAGAAGCCAGAA	46	(CT) ₈	
CPSCT 24	F: TGGGTCGTCTTCTTTATCGTG R: CCTCACAAAACGGTAGTCAG	46	(GA) ₂₀	
CPSCT 25	F: GCATTGCAAGCATTGAAGA R: GATGCTATCCTTCCGCATC	46	(CCT) ₃ (CT) ₁₃	
CPSCT 27	F: CCCATGCTCCTGTGGTAAGT R: TTTAGAATCCCAACCCACA	62	(GA) ₂₃	
CPSCT 30	F: CAACAGCGAGTGTACGTTT R: AGGCAACGGACAAAATCTG	46	(CT) ₁₂	
CPSCT 33	F: TCCTATTTGAGTGTGTGGA R: TGCCCAATTTGAAAATTTGT	62	(GT) ₁₁ (GA) ₁₃	

CPSCT 34	F: AGGTGGACAATAGCCGTGAT R: TTTCCAGACCCTGAGAAAGC	62	(CT) ₅ GT(CT) ₆ ... (CA) ₅	
CPSCT 35	F: TCTTTGATTACACCATGAGCAA R: TGGGGAACACATTGGATCTT F: GCCGCAACTCGTAAGGAATA	62	(GA) ₂₃	
CPSCT 39	R: TCCACCGTTGATTACCCTTC	62	(GA) ₁₈	
CPSCT 42	F: TGGCTCAAAGCTCGTAGTG R: CCAACCTTTCGTTTCGTCTC	62	(GA) ₁₀	
CPSCT 44	F: CCAGCACAGAGAAAACGATG R: GAGCTCCTACTCTGAGTCTGTAATA	62	(GT) ₈ (AT) ₄ ... (GA) ₇ CA(GA) ₄	
Amendoeira				
CPDCT 45	F: TGTGGATCAAGAAAGAGAACCA R: AGGTGTGCTTGACATGTTT	62	(GA) ₁₆	Mnejja <i>et al.</i> , 2005
Pessegueiro				
MA 7	F: GTGCATCGTTAGGAAGTCC R: GCCCCTGAGATACAACTGCA	55	(TC) ₄ C(CT) ₂₇	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002
MA 12	F: ACCTGTTTCCTACACTCACA R: CCCACACCACTACTCTACAC	55	(GA) ₂₀	
MA 13	F: CACTCCAAAACTCCTAT R: CACAAAGAGAGGTGAAC	55	(AG) ₂₅	
MA 15	F: TGAGTTCGATGGAGCCTCCT R: GGTTACTCCCCCATTGTCA	52	(AG) ₂₁	
MA 20	F: CTTGCCCATTTATGTAAGTGA R: TATATCGCATAATCACGGTC	55	(AG) ₂₃	
MA 27	F: GGGCAGTGAAGAATCTATGA R: GATAGCATAAACCCCGTGAA	55	(GA) ₂₈	

Marcadores AFLP

Foi realizado um *screening* com 64 combinações de iniciadores de AFLP a fim de ajustar protocolos para as etapas da reação e escolher as combinações mais polimórficas entre os parentais das populações de mapeamento. As reações com AFLP foram realizadas em quatro etapas, conforme recomendações feitas tanto pelos autores (Vos *et al.*, 1995) e o protocolo de Hazen *et al.* (2004) - www.Msu.edu/user/hazenam/aflp/AFLPprotocolMSU.html - com modificações.

As reações de digestão com enzimas de restrição foram ajustadas para um volume final de 25 µl contendo: 2,5 µl de tampão OnePhorAll (OPA), 0,25

µl de Mse I (10 U/µl), 0,21 µl de Eco RI (12U/µl), 0,25 µl de BSA (10 µg/µl), 5,0 µl de DNA genômico (50- 200 ng/µl), 16,79 µl de água mili-Q. Após passarem por vortex e breve centrifugação, as amostras foram incubadas a 37⁰C, por 12 horas em estufa. Em seguida as amostras foram levadas ao termociclador onde permanecem por 15 minutos a 70⁰C para realizar a desnaturação das enzimas de restrição.

Na reação de ligação, a cada amostra digerida foi adicionado um volume de 5 µl de reação contendo: 0,5 µl de adaptador Eco RI, 0,5 µl de adaptador Mse I, 0,5 µl de tampão 10 X específico para a enzima T4 DNA ligase, 0,15 µl de T4 DNA ligase (400U/µl), 3,35 µl de água mili-Q. Após passarem por vortex e breve centrifugação, as amostras foram incubadas a 20⁰C por 3 horas no termociclador.

Nas reações de pré amplificação foram utilizados iniciadores com uma base seletiva, e foram ajustadas para um volume final da 10µl contendo: 0,25 µl do iniciador Eco RI +A (50 ng/µl), 0,25 µl do iniciador Mse I + C (50 ng/µl), 2 µl de dNTPs (2,5 mM), 1 µl de Tampão 10 X (100 mM Tris; 500 mM KCl, pH 8,3), 0,3 µl *Taq* polimerase (5 U/µl) , 0,6 µl de MgCl₂ (50 mM), 2 µl de DNA digerido/ligado e 3,6 µl de água mili-Q. Os termocicladores foram programados para reações de PCR, com um período de desnaturação a 94⁰C por 2 min, seguido por 26 ciclos de 1 min a 94⁰C, 1 min 56⁰C, 1 min a 72⁰C, seguidos de 5 min finais a 72⁰C. Os produtos das reações foram então diluídos com 50 µl de água mili-Q.

Nas reações de amplificação foram utilizadas 3 bases seletivas em cada iniciador; as reações foram feitas com iniciadores do Kit AFLPTM I (Invitrogen) ajustadas para um volume final de 10 µl contendo: 1µl de tampão PCR 10X com MgCl₂ (200mM Tris- HCl pH 8,4; 15 mM de MgCl e 500 mM de KCl), 3 µl de iniciador MseI + CNN (6,7 ng/µl), 0,6 µl de iniciador Eco RI + ANN (27,8 ng/µl), 5 µl do produto da pré amplificação, 0,2 µl de *Taq* polimerase (5 U/µl) e 0,2 µl de água mili-Q. Os termocicladores foram programados para reações de PCR, com um período de desnaturação a 94⁰C por 2 min, seguido por 12 ciclos de 30 s a 94⁰C, 30 s a 65⁰C, 1 min a 72⁰C (decrecendo a temperatura de anelamento em 0,7⁰C em cada ciclo), seguidos por 23 ciclos de 30 s a 94⁰C, 30 s a 56⁰C, 1 min a 72⁰C seguidos de 2 min finais a 72⁰C.

Eletroforese e análise dos marcadores

Os produtos amplificados de microssatélites e AFLP foram avaliados em gel desnaturante de poliacrilamida a 4% (6 ml de bis-acrilamida 40%, 25 g de uréia em 3 ml de TBE 10X). Para a polimerização do gel, foi acrescentado 400 ul de APS 10% e 40 ul de TEMED/50 mL de solução de gel. Nas linhas da extremidade de cada gel foi utilizado como marcador uma solução de fragmentos de tamanho conhecido, de múltiplos de 10 pb para microssatélites e de 30 a 330 pb para AFLP. Para microssatélites e AFLP a voltagem utilizada para corrida foi de 1800 V e potência constante de 60 W, sendo 1 h o tempo de corrida. Após a corrida, os géis foram fixados em álcool etílico 10% e ácido acético 1%, corados com nitrato de prata 0,2% para os microssatélites e 0,3% para os AFLP, de acordo com metodologia empregada por Creste *et al.* (2001) e deixados secar a temperatura ambiente por 24 h. A leitura dos géis foi realizada em transluminador de luz branca fria e registrada por um fotodocumentador para registro e análise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Marcadores RAPD

Na figura 1 é mostrado um gel de agarose no qual 7 iniciadores RAPD são testados nos parentais e nos “bulks” resistente e suscetível. Utilizando a estratégia de “bulk” não foi encontrada nenhuma marca RAPD co-segregando com o gene de resistência ou suscetibilidade à Mancha Foliar da *Glomerella*. Dessa forma, nenhum dos 195 iniciadores decâmeros de seqüência arbitrária testados foi utilizado para genotipagem da população de mapeamento M-13/91 x ‘Gala’.

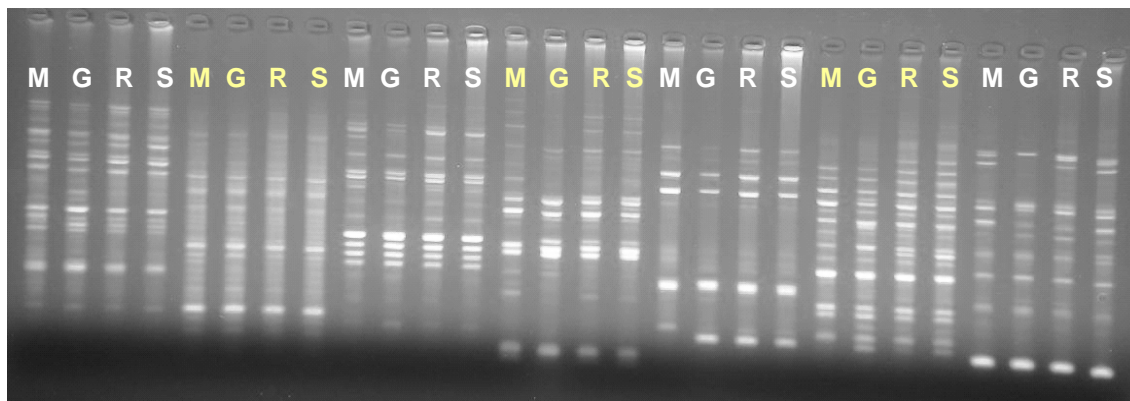


Figura 1: Análise eletroforética dos produtos de amplificação de RAPD de amostras de DNA dos genitores M-13/91(M), 'Gala' (G) e dos "bulks" resistente (R) e suscetível (S), respectivamente com os iniciadores OPE05, OPE07, OPE08, OPE09, OPE10, OPE11 e OPE12. em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

Marcadores microssatélites

Dentre os 93 iniciadores testados, 42 foram polimórficos entre os parentais M-13/91 e M-46/94 (Figura 2) e 63 entre M-13/91 e 'Gala' (Tabela 2). A maioria dos iniciadores amplificou satisfatoriamente nas concentrações 1,5 e 2,66 mM de cloreto de magnésio, sendo a concentração mais alta a que possibilitou o maior número de amplificações e a mais baixa, o menor número de bandas fantasmas. A diminuição das condições de estringência da reação, como o aumento da concentração de magnésio e a diminuição da temperatura de anelamento em relação aos trabalhos de onde as seqüências foram extraídas, levaram a uma maior eficiência de amplificação.

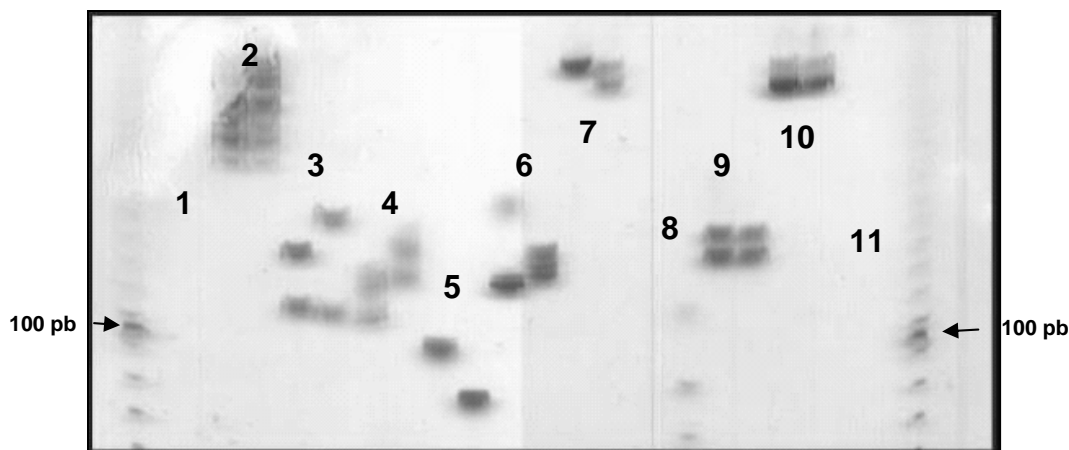


Figura 2: Produtos da amplificação de microssatélites, a 55^oC de temperatura de anelamento, com concentração de magnésio de 2,66 mM, corados com nitrato de prata. As canaletas das laterais correspondem ao marcador de peso molecular, as demais correspondem aos iniciadores 1 a 11 da Tabela 2, nos parentais M-13/91 e M-46/94.

Tabela 2: Temperatura de anelamento, concentração ótima de Cloreto de Magnésio e tamanho de alelos detectados em três parentais das populações segregantes para cada iniciador.

N	INICIADOR	TA	[Mg]	ALELOS (peso molecular)		
				M-13/91	M-46/94	'GALA'
1	CH01f02	58	2,0	210/200	200/200	240/200
2	CH02d12	58	1.5	200/185	200/185	200/200
3	CH01g12	55	2.66	130/110	150/110	160/150
4	CH01h01	55	2.66	120/110	135/122	135/125
5	CH02b03	55	2,0	100/98	80/80	85/80
6	CH02b10	55	2.66	160/120	135/125	130/125
7	CH02c06	55	2.66	250/250	250/235	250/250
8	NZ23g4	NA				
9	CH01f09	55	2.66	130/140	130/140	...
10	CH01e12	55	2.66	240/240	240/240	240/240
11	CH02d11	NA				
12	NZ01a6	NA				
13	NZ02b1	55	1.5	220/220	260/240	240/230
14	NZ04h11	51	2.66	250/250	...	250/220
15	NZ05g8	54	2.66	125/120	120/120	120/120
16	CH01h02	60	1.5	255/235	255/245	250/245
17	CH02b12	55	1.5	140/145	140/125	140/135
18A	NZ04f3	57	1.5	120/120	...	120/125
18B	NZ04f3	57	1.5	115/110	...	110/105
19	NZ03c1	45	*	128/128	128/128	130/128
20	NZ26c6	NA				
21	CH01c06	60	1.5	160/170	160/170	160/170

22	CH01d08	54	2.66	260/260	260/245	270/245
23	CH01f091	NA				
24	CH01h02	IDEM 16				
25	CH02b07	60	1.5	130/110	108/108	120/108
26	CH02c 06	IDEM 7				
27	CH02c11	54	2.66	250/250	250/190	250/230
28	CH02d10a	55	2.66	240/210	220/220	220/220
29	CH02f061	54	2.66	170/160	170/160	170/150
30	CH02h11a	54	2.66	135/130	135/130	135/133
31	CH03a09	55	2.66	145/145	145/145	145/140
32	CH03d01	NÃO ENCONTRADA				
33	CH03d07	55	2.66	220/200	220/205	230/220
34	CH03e03	55	2.66	210/200	...	210/205
35a	CH03g12a	50	*	200/180	200/182	200/182
35b	CH03g12b	50	*	160/160	160/158	160/160
36	CH03h03	54	2.66	120/120	...	120/115
37a	CH04c06a	55	*	190/190	190/180	190/180
37b	CH04c06b	55	*	170/160	170/170	170/170
38	CH04d02	55	2.66	120/120	120/120	135/120
39	CH04d02	55	2.66	200/170	170/170	200/200
40	CH04g04	55	2.66	185/170	172/185	172/172
41a	CH02a04a	55	2.66	140/108	...	120/112
41b	CH02a04b	55	2.66	100/80	...	100/100
42	CH02a08	55	2.66	150/150	150/150	150/140
43	CH02g09	55	2.66	120/130	120/130	120/130
44	CH03c02	55	2.66	130/110	130/130	130/132
45	CH03d08	55	2.66	160/150	145/140	150/140
46	CH03d12	55	2.66	130/130	130/120	130/120
47	CH03g04	55	2.66	145/135	150/150	150/135
48	CH03g07	55	2.66	180/140	140/130	140/130
49	CH04e03	55	2.66	215/210	210/210	210/210
50	CH04e05	55	2.66	210/190	190/190	190/190
51	CH04h02	55	2.66	210/190	250/190	250/190
52	CH05a02	60	2.66	125/125	125/120	125/120
53	CH05b06	NÃO ENCONTRADA				
54	CH05c06	55	2.66	125/120	135/125	125/135
55	CH05d08	55	2.66	135/135	135/135	135/135
56	CH05e03	55	2.66	170/170	180/160	170/180
57	CH05f04	55	2.66	160/160	162/158	160/162
58	CH05g08	55	2.66	175/175	175/175	175/175
59	MS06c09	NA				
60	CH01d09	55	2.66	170/155	150/170	150/135
61	CH01e01	55	2.66	120/115	120/120	120/120
62	CH01f03b	55	2.66	170/160	170/170	170/180
63	CH01h10	55	2.66	110/110	100/120	100/120
64	CH02a03	55	2.66	180/180	150/150	150/150
65	CH02a10	55	2.66	150/NULO	...	150/140
66	CH02c02b	55	2.66	120/130	130/125	130/125
67	CH02c09	55	2.66	240/240	240/240	240/230
68	CH02d08	55	2.66	250/250	250/220	250/220
69	CH02g04	55	2.66	190/190	190/190	190/190
70	CH03a08	55	2.66	230/190	220/200	220/190
71	CH03b10	55	2.66	110/100	110/125	110/125
72	CH04c07	55	2.66	140/115	120/105	140/105

73	CH04f10	NÃO ENCONTRADA				
74	CH04g07	55	2.66	190/160	190/160	190/190
75	CH05a04	NÃO ENCONTRADA				
76	CH05a05	55	2.66	218/200	220/198	220/220
77	CH05c07	55	2.66	140/150	135/150	135/110
78	CH05d04	55	2.66	180/190/160	180/190/ 160	180/190/160
79	CH05e06	55	2.66	140/140	140/220	145/220
80	MS01a03	55	2.66	230/240	...	240/240
81	MS14h03	55	2.66	120/120	120/190	120/190
82	CH04d07	55	2.66	135/135	135/135	135/135
83	CH05e06	55	2.66	100/90	...	260/100
84	NZ28f04	55	2.66	105/100	...	112/112
85	Z71981ssr	55	2.66	210/210	...	215/210
86	Hi03g06	60	2.66	195/192	...	200//192
87	Hi06g09	NÃO ENCONTRADA				
88	CH03b06	55	2.66	120/120	...	150/130
89	CH05g05	55	2.66	140/140	...	140/105
90	UIUC-111	NÃO ENCONTRADA				
91	CH04f07	55	2.66	92/92	...	108/92
92	Hi02c07	55	2.66	120/120	...	120/120
93	Hi03d06	55	2.66	180/155	...	130/130

Na = não amplificou; Não encontrada = produtos de amplificação apresentaram difícil interpretação; ...= não genotipado; IDEM = mesmo loco

* reação segundo Moraes (2005).

A combinação de 55°C de temperatura de anelamento e 2,66 mM de Magnésio foi a mais eficiente para a maioria dos iniciadores para os quais o protocolo pode ser ajustado, sendo adotada para 55 iniciadores. Dos iniciadores testados, dois foram descartados por serem idênticos a outros iniciadores, o iniciador 24 (CH01h02) possui a mesma seqüência do iniciador 16 e o iniciador 26 (CH02c06) é idêntico ao 7. Outros seis iniciadores não produziram produtos de amplificação nos parentais em nenhuma combinação de concentração de magnésio e temperatura de anelamento testada. Foram eles: 8 - NZ23g4, 11 - CH02d11, 12 - NZ01a6, 20 - NZ26c6, 23 - CH01f091 e 59- MS06c09.

Além disso, seis microssatélites apresentaram padrões borrados ou de difícil interpretação em todas as temperaturas de anelamento testadas (32- CH03d01, 53- CH05b06, 73- CH04f10, 75- CH05a04, 87- Hi06g09 e 90- UIUC-111) e não puderam ser utilizados para genotipar as populações de mapeamento.

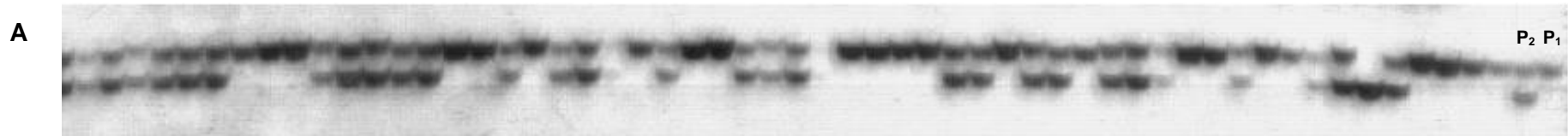
Os microssatélites utilizados foram altamente polimórficos entre os parentais testados, sendo que apenas dez iniciadores dos 79 utilizáveis foram monomórficos para a população M-13/91 x 'Gala', e os demais (87 %) foram

polimórficos. Os iniciadores polimórficos selecionados foram utilizados para desafiar o DNA das duas populações segregantes (Figura 3). Contudo, nem todos os iniciadores microssatélites foram testados na população M-13/91 x M-46/94, pois a mesma não segrega para MFG. Essa população poderá ser utilizada ainda em outros estudos como mapeamento para exigência em frio, por exemplo.

Os dados obtidos foram utilizados na construção do mapa genético visando a identificar regiões cromossômicas de interesse e a auxiliar no desenvolvimento de germoplasma com alelos favoráveis, para a resistência a MFG.

O polimorfismo abundante já era esperado em razão do alto índice de heterozigosidade provocado pelo mecanismo de incompatibilidade existente na espécie. Anteriormente, este tipo de resultado também foi encontrado em outros trabalhos com macieira, tais como Guilford *et al.* (1997), no qual os autores testaram 14 microssatélites em 21 cultivares de macieira e encontraram até nove alelos em um loco; Hokanson *et al.* (1998), no qual um alto nível de variação foi detectado, com média de 12,1 alelos por loco, em 66 acessos de um banco de germoplasma de *Malus x domestica* genotipados com oito microssatélites; Gianfranceschi *et al.* (1998), no qual 16 locos microssatélites apresentaram uma média de 8,2 alelos por loco em 19 cultivares de macieira e; Liebhard *et al.* (2002) que desenvolveram e testaram 140 microssatélites, os quais amplificaram uma média de 6,1 alelos em um conjunto de sete cultivares e uma seleção de macieira.

Progênie do cruzamento M-13/91(P₁) x M- 46/94 (P₂)



Progênie do cruzamento M-13/91(P₁) x Gala (P₂)



Progênie do cruzamento M-13/91(P₁) x Gala (P₂)

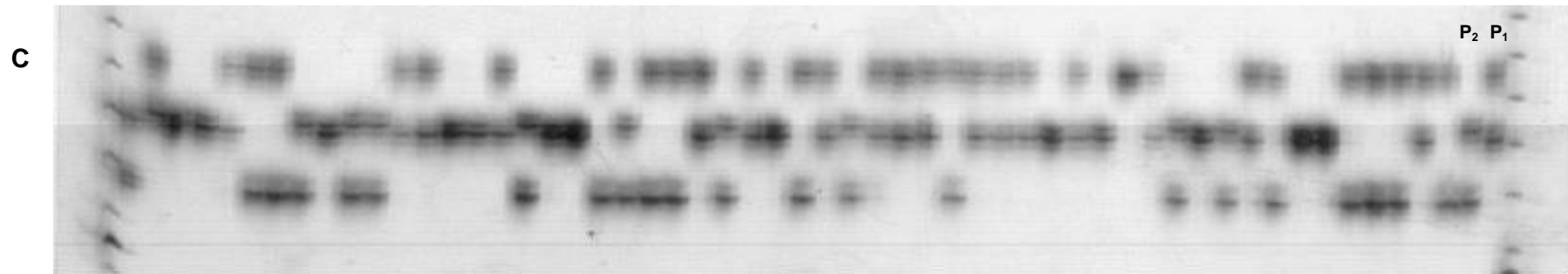


Figura 3: Perfil dos alelos amplificados a partir dos iniciadores de microssatélites **CHO2C06** (A), **NZ02B1** (B) e **CH01h01** (C).

Os microssatélites destacam-se ainda como marcadores adequados para o mapeamento genético pela sua ampla distribuição no genoma de *Malus x domestica*. Hokanson *et al.* (1998) estimaram que repetições (GA)₁₀ ocorrem a cada 87 kb no genoma da macieira, enquanto que Guilford *et al.* (1997) estimaram que a repetição (GA)₁₅ ocorria a cada 120 Kb. Estas diferenças de estimativas podem ser devidas ao fato de que os métodos utilizados pelos dois grupos foram diferentes.

No presente trabalho, cinco microssatélites amplificaram mais do que dois fragmentos por cultivar, sugerindo que, são presumivelmente multi-locos. (18- **NZ04f3**, 35-**CH03g12**, 37- **CH04c06**, 41- **CH02a04** e 78- **CH05d04**). Este fato já tinha sido observado anteriormente (Guilford *et al.*, 1997; Liebhard *et al.*, 2002). Maliepaard *et al.* (1998) observaram fenômeno semelhante analisando marcadores RFLP em macieira, os quais revelaram padrões de duplicação entre alguns grupos de ligação. Este fato se deve, provavelmente, a duplicações cromossômicas ocorridas durante a evolução da espécie.

Trasferibilidade de marcadores microssatélites de espécies do gênero *Prunus* para *Malus x domestica*

Todos os marcadores testados apresentaram produtos de amplificação, mas produtos de PCR não específicos à temperatura de anelamento de 50°C. Quando a temperatura de anelamento foi aumentada para 51°C ou 52°C os produtos de amplificação ficaram mais fracos e o problema das “bandas fantasmas” não diminuiu. Assim, a temperatura de anelamento de 50°C foi considerada a mais adequada para a avaliação. A ocorrência de produtos de PCR não específicos pode ser reflexo de eventos mutacionais ocorridos na região de anelamento do iniciador dentro da família das Rosáceas, como já tem sido observado em estudos de transferibilidade em outras famílias de plantas (Metais *et al.*, 2002; Zucchi *et al.*, 2003). Contudo, entre os gêneros *Malus* e *Pyrus*, as regiões flanqueadoras dos microssatélites aparentemente são altamente conservadas com 81% de sucesso na amplificação de iniciadores de *Malus* em uma população de *Pyrus* (Hemmat *et al.*, 2003).

Os iniciadores da série “MA” de pessegueiro (Yamamoto *et al.*, 2002) foram os que apresentaram os piores resultados, com muitos produtos de PCR

inespecíficos, evidenciando uma grande dificuldade na transferibilidade de microssatélites entre as duas espécies, como já relatado por Cipriani *et al.* (1999), que encontraram somente 18% de amplificação dos microssatélites de pessegueiro testados em macieira.

A totalidade dos iniciadores não apresentou polimorfismo entre os parentais M-13/91, 'Gala' e M-46/94 com exceção do iniciador AMPA 105 de damasqueiro - *Prunus armeniaca* L. (Hagen *et al.*, 2004), que apresentou, além de bandas inespecíficas, polimorfismo nas duas populações e foi selecionado para ser utilizado para fins de mapeamento. Os alelos encontrados na população M-13/91 x 'Gala' foram de 200 e 210 pares de base, sendo ambos os parentais heterozigotos para os mesmos e a população apresentou segregação 1:2:1. Em damasqueiro foram observados 6 alelos para este loco variando de tamanho de 186 a 238 pares de bases. Este mesmo iniciador foi transferido com sucesso para pessegueiro, mas não para ameixeira em um ensaio de transferibilidade entre estas espécies de *Prunus* (Hagen *et al.*, 2004).

A transferibilidade pode ser um fator importante para facilitar o uso de microssatélites, pela redução de custos ou pela dificuldade de isolamento de microssatélites em algumas espécies. Contudo, o sucesso da amplificação diminui à medida que as distâncias genéticas entre as espécies aumentam (revisão de Oliveira *et al.*, 2006). Como em *Malus x domestica*, aparentemente, não são encontradas dificuldades no isolamento de seqüências microssatélites, já que foram reportadas recentemente 140 seqüências por um único grupo de pesquisa (Liebhard *et al.*, 2002). Considerando a distância genética entre esta e as espécies do gênero *Prunus*, a estratégia de transferibilidade com vistas para o mapeamento genético não foi eficiente e deve ser avaliada cuidadosamente por outros interessados.

Marcadores AFLP

Várias combinações de marcadores AFLP foram descartadas por ausência de amplificação ou por apresentarem poucos fragmentos detectáveis. As 33 combinações restantes totalizaram 2069 produtos de amplificação, sendo 431 polimórficos na população derivada do cruzamento M-13/91 x 'Gala' e 294 na população derivada de M-13/91 x M-46/94. Em média puderam ser

visualizados 62,7 fragmentos por combinação. O número de fragmentos que podem ser analisados simultaneamente depende da resolução do sistema de detecção. De maneira geral, 50 a 100 fragmentos de restrição são amplificados e detectados em géis de poliacrilamida desnaturante (Vos *et al.*, 1995).

Apesar de terem sido detectados problemas na reação de amplificação do parental M-46/94 com algumas combinações, pode-se observar que para as combinações em que ambos os parentais de cada população segregante apresentaram produtos de amplificação, o polimorfismo foi maior entre M-13/91 e 'Gala' do que entre M-13/91 e M-46/94, fato que também foi observado com os marcadores microssatélites. A combinação E- AGG/ M-CTA foi a mais polimórfica na população M-13/91 x 'Gala' e a combinação E-AGG/ M-CTC na população M-13/91 x M-46/94. Os resultados das combinações de iniciadores de AFLP mais polimórficas, dentre as 64 testadas, nas duas populações são mostrados na Tabela 3.

As combinações produziram, em média, 13,1 fragmentos polimórficos entre M-13/91 e 'Gala' e 10,5 entre M-13/91 e M-46/94. Valores médios semelhantes foram encontrados por Kenis e Keulemans (2005) a partir de 48 combinações selecionadas que produziram 463 fragmentos polimórficos, média de 9,6 por combinação entre as cultivares de macieira "Telamon" e "Braeburn". Contudo, a quantidade de fragmentos polimórficos obtidos no presente trabalho podem ser considerados baixos quando comparados com outros trabalhos, como o de Xu e Korban (2000), no qual os autores encontraram uma média de 32 fragmentos polimórficos por combinação entre *Malus floribunda* e um "bulk" de plantas de *Malus x domestica* suscetíveis a sarna.

Tabela 3: Número de fragmentos de restrição amplificados e detectados e número de fragmentos polimórficos na população M-13/91 x 'Gala' e M-13/91 x M-46/94 nas 33 combinações mais polimórficas nas duas populações.

N.	Combinação	Número de Fragmentos ¹	Polimórficos M-13/91 x Gala	Polimórficos M-13/91 x M-46/94
1	E-AGG M-CTA	84	25	12
2	E-AAG M-CTC	63	22	17
3	E-ACG M-CAT	55	20	14
4	E-AGC M-CTT	52	19	15
5	E-AGG M-CAC	95	19	...
6	E-AGG M-CTT	74	17	11
7	E-AGC M-CAT	76	16	8
8	E-AGC M-CAG	59	15	11
9	E-AAC M-CAG	62	15	11
10	E-AGG M-CAA	62	15	11
11	E-AAC M-CTA	73	15	12
12	E-ACG M-CAG	83	14	8
13	E-AAC M-CAC	57	14	13
14	E-ACT M-CAA	39	13	6
15	E-AGG M-CTG	57	13	9
16	E-ACC M-CTT	84	12	12
17	E-ACA M-CAA	70	12	...
18	E-ACC M-CTC	58	11	9
19	E-ACA M-CAG	42	11	11
20	E-ACA M-CTA	51	11	11
21	E-ACT M-CAC	51	11	12
22	E-AAG M-CAC	63	11	...
23	E-AGC M-CAC	57	10	7
24	E-AGG M-CAT	79	10	9
25	E-ACT M-CTT	50	10	13
26	E-ACA M-CTT	54	9	7
27	E-ACC M-CAT	73	9	8
28	E-ACG M-CAA	36	9	8
29	E-ACG M-CAC	54	9	10
30	E-AAC M-CAT	82	9	12
31	E-AAG M-CAG	37	9	...
32	E-AGG M-CAG	70	8	7
33	E-AGC M-CTA	67	8	...
Total		2069	431	294
Média		62.7	13.1	10.5

¹ = número total de fragmentos de restrição amplificados e detectados

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDI, P.; PATOCCHI, A.; ZINI, E.; TOLLER, C.; VELASCO, R.; KOMJANC, M. Cloning end linkage mapping of resistance gene homologues in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.231-239, 2004.

CALENGE, F.; VAN DER LINDEN, C.G.; VAN DE WEG, E.; SCHOUTEN, H. J.; VAN ARKERL, G.; DENAMCE, C.; DUREL, C.E. Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.660-668, 2005.

CIPRIANI, G.; LOT, G.; HUANG, W. G.; MATARRAZZO, M. T.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. AC/GT and AG/GT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Bastsch]: isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p. 65-72, 1999.

COELHO, A.S.G. Considerações gerais sobre a análise de QTL's. In: PINHEIRO, J.B.; CARNEIRO, I.F. (Eds.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000. p.1-36.

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

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

GIANFRANCESCHI, L.; SEGLIAS, N.; TARCHINI, R.; KOMJANC, M.; GESSLER, C. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.1069-1076, 1998.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v. 122, p. 81-89, 2001.

GUILFORD, P.; PRAKASSH, S.; ZHU, J. M.; RIKKERINK, E.; GARDINER, S.; BASSETT, H.; FORSTER, R. Microsatellites in *Malus X domestica* (apple):

abundance, polymorphism and cultivar identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.249-254, 1997.

HAGEN, L. S.; CHAIB, J.; FADY B.; DECROOCQ, V. ; BOUCHET, J. P.; LAMBERT P.; AUDERGON, J. M. Genomic and cDNA microsatellites from apricot (*Prunus armeniaca* L.). **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 742–745, 2004.

HEMMAT, M. ; WEEDEN, N. F.; BROWN, S. K. Mapping and evaluation of *Malus x domestica* microsatellites in apple and pear. **Journal American Soc. Hort. Sci**, v. 128, p. 515-520, 2003.

HOKANSON, S. C.; SNEWC-McFADDEN, A. K.; LAMBOY, W.F.; McFERSON, J.R. Microsatellites (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus X domestica* Borkh. core subset collection. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.671-683, 1998.

LIEBHARD, R.; GIANFRANCESCHI, L.; KOLLER, B.; RYDER, C. C.; TARCHINI, R.; VAN DE WEG, E.; GESSLER, C. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Molecular Breeding** , v.10, p.217-241, 2002.

LIEBHARD, R.; KELLERHALS, M.; PFAMMATTER, W.; JERTMINI, M.; GESSLER, C. Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Plant Molecular Biology**, v.52, p.501-526, 2003b.

LIEBHARD, R.; KOLLER, B.; GIANFRANCESCHI, L.; GESSLER, C. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.1497-1508, 2003a.

KENIS, K., KEULEMANS, J. Genetic linkage maps of two apple cultivars (*Malus x domestica* Borkh) based on AFLP and microsatellite markers. **Molecular Breeding**, v. 15, p. 205-219, 2005.

MALIEPAARD, C.; ALSTON, F. H.; VAN ARKEL, G.; BROWN, L. M.; CHEVREAU, E.; DUNEMANN, F.; EVANS, K. M.; GARDINER, S.; GUILFORD, P.; VAN HEUSDEN, A. W.; JANSE, J.; LAURENS, F.; LYNN, J. R.; MANGANARIS, A.G.; DEN NIJS, A.P.M.; PERIAM, N.; RIKKERINK, E.; ROCHE, P.; RYDER, C.; SANSVINI, J. J.; SCHMIDT, H.; TARTARINI, S.; VERHAEGH, J. J.; VRIELINK-VAN GINKEL, M.; KING, G. J. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p.60-73, 1998.

METAIS, I.; HAMON, B.; JALOUZOT, R.; PELTIER, D. Structure and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 1346-1352, 2002.

MILCHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 9828-9832, 1991.

MNEJJA, M.; GARCIA-MAS, J.; HOWAD, W.; ARÚS P. Development and transportability across *Prunus* species of 42 polymorphic almond microsatellites. **Molecular Ecology Notes** v. 5 , p. 531–535, 2005.

MNEJJA, M.; GARCIA-MAS, J.; HOWAD, W.; BADENES, M. L.; ARÚS P. Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) are highly polymorphic and transferable to peach and almond. . **Molecular Ecology Notes** v. 4 , p. 162-166, 2004.

MORAES, L. K. A. **Avanços no mapeamento genético da ameixeira (*Prunus salicina* Lindl.)**. 2005. 113f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA , M. L. C Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 294-307, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning:laboratory manual**. 2nd edition CSHL, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.V.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KULPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.4407-4414, 1995.

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

YAMAMOTO, T.; MOCHIDA, K.; IMAI, T.; SHI, Y. Z.; OGIWARA I .; HAYASHI, T. Microsatellite markers in peach [*Prunus persica*(L.) Batsch] derived from an enriched genomic and cDNA libraries. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 298–301, 2002.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. V.; PINHEIRO, J. B.; COELHO, A. S. G.; CHAVES, L. J.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 449-458, 2003.

CAPÍTULO 3

Construção de um mapa genético de macieira para uma população segregando para Mancha Foliar de Glomerella (*Colletotrichum gloeosporioides*)

RESUMO

O cultivo da macieira no Brasil vem sofrendo grandes perdas devido a uma doença que se espalhou rapidamente pelos pomares do Sul do país e começa e se disseminar pelos pomares dos Estados Unidos, a Mancha foliar de *Glomerella* (MFG) causada por *Colletotrichum* spp. Devido aos prejuízos econômicos causados pela MFG é crescente a preocupação por parte da comunidade científica em buscar o entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos na resistência a essa doença, uma vez que não existem medidas de controle químico que atendam as exigências da PIM. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um mapa genético de ligação em macieira saturado para a região que contém o gene de resistência a Mancha Foliar de *Glomerella* (*Colletotrichum gloeosporioides*) visando contribuir para a eficiência na geração de novas cultivares de macieira resistentes a essa doença. Foi construído um mapa de ligação para a população proveniente do cruzamento M-13/91 x 'Gala' contendo 23 grupos de ligação abrangendo 1.179,7 cM com uma média de distância entre marcadores de 8,8 cM. O gene de resistência a MFG foi mapeado no grupo de ligação 15 próximo aos microssatélites: NZ02b1 (2,1 cM), CH03b06 (6,8 cM) e Hi03g06 (7,5 cM). O microssatélite NZ02b1 pode ser utilizado em programas de melhoramento de macieira, visando selecionar plantas resistentes a MFG, uma vez que o mesmo encontra-se ligado ao gene de resistência a essa doença. A frequência de recombinação relativamente baixa entre eles caracteriza este como um marcador útil para seleção indireta, devido à pequena porcentagem de plantas com o marcador, que pode ser erroneamente selecionada em uma população segregante.

INTRODUÇÃO

A maçã é a fruta de clima temperado mais importante comercializada como fruta "in natura" tanto no contexto internacional quanto brasileiro. No Brasil, a cultura da macieira é recente e se estabeleceu por meio de grandes empresas, a partir de 1970, atraídas por incentivos de políticas públicas (Mello, 2004). Desde então, inúmeros desafios já foram superados possibilitando um

aumento de produção de 1.528 t em 1973 para 989.961 t na safra 2003/04 (ABPM, 2004). Na última safra (2006/2007) a produção de maçãs chegou a 848.280 t, 60% destas pertencentes da cultivar 'Gala' (ABPM, comunicação pessoal).

O cultivo cultura da macieira no Brasil, desde a década de 80, vem sofrendo grandes perdas devido a uma doença ainda pouco conhecida na época, mas que se espalhou rapidamente pelos pomares do Sul do país, a Mancha foliar de *Glomerella* (MFG), também conhecida como Mancha Foliar da Gala causada por *Colletotrichum spp.* (Boneti *et al.*, 1998; Katsurayama *et al.*, 2004). A MFG ataca no verão, um período crítico na formação do fruto e, além disso, as normas da Produção Integrada de Maçã no Brasil restringem o uso consecutivo dos ditiocarbamatos, devendo ser usados em alternância com fungicidas de outros grupos químicos. Isto dificulta o controle da doença pelos métodos convencionais, apontando para o desenvolvimento de cultivares resistentes como sendo a solução mais adequada para o problema (Katsurayama *et al.*, 2004). Nos estados Unidos, a Mancha foliar da Gala foi primeiramente reportada em 1998, quando foram observados sintomas severos em dois pomares da cv. Gala no oeste do estado do Tennessee (González e Sutton, 1999). Mais tarde, foram observados sintomas da MFG nos estados da Geórgia e da Carolina do Norte. Atualmente, nos Estados Unidos não existe um programa de controle para MFG (González e Sutton, 2004).

Quanto mais profundo é o conhecimento da reação do hospedeiro ao patógeno e a natureza da herança da resistência, mais eficaz é o processo de melhoramento genético. Neste sentido, a construção de mapas genéticos gera um grande número de informações básicas sobre a estrutura e organização do genoma da espécie estudada, tais como padrões de distorção de segregação Mendeliana de segmentos cromossômicos ou a presença de inversões, translocações e duplicações de segmentos de DNA (Slocum *et al.*, 1990). Além disto, permitem a localização de genes de interesse e a identificação de locos controladores de características quantitativa (QTL- *Quantitative Trait Loci*), promovendo assim, o entendimento tanto da biologia básica como de características complexas (Tanksley *et al.*, 1989).

Os mapas genéticos são particularmente relevantes para espécies perenes, como a macieira. Os avanços nos estudos genéticos e o

melhoramento de macieira tendem a ser lentos e dificultados por algumas características peculiares desta espécie como longo período juvenil e forte mecanismo de auto-incompatibilidade (Maliepaard *et al.*, 1998). Desta maneira, os mapas podem de fato acelerar o avanço do conhecimento genético nesta espécie.

Os primeiros mapas genéticos de ligação descritos em macieira foram construídos utilizando isoenzimas e RAPDs (Weeden *et al.*, 1987; Conner *et al.*, 1997). Em seguida, houve o advento dos marcadores microssatélites (*Simple Sequence Repeats* ou seqüências simples repedidas - SSR), que passaram a ser descritos em macieira, sendo esse tipo de marcador abundante no genoma das espécies de *Malus* (Guilford *et al.*, 1997; Gianfranceschi *et al.*, 1998; Hokanson *et al.*, 1998; Liebhard *et al.*, 2002). Por serem multialélicos e facilmente transferíveis de um mapa para outro, os mesmos têm sido de grande utilidade para o mapeamento genético (Liebhard *et al.*, 2002; Liebhard *et al.*, 2003a; Hemmat *et al.*, 2003). Os marcadores AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) produzem um grande número de marcas polimórficas em poucas reações (Xu *et al.*, 2000), também vêm sendo utilizados principalmente para gerar mapas altamente saturados (Kenis e Keulemans, 2005).

Mapas específicos que visam localizar genes de interesse, como genes de resistência a doenças, têm sido amplamente desenvolvidos em macieira, a fim de servir da base para a seleção assistida por marcadores ou mesmo para clonagem desses genes de interesse (Yang *et al.*, 1997; King *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1998; Patocchi *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2002; Huaracha *et al.*, 2004).

Análises de ligação e construção de mapas genéticos utilizando marcadores moleculares têm sido mais trabalhosas quando se utiliza famílias de irmãos completos derivados do cruzamento entre plantas altamente heterozigotas do que quando trabalha-se com progênie derivadas de parentais homozigotos. Nas populações de irmãos completos, derivados do cruzamento entre plantas altamente heterozigotas, os marcadores podem ter até quatro alelos segregando e, um ou ambos os parentais podem ser heterozigotos para um determinado loco. Neste caso, os marcadores podem ser dominantes ou codominantes e, geralmente, a fase de ligação entre pares

de marcas não é conhecida. Por causa dessas diferenças, pares de marcas diferentes fornecem diferentes quantidades de informação para a estimação das freqüências de recombinação e fases de ligação destas marcas nos parentais (Maliepaard *et al.*, 1997). Uma estratégia bastante popular para contornar estes problemas é o chamado pseudo retrocruzamento duplo, onde a análise de ligação é conduzida separadamente em cada parental (Grattapaglia e Sederoff, 1994; Hemmat *et al.*, 1994). Esta estratégia permite mapear os marcadores com segregação 1:1 na população, ou seja, heterozigotos em um parental e homozigotos no outro. Contudo, nos cruzamentos em que alelos importantes segregam em ambos os parentais, a integração das análises de ligação individuais dos parentais é problemática utilizando-se a estratégia do pseudo retrocruzamento duplo (Maliepaard *et al.*, 1997). Uma estratégia para construir um mapa único para a população em que os vários tipos de segregação seriam contemplados é a utilização de um algoritmo EM (máxima esperança) para estimar as freqüências de recombinação entre duas marcas (Maliepaard *et al.*, 1997) aliada à estimativa de distâncias multilocos para fornecer a melhor ordem dentro dos grupos de ligação (Jensen e Jorgensen, 1975).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um mapa genético de ligação em macieira saturado para a região que contém o gene de resistência a Mancha Foliar de Glomerella (*Colletotrichum goeosporioides*) visando contribuir para a eficiência na geração de novas cultivares de macieira resistentes à MFG.

MATERIAL E MÉTODOS

População segregante e extração de DNA

Neste estudo foi utilizada uma população segregante para a resistência à Mancha Foliar de Glomerella proveniente do cruzamento realizado na Estação Experimental de Caçador (EECd) – SC, EPAGRI entre os parentais M-13/91 (R) e ‘Gala’ (S), esta população possuía inicialmente 116 plantas. Porém algumas plantas morreram como resultado de infecções de doenças, resultando em uma progênie utilizável final de 72 indivíduos. O primeiro genitor é descendente do cruzamento de ‘Mollie’s Delicious’ x ‘Princesa’ e possui na

sua genealogia a cv. Ana (resistente à Mancha da Gala e de baixa exigência em frio). A cv. Gala é originária da Nova Zelândia, provindo de um cruzamento de 'Kidd's Orange' x 'Golden Delicious'. Foi selecionada em 1939 e lançada em 1960 (Camilo *et al.*, 2002).

De acordo com as características genéticas dos parentais, a população de mapeamento deverá segregar para exigência em frio e reação ao *Colletotrichum* spp, entre outras (Tabela 1).

Tabela 1: Características dos parentais utilizados para gerar a população de mapeamento.

Característica	Parental	
	M-13/91	'Gala'
Resistência a MFG	Resistente	Suscetível
Resistência a Sarna	Resistência média	Suscetibilidade Alta
Resistência ao Oídio	Resistência moderada	Resistência moderada
Exigência em frio	Baixa	Alta
Resistência ao "Russeting"	Resistente	Suscetível

O DNA dos genitores e da população segregante foi extraído de folhas jovens coletadas no início do ciclo vegetativo, utilizando-se o método CTAB-2 % (Doyle e Doyle, 1987). A estimativa da concentração de DNA extraído foi feita em gel de agarose 0,8% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo, tendo como padrão DNA do Fago Lambda, nas concentrações de 50, 100 e 200 ng/µl (Sambrook *et al.*, 1989).

Avaliação da reação ao *Colletotrichum gloeosporioides*

Foram coletadas brotações de ramos terminais, de aproximadamente 25 cm, com 6 a 8 folhas das plantas da população, 3 brotações por planta, e inoculadas com o isolado *C. gloeosporioides* 197 SJ, proveniente da Epagri / Estação Experimental de São Joaquim. Esse isolado foi escolhido por ser bem caracterizado quanto a sua agressividade e é uma referência nos trabalhos com MFG. O isolado foi mantido em placas contendo meio BDA por 3 a 5 dias.

Após este período, os conídios foram suspensos em água destilada estéril. A suspensão de conídios foi filtrada e a concentração final de conídios foi ajustada para concentração de 10^5 conídios/mL.

Durante o experimento, os ramos foram mantidos durante 120 h em potes plásticos contendo solução de sacarose a 2%. Os ramos foram borrifados com água e em seguida envoltos com sacos plásticos. Vinte e quatro horas após, foram novamente borrifados e assim mantidos por mais 24 h. Após este período, os sacos plásticos foram removidos, mantendo-se o ambiente sem umidificação artificial até a avaliação final. Neste experimento foi adicionado um ramo não inoculado de cada planta como controle negativo, além dos parentais.

Marcadores microssatélites

Noventa e três iniciadores de microssatélites foram testados nos parentais M-13/91 e 'Gala'. Estes foram selecionados das bibliotecas genômicas de macieira (cv. Royal Gala) desenvolvidas por Gianfranceschi *et al.* (1998) e por Liebhard *et al.* (2002) e da cv. Granny Smith por Guilford *et al.* (1997). Além das recentes publicações de Naik *et al.* (2006) e Silfverberg-Dilworth *et al.* (2006). A grande maioria dos microssatélites selecionados tinha sido previamente mapeada em macieira, e a escolha dos iniciadores visou alcançar uma ampla cobertura do genoma. As amplificações via PCR (reação de polimerização em cadeia) e a visualização dos fragmentos amplificados foram conduzidas conforme descrito no Capítulo 2. Os microssatélites foram designados de acordo com as publicações originais.

Marcadores AFLP

Foram encontradas dificuldades na repetição do protocolo AFLP proposto por Hazen *et al.* (2004) - www.msu.edu/user/hazenam/aflp/AFLPprotocolMSU.html - realizado com modificações, como descrito no Capítulo 2. Foram testadas modificações no tempo e na concentração das enzimas utilizadas na digestão, assim como no tempo, temperatura e concentração de DNA ligase durante a etapa de

digestão. Mesmo assim, não foi obtido o mesmo sucesso encontrado nos parentais no Capítulo 2. Desse modo, para realizar a genotipagem da população um novo *screening* com 64 combinações de iniciadores de AFLP foi realizado a fim de escolher as combinações mais polimórficas entre os parentais da população de mapeamento. Desta vez as reações com AFLP foram realizadas em quatro etapas, conforme recomendações feitas tanto pelos autores (Vos *et al.*, 1995) quanto pelo fabricante do Kit AFLP™ Analysis I (Invitrogen). A eletroforese dos fragmentos de AFLP foi realizada como descrito para as análises de microssatélites.

As marcas AFLP foram designadas com o nome dos dois iniciadores utilizados para amplificar o DNA, seguidos pelo tamanho do produto de amplificação. O nome dos iniciadores foi baseado no nome das enzimas de restrição usadas (**E** para EcoRI e **M** para MseI) seguido dos nucleotídeos seletivos dos iniciadores.

Construção do mapa genético de ligação

Os dados foram analisados pelo programa GQMOL (www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm, versão 24/01/06). Foi utilizado o módulo “populações exogâmicas” sendo a população considerada “Família de irmãos completos”. Neste procedimento podem ser analisados locos co-dominantes com as seguintes segregações: 1:1, 1:1:1:1 e 1:2:1. Além de locos dominantes com segregação 1:1. Este módulo utiliza o algoritmo proposto por Maliepaard *et al.* (1997). Neste trabalho os autores apresentam um Algoritmo – EM (máxima esperança) para estimar as freqüências de recombinação em famílias de irmãos completos.

As freqüências de recombinação foram convertidas em distâncias genéticas utilizando-se a função de mapeamento de Kosambi (Kosambi, 1944). Para verificar se os marcadores utilizados se adequam ou não às pressuposições mendelianas estabelecidas para a população de mapeamento em questão foi utilizado o teste do χ^2 (qui-quadrado) A ordem das marcas nos grupos de ligação foi obtida pelo procedimento de delimitação rápida em cadeia (Doerge, 1996), tendo a ordem de máxima verossimilhança como critério. Para a construção dos mapas e formação dos grupos de ligação utilizou-se os

critérios LOD 3.0 e distancia máxima 30 centiMorgans (cM). Adicionalmente, foi feita uma análise multilocus baseada na metodologia dos quadrados mínimos (Jensen e Jorgensen, 1975).

O programa MapChart (Voorrips, 2002) foi utilizado para desenhar os grupos de ligação formados.

RESULTADOS

Avaliação da reação ao *Colletotrichum gloeosporioides*

Das plantas inoculadas, 69 foram suscetíveis e 47 resistentes, se adequando a proporção de 1:1 ($P= 0,04$) que era esperada considerando-se a hipótese já formulada anteriormente de que a resistência à MFG está sob controle monogênico (Katsurayama *et al.*, 2001; Katsurayama *et al.*, 2004; Dantas *et al.*, 2003).

Marcadores microssatélites

Dentre os 93 iniciadores testados, 63 foram polimórficos entre M-13/91 e 'Gala' e foram utilizados para genotipar a população de mapeamento.

Marcadores AFLP

Vinte e sete combinações foram selecionadas para análise na população de mapeamento, produzindo 138 bandas polimórficas (1:1 e 3:1) entre os parentais. Em média cada uma dessas combinações produziu 5,1 bandas polimórficas. Contudo, somente as bandas que apresentaram segregação 1:1 foram utilizadas no mapeamento.

Construção do mapa genético de ligação

No total foram analisadas 168 marcas, destas 34 não foram mapeadas. O comprimento total do mapa genético de ligação para a população M-13/91 x

'Gala' foi de 1.179,7 cM. Considerando o número de marcas mapeadas (134), isto corresponde a uma densidade média de uma marca a cada 8,8 cM (Figura 1). Os grupos de ligação foram designados de acordo com Liebhard *et al.* (2002).

Foram formados 23 grupos de ligação (Tabela 2), sendo seis grupos de ligação extra em relação ao número haplóide de cromossomos de *Malus x domestica* (n=17). Isto indica que mais marcadores são necessários para ligar estes subgrupos para formar os 17 grupos de ligação. Os grupos de ligação 2, 5, 6 e 10 ainda estão divididos em 2 subgrupos. Espera-se que com a saturação do mapa genético de ligação seja possível unir estes subgrupos. Os marcadores não foram uniformemente distribuídos sob o mapa, as distâncias de ligação entre as marcas variaram de 0,2 a 30 cM. O alto número de marcadores não ligados, aliado ao tamanho pequeno de alguns dos grupos de ligação e ao reduzido número de marcas por grupo indicam que o mapa ainda não está saturado.

O comprimento médio dos grupos de ligação foi 51,3 cM ainda pequeno quando comparado a 67,4 de 'Fiesta' e 83,35 de 'Discovery' (Silfverberg-Dilworth *et al.*, 2006). Contudo, esse resultado pode ser considerado bom se levarmos em conta o número de iniciadores microssatélites utilizados, no presente trabalho foram apenas 63 enquanto no trabalho de Silfverberg-Dilworth *et al.* (2006) foram 300.

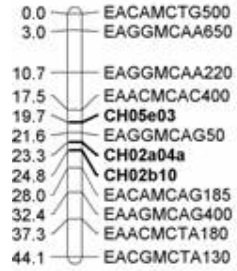
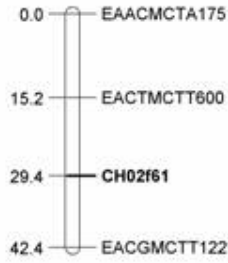
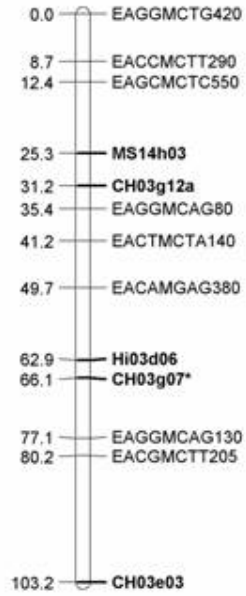
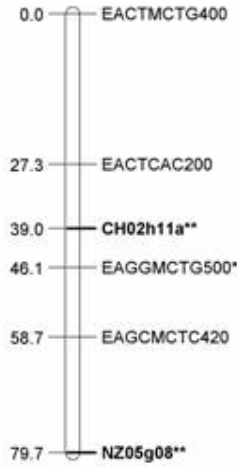
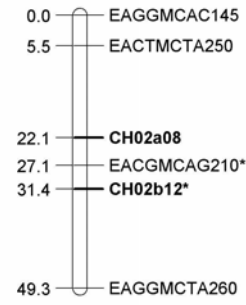
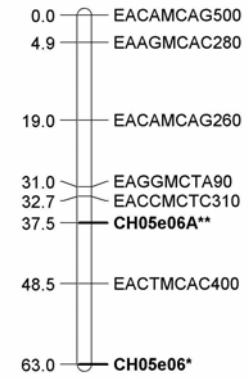
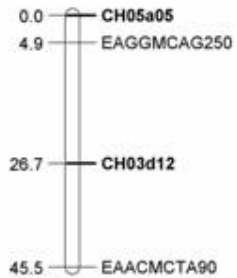
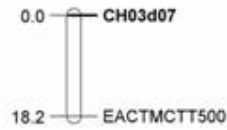
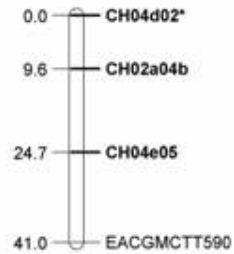
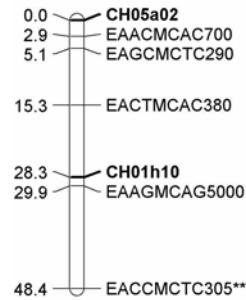
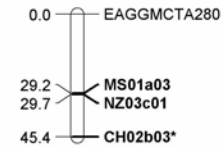
As distâncias e o posicionamento dos marcadores microssatélites foi bastante similar às encontradas nos artigos de referência. É importante mencionar a inclusão do loco microssatélite - NZ03c01 no grupo de ligação 10 e o marcador NZ04f3a no grupo de ligação 17. Estes ainda não tinham sido mapeados por Liebhard *et al.* (2002), Liebhard *et al.* (2003), Naik *et al.* (2006) e Silfverberg-Dilworth *et al.* (2006).

Vários grupos de ligação apresentaram marcadores com segregação distorcida. Estes marcadores não foram descartados, uma vez que eles representam a ocorrência de seleção natural dentro da população (Maliepaard *et al.*, 1998). Estes marcadores foram marcados com um asterisco (*), representando a significância no teste do qui-quadrado a 5% e dois asteriscos(**) para 1% (Figura 1).

O gene de resistência à MFG foi mapeado no grupo de ligação 15 próximo aos microssatélites NZ02b1 (2,1 cM) , CH03b06 (6,8 cM) e Hi03g06 (7,5 cM). Sendo o alelo de 240 pb, do microssatélite NZ02b1 encontrado na plantas resistentes da população e o alelo de 230 pb freqüentemente encontrado nas plantas suscetíveis.

Tabela 2: Número de marcadores ligados e tamanho dos grupos de ligação formados no mapa genético da população M-13/91 x 'Gala'.

Grupos de ligação	Nº de marcadores	Distância (cM)	Distância média (cM)
2	12	44,11	3,68
2a	4	42,37	10,59
3	13	103,18	7,94
4	6	79,74	13,29
5	6	49,32	8,22
5a	8	63	7,88
6	4	45,48	11,37
6a	2	18,16	9,08
7	4	40,96	10,24
8	7	48,4	6,91
9	3	36,46	12,15
10	4	45,42	11,36
10a	3	25,16	8,39
11	2	9,92	4,96
12	16	193,2	12,08
13	4	25,93	6,48
14	10	63,41	6,34
15	9	61,22	6,80
16	2	16,46	8,23
17	5	33,18	6,64
18	3	53,74	17,91
19	3	53,77	17,92
20	4	27,16	6,79
Total	134	1179,7	-
Média	5,8	51,3	8,8

GL2**GL2a****GL3****GL4****GL5****GL5A****GL6****GL6a****GL7****GL8****GL9****GL10****GL10a**

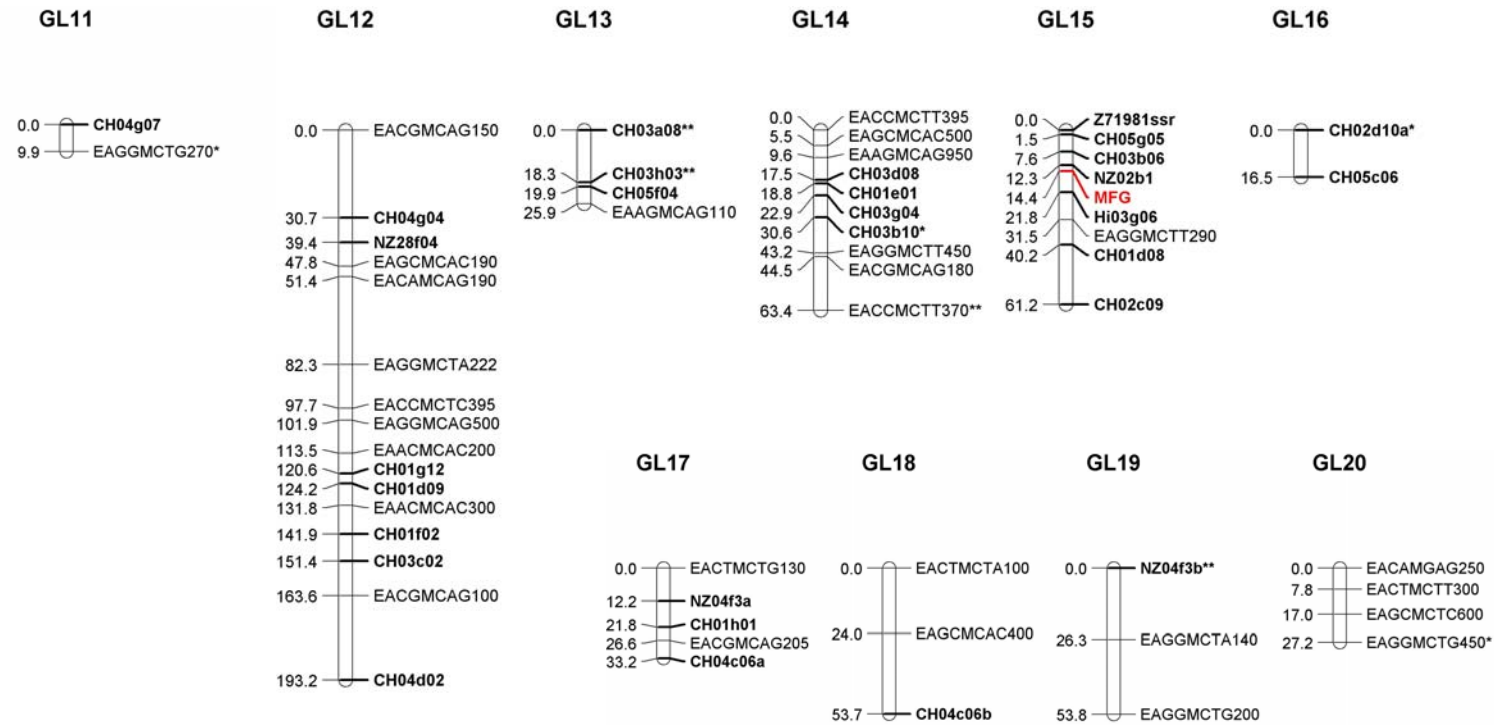


Figura 1: Mapa genético de ligação da população derivada do cruzamento M-13/91 x 'Gala'. Subgrupos do mesmo grupo de ligação são apresentadas lado o lado. Os nomes dos marcadores são mostrados à direita e as distâncias em cM (centiMorgan) são mostradas à esquerda. Os marcadores microssatélites são apresentados em negrito. Asteriscos indicam marcadores com segregação distorcida (teste qui-quadrado) * - $p = 0,05$ e ** - $p = 0,01$. O gene de resistência a Mancha Foliar de Glomerella é representado pela sigla - **MFG** e destacado em negrito no grupo de ligação

DISCUSSÃO

Os mapas genéticos de ligação de macieira publicados até o momento (Hemmat *et al.*, 1994; Conner *et al.*, 1997; Maliepaard *et al.*, 1998; Liebhard *et al.*, 2002; Liebhard *et al.*, 2003; Naik *et al.*, 2006; Silfverberg-Dilworth *et al.*, 2006) possuem de 16 a 24 grupos de ligação. Aqueles organizados em 17 grupos de ligação (Maliepaard *et al.*, 1998; Liebhard *et al.*, 2002; Liebhard *et al.*, 2003; Naik *et al.*, 2006; Silfverberg-Dilworth *et al.*, 2006) são considerados os mais elaborados, pois correspondem aos 17 pares de cromossomos de macieira. O mapa desenvolvido por Liebhard *et al.* (2003) inclui um total de 840 marcadores (439 em 'Fiesta', 499 em 'Discovery' e 98 em ambos os mapas) cobrindo 1.143,8 cM e 1.454,6 cM em 'Fiesta' e 'Discovery', respectivamente, é considerado atualmente o mapa genético de ligação de macieira mais avançado tanto em cobertura quanto em densidade de marcadores.

Recentemente, projetos de genômica de macieira produziram milhares seqüências EST (seqüências expressas marcadas), as quais agora estão sendo avaliadas na busca de seqüências de microssatélites, afim de utilizar as mesmas para desenvolver novos marcadores (Naik *et al.*, 2006; Silfverberg-Dilworth *et al.*, 2006). Esta estratégia tem como principal vantagem o fato de que os marcadores são desenvolvidos para regiões codantes (Silfverberg-Dilworth *et al.*, 2006). O uso desse tipo de marcador aumenta o uso dos mapas genéticos de ligação, pois estes marcadores facilitam a transição da análise de ligação genética para a estratégia de mapeamento de candidatos a genes para dissecar características complexas (Naik *et al.*, 2006). Dois destes microssatélites derivados de E-STS (Z71981ssr e UIUC-111), que já tinham sido mapeados no grupo de ligação 15 (Naik *et al.*, 2006; Silfverberg-Dilworth *et al.*, 2006), foram utilizados no presente estudo a fim de saturar a região que contém o gene de resistência à MFG.

O mapa genético apresentado no presente estudo possui uma cobertura do genoma relativamente boa (1.179,7 cM) contendo pelo menos um marcador codominante como ancora em cada um dos 17 grupos de ligação correspondentes aos cromossomos de macieira, com exceção do grupo de ligação 1. Contudo, este mapa genético de ligação ainda possui uma baixa

saturação do genoma quando comparado à outros mapas genéticos de ligação desenvolvidos para macieira (Conner *et al.*, 1997; Maliepaard *et al.*, 1998; Liebhard *et al.*, 2002; Liebhard *et al.*, 2003). No futuro, mais marcas serão adicionadas aos grupos de ligação, e serão avaliadas novas características importantes para o melhoramento da macieira no Brasil, como exigência em frio, por exemplo.

Contudo, o principal objetivo deste trabalho foi alcançado, isto é, o gene de resistência à MFG foi localizado no grupo de ligação 15 próximo ao marcador microssatélite NZ02b1 (2,1 cM). Além disso, todos os marcadores codominantes reportados nesta região deste grupo de ligação (Maliepaard *et al.*, 1998; Liebhard *et al.*, 2002; Liebhard *et al.*, 2003; Naik *et al.*, 2006; Silfverberg-Dilworth *et al.*, 2006) foram utilizados neste trabalho.

O primeiro mapa genético de ligação em uma população de macieira segregando para resistência a Mancha Foliar da Gala foi desenvolvido com base em marcadores AFLP e microssatélites. O gene de resistência ao *C. gloeosporioides* foi mapeado a uma distância de 22,4 cM do iniciador microssatélite NZ02b1 (Dantas *et al.*, 2002). Contudo, esta distância entre a marca e o gene não permite o uso de seleção assistida para facilitar o melhoramento genético para esta característica, tampouco auxilia na clonagem do referido gene; porém serviu de base para identificar o grupo de ligação em que se encontra o gene, o qual corresponde ao GL 15 de Liebhard *et al.* (2002).

A diferença de distâncias encontradas entre o presente trabalho e Dantas *et al.* (2002) pode ser explicada pelo fato de que nos dois trabalhos foram utilizadas populações segregantes diferentes, o que pode gerar frequências de recombinação diferentes. Outra explicação seria o fato de que não existe um único gene responsável pela reação a MFG em macieira, pois pelo menos três genes são passíveis de ocorrer, os quais podem estar organizados em famílias gênicas, distribuídos em “tandem” no mesmo grupo de ligação, a exemplo do que já foi relatado em macieira para característica de resistência a Sarna, onde vários genes de resistência localizam-se no grupo de ligação 2 (Yang *et al.*, 1997; King *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1998, Patocchi *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2002; Huaracha *et al.*, 2004; Calenge *et al.*, 2004).

Análises de seqüências de DNA revelaram que os genes de resistência (R) são altamente conservados entre espécies de plantas. Algumas dessas classes de genes R são definidas de acordo com o domínio protéico que codificam (Dangl e Jones, 2001). Alguns locos contendo candidatos a genes de resistência, do tipo que possui sítios de ligação a nucleotídeos ricos em repetições de leucina (NBS/LRR) têm sido encontrados em plantas, conferindo resistência parcial a doenças. Calenge *et al.* (2005) mapearam 53 análogos de genes de resistência (RGAs) pertencentes a classe de genes de resistência NBS/LRR em macieira, vários deles agrupados em seqüência no grupo de ligação 2. Baldi *et al.* (2004) também localizaram 18 RGAs nesta espécie, pertencentes a diferentes classes incluindo a classe NBS/LRR. É interessante ressaltar que Calenge *et al.* (2005) encontraram dois RGAs no grupo de ligação 15 (mesmo grupo no qual foi mapeado um dos genes de resistência a MFG) a uma distância de 11 (RGA - NBS2R7) e 5 cM (RGA -NBS3M9c) do microssatélite CH01d08.

Neste trabalho, o marcador microssatélite CH01d08 foi mapeado próximo ao gene de resistência a MFG (Figura 1). Este fato corrobora para a hipótese de que realmente existem genes de resistência a MFG localizados neste grupo de ligação, os quais podem ser utilizados em programas de melhoramento genético da macieira para resistência a MFG.

Marcadores moleculares associados à características importantes em macieira podem ajudar a reduzir o espaço e o tempo requeridos para o melhoramento desta espécie. A seleção assistida por marcadores permite que a seleção seja efetuada nas populações de melhoramento antes mesmo delas serem transplantadas para o campo. Utilizando-se marcadores multi-alélicos, como microssatélites, que requerem poucas quantidades de DNA e poucas etapas de purificação durante a extração de DNA, com isso uma grande quantidade de plantas pode ser avaliada em um curto período de tempo. O melhoramento genético de macieira com múltiplos genes de resistência com o intuito de obter-se uma resistência durável é uma alternativa para o controle de doenças fungicas e reduzir o impacto ambiental gerado pelo uso de pesticidas (Stankiewicz *et al.*, 2002). Considerando estes aspectos, o microssatélite NZ02b1 pode ser utilizado em programas de melhoramento de macieira, visando selecionar plantas resistentes a MFG uma vez que o mesmo encontra-

se ligado ao gene de resistência a essa doença. A frequência de recombinação relativamente baixa entre eles (2,1%) caracteriza este como um marcador útil para seleção indireta, devido à pequena porcentagem de plantas com o marcador, que pode ser erroneamente selecionada em uma população segregante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MAÇÃ – ABPM. Site: <http://www.abpm.org.br/> - acesso em maio de 2004.

BALDI, P.; PATOCCHI, A.; ZINI, E.; TOLLER, C.; VELASCO, R.; KOMJANC, M. Cloning end linkage mapping of resistance gene homologues in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, p.231-239, 2004.

BONETI, J. I.; KATSURAYAMA, Y. **Doenças da Macieira**. São Paulo: BASF, 1998. 97p.

CALENGE, F. ; FAURE, A. ; GOERRE, M. ; GEBHARDT, C. ; VAN DE WEG, W. E. ; PARISI, L. ; DUREL, C. E. Quantitative trait loci (QTL) analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, v. 94 p. 370-379. 2004.

CALENGE, F.; VAN DER LINDEN, C.G.; VAN DE WEG, E.; SCHOUTEN, H. J.; VAN ARKERL, G.; DENAMCE, C.; DUREL, C. E. Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.660-668, 2005.

CAMILO, A. P.; DENARDI, F. Cultivares: Descrição e comportamento no sul do Brasil. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis, 2002. 743p.
CHEVREAU, E.; LESPINASSE, Y.; GALLET, M. Inheritance of pollen enzyme and polyploid origin of apple (*Malus × domestica* Borkh.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 71, p.: 268–277, 1985.

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

CONNER, P. J.; BROWN, S. K.; WEEDEN, N. F. Randomly amplified polymorphic DNA-based genetic linkage maps of three apple cultivars. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 122, n.3, p. 350-359, 1997.

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

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos. 2.1. Viçosa, MG: UFV, 2004. <<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>>. Accessed in: 24/01/06.

DANTAS, A. C. M.; VIEIRA, E. A.; BONETI, J. I.; DALBÓ, M.; NODARI, R. O. Construção de mapas genéticos de ligação em uma população de macieira (*Malus x domestica* Borkh.) segregando para a mancha foliar (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.). In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém, PA. **Anais...**, Belém, PA, 2002.

DANTAS, A. C. M.; BONETI, J. I.; KATSURAYAMA, Y.; NODARI, R. O. Herança da resistência da Mancha Foliar (*Colletotrichum Gloeosporioides* Penz.) em macieira. In: CONGRESSO BRASILEIRO MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., Porto Seguro, 2003. **Anais....** Porto Seguro, 2003.

DANGL, J.; JONES, J. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, p. 828-833, 2001.

DOERGE, R. W. Constructing genetic maps by rapid chain delineation. **Journal Agric. Genomics** 2:6, 1996.

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

GIANFRANCESCHINI, L.; SEGLIAS, N.; TARCHINI, R.; KOMJANC, M.; GESSLER, C. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.1069-1076, 1998.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T. B. First Report of Glomerella Leaf Spot (*Glomerella cingulata*) of Apple in the United States. **Plant Disease**, v. 83, n. 11, p. 1074. 1999.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T. B. Population Diversity within Isolates of *Colletotrichum* spp. Causing Glomerella Leaf Spot and Bitter Rot of Apples in Three Orchards in North Carolina. **Plant Disease**, v. 88 p.1335-1340, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic map of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v. 137, p. 1121-1137, 1994.

GUILFORD, P.; PRAKASSH, S.; ZHU, J. M.; RIKKERINK, E.; GARDINER, S.; BASSETT, H.; FORSTER, R. Microsatellites in *Malus X domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.249-254, 1997.

HEMMAT, M.; WEEDEN, N. F.; BROWN, S. K. Mapping and evaluation of *Malus X domestica* microsatellites in apple and pear. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 128, n.4, p. 515-520, 2003.

HEMMAT, M.; WEEDEN, N. F.; MANGANARIS, A. G.; LAWSON, D. M. A molecular marker linkage map for apple. **Journal of Heredity**, v. 85, p. 4-11, 1994.

HOKANSON, S. C.; SNEWC-McFADDEN, A. K.; LAMBOY, W. F.; McFERSON, J. R. Microsatellites (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus X domestica* Borkh. core subset collection. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.671-683, 1998.

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

JENSEN, J.; JORGENSEN, J. H. The barley chromosome 5 linkage map. **Hereditas**, v. 80, p. 5-16, 1975.

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

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

KENIS, K.; KEULEMANS, J. Genetic linkage maps of two apple cultivars (*Malus x domestica* Borkh.) based on AFLP and microsatellite markers. **Molecular Breeding**, v.15, p. 205-219, 2005).

KING, G. J.; ALSTON, F. H.; BROWN, L. M.; CHEVREAU, E.; EVANS, K. M.; DUNEMANN, F.; JANSE, J.; LAURENS, F.; LYNN, J. R.; MALIEPAARD, C.; MANGANARIS, A. G.; ROCHE, P.; SCHIMIDT, H.; TARTARINI, S.; VERHAEGH, J.; VRIELINK, R. Multiple field and glasshouse assessment increase the reliability of linkage mapping of the Vf source of scab resistance in apple. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.699-708, 1998.

KOSAMBI D. D. The estimation of map distances from recombination values. **Ann. Eugen.** V.12 p 172–175, 1944.

LIEBHARD, R.; GIANFRANCESCHINI, L.; KOLLER, B.; RYDER, C. C.; TARCHINI, R.; VAN DE WEG, E.; GESSLER, C. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Molecular Breeding**, v.10, p.217-241, 2002.

LIEBHARD, R.; KELLERHALS, M.; PFAMMATTER, W.; JERTMINI, M.; GESSLER, C. Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Plant Molecular Biology**, v.52, p.501-526, 2003b.

LIEBHARD, R.; KOLLER, B.; GIANFRANCESCHINI, L.; GESSLER, C. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.1497-1508, 2003a.

MALIEPAARD, C.; ALSTON, F. H.; VAN ARKEL, G.; BROWN, L. M.; CHEVREAU, E.; DUNEMANN, F.; EVANS, K. M.; GARDINER, S.; GUILFORD, P.; VAN HEUSDEN, A. W.; JANSE, J.; LAURENS, F.; LYNN, J. R.; MANGANARIS, A.G.; DEN NIJS, A. P. M.; PERIAM, N.; RIKKERINK, E.; ROCHE, P.; RYDER, C.; SANSVINI, J. J.; SCHMIDT, H.; TARTARINI, S.; VERHAEGH, J. J.; VRIELINK-VAN GINKEL, M.; KING, G. J. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p.60-73, 1998.

MALIEPAARD, C.; JANSEN, J.; VAN OOIJEN, J. W. Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species : overview and consequences for applications. **Genet. Res.**, v. 70, p. 237-250,1997.

MELLO, L. M. R. **Produção e mercado de maçã**. Comunicado técnico nº 50, Embrapa, Bento Gonçalves, RS, junho, 2004.

NAIK, S.; HAMPSOM, C.; GASIC, K.; BAKKEREM, G.; KORBAN, S.S. Development and linkage mapping of E-STS and RGA markers for functional gene homologues in apple. **Genome**, v. 49, p. 959-968, 2006.

PARLEVLIT, J. E. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens: Present situation. **Euphytica**, v. 124 p. 147-156, 2002.

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

SILFVERBERG-DILWORTH, E.; MATASCI C. L.; VAN DE WEG, W. E.; VAN KAAUWEN, M.; WALSER, M. P. W.; KODDE, L. P.; SOGLIO, V.; GIANFRANCESCHI, L.; DUREL, C. E.; COSTA, F.; YAMAMOTO, T.; KOLLER, B.; GESSLER, C.; PATOCCHI, A. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. **Tree Genetics & Genomes**, v. 2 p. 202–224, (2006).

SLOCUM, M. K.; FIGDORE, S. S.; KENNARD, W. C.; SUZUKI, J. Y.; OSBORN, T. C., Linkage arrangement of restriction fragment length polymorphism loci in *Brassica oleracea*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.80, p.57-64, 1990.

STANKIEWICZ, M.; PITERA E.; GAWROŃSKI, S. W. The use of molecular markers in apple breeding for disease resistance. **Cellular & Molecular Biology Letters**, V. 7, p. 445 – 448, 2002.

TANKESLEY, S. D.; YOUNG, N. D.; PATERSON, A. H.; BONIERBALE, M. W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Biotechnology**, v. 7, p. 257-264, 1989.

TAYLOR, J. A. necrotic leaf blotch and fruit rot of apple caused by strain of *Glomerella cingulata*. **Phytopathology**, v. 61 p. 221-224, 1971.

WEEDEN, N. F.; LAMB, R.C. Genetics and linkage analysis of 19 isozyme loci in apple. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 112, n.5, p. 865-872, 1987.

VOORRIPS, R.E. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **Journal of Heredity** 93, 77-78, 2002.

WU, R.; MA, C.; PAINTER, I.; ZENG, Z. Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species. **Theoretical Population Biology**, v.61, p. 349–363, 2002.

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

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

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