

# Dissimilaridade entre genótipos elite de macieira da Epagri com base na caracterização fenotípica e molecular

Maraisa Crestani Hawerth<sup>1</sup>, Thyana Lays Brancher<sup>2</sup> e Marcus Vinícius Kvitschal<sup>1</sup>

**Resumo** – A distinção legal entre genótipos de macieira no Brasil atualmente é realizada com base em descritores fenotípicos, contudo, o uso de marcadores moleculares permite a caracterização livre dos efeitos de ambiente. Logo, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética entre genótipos copa de macieira utilizando descritores morfoagronômicos e moleculares, e verificar a eficiência de discriminação dos diferentes conjuntos de caracteres. Os cultivares Daiane, SCS417 Monalisa, SCS425 Luiza, SCS426 Venice, SCS427 Elenise, Epagri 405 Fuji Suprema, Galaxy e a seleção M-10/09 foram caracterizados para os 57 descritores mínimos e marcadores genéticos gerados por 12 conjuntos de iniciadores SSR. Os genótipos foram alocados em quatro grupos com base nos descritores mínimos, e em dois grupos ao considerar a dissimilaridade gerada por 52 marcadores SSR e pela combinação de descritores e marcadores genéticos, sugerindo maior robustez da caracterização quando esta contempla os marcadores moleculares.

**Termos para indexação:** *Malus x domestica*; melhoramento de macieira; conservação de germoplasma, descritores mínimos; marcadores SSR.

## Dissimilarity among elite apple genotypes of Epagri based on phenotypic and molecular characterization

**Abstract** – The distinction among apple genotypes is based on phenotypic descriptors, however, the use of molecular markers allows the characterization free of environmental effects. The objective of the work was to access the genetic variability among apple tree genotypes based on morphological and molecular descriptors, and to verify the efficiency of discrimination using different character sets. The cultivars Daiane, SCS417 Monalisa, SCS425 Luiza, SCS426 Venice, SCS427 Elenise, Epagri 405 Fuji Suprema, Galaxy and the selection M-10/09 were evaluated by 57 phenotypic descriptors and genetic markers generated by 12 sets of SSR primers. The genotypes were allocated at four distinct groups based on the performance for descriptors and at two groups considering the dissimilarity identified by 52 SSR markers and by combining minimal descriptors and genetic markers, suggesting greater robustness of the characterization when it contemplates the use of molecular markers.

**Index terms:** *Malus x domestica*; apple breeding; germplasm conservation; minimum descriptors; SSR markers.

## Introdução

A caracterização e distinção de novos cultivares desenvolvidos pelo melhoramento genético é tradicionalmente baseada em descritores fenotípicos que contemplam características morfológicas específicas da planta, avaliadas via comparação com cultivares padrões (JACKSON, 2003).

O termo “descritor” representa a característica morfológica, fisiológica, bioquímica ou molecular que é herdada geneticamente, utilizada para identificação de genótipos (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2011). Os descritores são utilizados em diferentes culturas para o

estudo da variabilidade genética entre genótipos de interesse para o melhoramento genético e para a conservação de germoplasma, possibilitando a identificação de genótipos similares, duplicados, ou mais distantes geneticamente (OLIVEIRA et al., 2006; VIEIRA et al., 2009; NEITZKE et al., 2010; MACHADO et al., 2015; SILVEIRA et al., 2015).

No Brasil, os descritores mínimos para cultivares frutíferos de macieira (*Malus x domestica*) e os respectivos cultivares padrões são definidos pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SNPC/Mapa), que atualmente exige a caracterização por meio de 57 descritores, estabelecendo

diretrizes para as avaliações de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2012).

Um descritor eficiente deve permitir a caracterização e a separação de diferentes genótipos conforme a variabilidade considerada, não ser redundante em função da elevada correlação com outros descritores e ser preferencialmente de baixo custo, rápida mensuração e pouco influenciado pelos efeitos do ambiente (OLIVEIRA et al., 2006; VIEIRA et al., 2009). Nesse sentido, o uso de marcadores moleculares, como os SSR (*Simple Sequence Repeats*), pode viabilizar a caracterização dos genótipos sem a influência dos efeitos de ambien- ▶

Recebido em 12/03/2018. Aceito para publicação em 14/06/2018.

<http://dx.doi.org/10.22491/RAC.2018.v31n3.9>

<sup>1</sup> Engenheiro(a)-agrônomo(a), Dr.(a), Epagri/ Estação Experimental de Caçador, Rua Abílio Franco, 1500, Bairro Bom Sucesso, 89.501-032, Caçador, SC, e-mail: maraisahawerth@epagri.sc.gov.br, marcusvinicius@epagri.sc.gov.br

<sup>2</sup> Biotecnologista Industrial, Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, Ufla, Av. Doutor Sylvio Menicucci, 1001 – Kennedy, 37200-000, Lavras, MG, e-mail: thyanalays@hotmail.com.

te, permitindo a definição de uma identidade genética reprodutível ao longo do tempo e do espaço, auxiliando na correta identificação e rastreabilidade de genótipos.

O genoma da macieira é densamente formado por sequências simples repetidas, que consistem em um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem*. Essas regiões são denominadas microssatélites, SSR ou STR (*Short Tandem Repeats*), e podem ser encontradas em bancos de sequências de nucleotídeos (HIDRAS, 2009). As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie ou gênero, permitindo a seleção de iniciadores específicos que amplificam, via reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), fragmentos contendo o DNA repetitivo (MORGANTE & OLIVIERI, 1993). Os fragmentos podem ser visualizados em gel de agarose de alta resolução, em gel desnaturante de poli-acrilamida, que apesar de ser mais laborioso tem melhor custo-benefício, ou em eletroforese capilar, que seria a forma mais adequada para a identificação de polimorfismos, porém não é acessível em todos os laboratórios de análise (VIEIRA et al., 2016).

O uso dos iniciadores SSR permite acessar a distância genética entre genótipos via análise dos polimorfismos e, em conjunto com os descritores morfoagronômicos, geram informações que auxiliam na definição de cruzamentos dirigidos, visando à ampliação da variabilidade genética. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética entre genótipos como copa de macieira desenvolvidos pela Epagri via descritores morfoagronômicos e moleculares, e verificar a eficiência de discriminação com base nos diferentes conjuntos de características consideradas.

## Material e métodos

No ciclo produtivo 2015/2016 foram avaliadas cinco plantas dos cultivares Daiane, SCS417 Monalisa, SCS425 Luiza, SCS426 Venice, SCS427 Elenise e Epagri 405 Fuji Suprema, da seleção M-10/09, todos desenvolvidos pela Epagri, e de 'Galaxy', cultivar utilizado como padrão nesse estudo (Tabela 1). As plan-

tas foram avaliadas para o conjunto de 57 descritores mínimos previstos pelo SNPC/Mapa (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2012), atribuindo um código numérico para cada classe possível de cada descritor. As avaliações dos caracteres associados às plantas (hábito de crescimento, desenvolvimento vegetativo e florescimento) e desenvolvimento inicial dos frutos foram realizadas em pomar experimental na Estação Experimental de Caçador (EECd) instalado em 2011, em Caçador, Santa Catarina (26°49'5"S; 50°59'12"O, altitude de 940m), em plantas conduzidas em sistema de líder central, espaçadas em 3,5m entre linhas e 1,7m entre plantas, sobre porta enxerto Marubakaido e com inter-enxerto M.9. Os caracteres associados a frutos maduros foram avaliados em amostras de 50 frutos (10 frutos colhidos de cada planta), no Laboratório de Genética e Melhoramento de Fruteiras de Clima Temperado da EECd.

As extrações de DNA foram realizadas utilizando o Kit FastDNA® SPIN (MP Biomedicals, EUA) ajustado para *Malus x domestica*. A pureza e a concentração do DNA foram analisadas em espectrofotômetro UV/Vis (Libra S50 Biochron, Reino Unido). As amostras de DNA foram tratadas com 2µg de RNase por µL de DNA, para a eliminação de RNA contaminante.

Após a realização de testes prévios, foram selecionados e utilizados nessa avaliação 12 conjuntos de iniciadores

SSR: CH04g10, CH05d11, CH05e03, CH02d08, CH02c11, CH01f02, GD12, CH04c07, CH01h01, GD147, Hi02c07 e CH04e03. Esses iniciadores SSR estão detalhadamente descritos em HIDRAS (2009).

As reações de PCR foram realizadas em termociclador T100™ BioRad® (EUA) com componentes adaptados a partir de Kitahara e Matsumoto (2002): tampão de reação 1X; MgCl<sub>2</sub> 2,0mM; dNTPs 0,2mM; iniciador SSR forward 1,0µM; SSR reverse 1,0µM; 1U de Taq DNA Polimerase; 50ng de DNA; e água ultrapura para completar o volume final de 20µl de reação. As condições do programa de amplificação seguiram o sugerido por Galli et al. (2005): 2min a 95°C (desnaturação inicial), seguido por 35 ciclos compostos pelas etapas de desnaturação (94°C por 20s), anelamento (56°C por 30s) e extensão (72°C por 1min), seguido por uma etapa final de extensão (72°C por 5min), e mantendo-se a temperatura em 4°C após a finalização do processo de amplificação. Os produtos amplificados foram separados via eletroforese em gel de agarose 3%, com marcador de peso molecular de 50pb, corado com o fluoróforo GelRed (Biotium, EUA), e analisados visualmente via imagens capturadas em fotodocumentador Kodak Geologic 2012 Pró.

Com base nos marcadores gerados pelos iniciadores SSR foi construída a matriz genética, atribuindo-se o número um (1) para bandas presentes nos indivíduos em análise e zero (0) para

Tabela 1. Genealogia dos genótipos de macieira avaliados

Cultivar / Seleção	Genealogia
SCS427 Elenise	Epagri 404 Imperatriz ( <i>Mollie's Delicious x Gala</i> ) x Cripps Pink ( <i>Golden Delicious x Lady Williams</i> )
SCS425 Luiza	Epagri 404 Imperatriz ( <i>Mollie's Delicious x Gala</i> ) x Cripps Pink ( <i>Golden Delicious x Lady Williams</i> )
M-10/09	Epagri 404 Imperatriz ( <i>Mollie's Delicious x Gala</i> ) x Cripps Pink ( <i>Golden Delicious x Lady Williams</i> )
SCS417 Monalisa	Gala ( <i>Golden Delicious x Kidd's Orange Red</i> ) x Malus 4 ( <i>Prima x Anna</i> )
SCS426 Venice	Epagri 404 Imperatriz ( <i>Mollie's Delicious x Gala</i> ) x Epagri 406 Baronesa ( <i>Fuji x Princesa</i> )
Daiane	Gala ( <i>Golden Delicious x Kidd's Orange Red</i> ) x Princesa ( <i>NJ-56 x Anna</i> )
Epagri 405 Fuji Suprema	Mutação colorida de Fuji ( <i>Delicious x Ralls Janet</i> )
Galaxy	Mutação colorida de Gala ( <i>Golden Delicious x Kidd's Orange Red</i> )

bandas ausentes. Foi construída então a matriz de dissimilaridade genética ( $D_{ij}$ ) utilizando o complemento ( $1-S_j$ ) do Coeficiente de Jaccard ( $S_j$ ), calculado originalmente conforme a fórmula  $S_j = a/(a+b+c)$ , sendo 'a' correspondente à presença da mesma banda em ambos os indivíduos considerados, 'b' associado à presença da banda no indivíduo 1 e ausência no indivíduo 2, e 'c' atribuído para a ausência da banda no indivíduo 1 e presença no indivíduo 2. As análises foram realizadas utilizando o programa computacional GENES (CRUZ, 2013).

Adicionalmente, foi gerada uma matriz de dissimilaridade baseada unicamente nos descritores mínimos, e outra baseada no conjunto de descritores mínimos e marcadores moleculares. Os dados foram categorizados em qualitativos nominais e ordinais (descritores mínimos) e lógicos (marcadores moleculares). As medidas de dissimilaridade foram obtidas por meio do algoritmo de Gower (1971), cujas análises foram realizadas pelo programa R utilizando o pacote 'cluster', via procedimento 'Daisy' (MAECHLER et al., 2017).

Foram construídos três dendrogramas pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*): 1) com base no desempenho dos genótipos para os 57 descritores mínimos; 2) com base nos dados moleculares gerados pelos iniciadores SSR; 3) considerando o conjunto de descritores mínimos e marcadores moleculares. A validação dos agrupamentos foi determinada pelo coeficiente de correlação cofenético utilizando a dissimilaridade média para a separação dos grupos (SOKAL & ROHLF, 1962). A significância da correlação cofenética foi calculada pelos testes t e de Mantel (1000 permutações). Esses procedimentos foram realizados com uso do programa computacional NTSYS pc 2.1 (ROHLF, 2000).

## Resultados e discussão

Na comparação entre pares de genótipos considerando os 57 descritores morfoagronômicos avaliados, em geral, 21 descritores (37%) apresentaram informações coincidentes e 36 (63%) apresentaram discrepância (Tabela 2). A dissimilaridade entre os genótipos variou de 0,28 ('M-10/09' e 'SCS426

Venice') a 0,57 ('SCS417 Monalisa' e 'Epagri 405 Fuji Suprema'). 'M-10/09' e 'SCS426 Venice', que compartilham o genitor Epagri 404-Imperatriz, apresentaram em comum 10 dos 22 descritores associados a caracteres de planta, ramo, folha e flor, e 15 dos 35 relacionados ao fruto, e fenotipicamente, são genótipos de macieira que compartilham várias características agrônômicas comuns. Já os cultivares 'SCS417 Monalisa' e 'Epagri 405 Fuji Suprema' evidenciaram apenas 12 descritores em comum, sendo seis associados à planta, ramo, folha e flor, e seis às características do fruto. Além de serem originados de *pool* gênicos distintos, agronomicamente estes cultivares apresentam períodos de floração,

hábito de crescimento e de frutificação, maturação, qualidade organoléptica e visual dos frutos distintos.

A dissimilaridade média foi de 0,41, indicando que, no geral, o conjunto de genótipos avaliados foram dissimilares em 41% das classes possíveis para as características multicategóricas avaliadas. Com base na dissimilaridade média, os genótipos foram separados em quatro grupos, conforme dendrograma representado na Figura 1A. Houve bom ajuste do agrupamento de UPGMA à matriz de dissimilaridade, visto que a correlação cofenética foi de 0,80. Três grupos foram constituídos por um único cultivar: 'SCS427 Elenise', 'SCS417 Monalisa' e 'Epagri 405 Fuji Suprema', enquanto o ▶

Tabela 2. Dissimilaridade genética entre genótipos copa de macieira com base em descritores morfoagronômicos, marcadores moleculares e análise conjunta entre dados morfoagronômicos e moleculares, Caçador, Santa Catarina, safra 2015/2016

Combinações entre genótipos	$D_{ij}^{/1}$	$D_{ij}^{/2}$	$D_{ij}^{/3}$
SCS427 Elenise vs. SCS425 Luiza	0,395	0,543	0,466
SCS427 Elenise vs. M-10/09	0,411	0,143	0,334
SCS427 Elenise vs. SCS417 Monalisa	0,453	0,419	0,457
SCS427 Elenise vs. SCS426 Venice	0,348	0,375	0,370
SCS427 Elenise vs. Galaxy	0,521	0,323	0,467
SCS427 Elenise vs. Epagri 405 Fuji Suprema	0,506	0,692	0,600
SCS427 Elenise vs. Daiane	0,423	0,515	0,474
SCS425 Luiza vs. M-10/09	0,405	0,543	0,473
SCS425 Luiza vs. SCS417 Monalisa	0,444	0,500	0,481
SCS425 Luiza vs. SCS426 Venice	0,342	0,500	0,415
SCS425 Luiza vs. Galaxy	0,374	0,500	0,436
SCS425 Luiza vs. Epagri 405 Fuji Suprema	0,503	0,684	0,594
SCS425 Luiza vs. Daiane	0,399	0,452	0,432
M-10/09 vs. SCS417 Monalisa	0,451	0,419	0,456
M-10/09 vs. SCS426 Venice	0,282	0,375	0,327
M-10/09 vs. Galaxy	0,323	0,375	0,354
M-10/09 vs. Epagri 405 Fuji Suprema	0,402	0,725	0,552
M-10/09 vs. Daiane	0,392	0,600	0,487
SCS417 Monalisa vs. SCS426 Venice	0,406	0,419	0,425
SCS417 Monalisa vs. Galaxy	0,427	0,367	0,421
SCS417 Monalisa vs. Epagri 405 Fuji Suprema	0,570	0,629	0,612
SCS417 Monalisa vs. Daiane	0,423	0,357	0,416
SCS426 Venice vs. Galaxy	0,330	0,323	0,339
SCS426 Venice vs. Epagri 405 Fuji Suprema	0,453	0,692	0,568
SCS426 Venice vs. Daiane	0,370	0,559	0,455
Galaxy vs. Epagri 405 Fuji Suprema	0,436	0,658	0,542
Galaxy vs. Daiane	0,320	0,515	0,405
Epagri 405 Fuji Suprema vs. Daiane	0,464	0,667	0,560
Médias:	0,413	0,495	0,461

vs. Versus; <sup>/1</sup> Dissimilaridade calculada pelo algoritmo de Gower para os dados de descritores morfoagronômicos; <sup>/2</sup> Dissimilaridade calculada pelo complemento do Coeficiente de Jaccard ( $1-S_j$ ) para os dados moleculares; <sup>/3</sup> Dissimilaridade calculada pelo algoritmo de Gower (1971) para os dados conjuntos de descritores morfoagronômicos e marcadores moleculares.

quarto grupo contemplou os cultivares ‘SCS425 Luiza’, ‘SCS426 Venice’, ‘Daiane’, ‘Galaxy’ e a seleção ‘M-10/09’.

Com base na genealogia dos cultivares apresentada na Tabela 1, observa-se que o maior grupo foi composto por quatro genótipos que compartilham a macieira ‘Gala’ em sua genealogia (‘Galaxy’, ‘Daiane’, ‘SCS425 Luiza’ e ‘M-10/09’), dois que compartilham o cultivar Princesa (‘Daiane’ e ‘SCS426 Venice’) e dois que possuem na genealogia o cultivar Cripps Pink (‘SCS425 Luiza’ e ‘SCS426 Venice’), o que contribui para a semelhança em muitos dos descritores mínimos considerados, levando à formação de um único grupo.

Apesar de as macieiras ‘SCS417 Monalisa’ e ‘SCS427 Elenise’ possuírem o cultivar Gala em sua genealogia, foi possível identificar padrões de planta distintos de seu genitor (37 discordâncias) e do progenitor (43 discordâncias), respectivamente, representado pela macieira ‘Galaxy’ (clone colorido de ‘Gala’), e também em comparação aos demais genótipos considerados nesta avaliação (Tabela 2). O cultivar ‘SCS427 Elenise’ se destaca também por apresentar a maturação de frutos bastante tardia, e frutos com características físicas e organolépticas bem distintas. Do mesmo modo, ao observar o aspecto das plantas e dos

frutos da ‘Epagri 405 Fuji Suprema’, esse cultivar apresentou fenótipo bastante peculiar, com média de 39,4 valores discordantes dos demais genótipos. Logo, essas diferenças fenotípicas refletiram discordâncias em muitos descritores, culminando no agrupamento dos cultivares ‘SCS417 Monalisa’, ‘SCS426 Elenise’ e ‘Epagri 405 Fuji Suprema’ de forma isolada.

A análise de agrupamento com base nos dados dos descritores morfoagronômicos permitiu diferenciar todos os genótipos avaliados, mesmo com estreita base genética existente nesse conjunto genotípico e, conseqüentemente, grande similaridade em vários dos caracteres considerados.

Na Tabela 3 são apresentadas as características e eficiência dos 12 iniciadores SSR e respectivos marcadores adotados na análise dos genótipos de macieira. As reações de PCR com os 12 conjuntos de iniciadores SSR revelaram 52 bandas polimórficas, que foram utilizadas na caracterização dos genótipos. Foi verificada a dissimilaridade variando entre 0,14 (‘SCS427 Elenise’ e ‘M-10/09’) e 0,73 (‘Epagri 405 Fuji Suprema’ e ‘M-10/09’), com média de 0,50. Essa dissimilaridade média pode ser considerada moderada, uma vez que os genótipos avaliados neste trabalho

apresentam algum grau de parentesco entre si e basicamente foram originados de uma única espécie, *Malus x domestica*, tendo como possível consequência o estreitamento da base genética.

Com base na dissimilaridade média foram formados apenas dois grupos de genótipos (Figura 1B). O coeficiente de correlação cofenética foi de 0,94, evidenciando bom ajuste do método de agrupamento UPGMA à matriz de dissimilaridade de Jaccard. O cultivar ‘Epagri 405 Fuji Suprema’ formou um grupo isolado dos demais genótipos avaliados.

Era esperado a menor divergência genética entre os cultivares ‘SCS426 Venice’ e ‘Epagri 405 Fuji Suprema’, uma vez que ‘SCS426 Venice’ é descendente de segunda geração de ‘Fuji’ (Tabela 2). No entanto, observou-se a segunda maior estimativa de dissimilaridade genética ( $D_{ij}=0,692$ ) para as comparações entre genótipos. Isso sugere a ocorrência de ampla segregação nas duas gerações ao cruzamento inicial com ‘Fuji’, bem como herança expressiva do genoma de ‘Gala’, visto que a dissimilaridade entre ‘SCS426 Venice’ e ‘Galaxy’ ( $D_{ij}=0,323$ ) foi a segunda menor entre todas as combinações de genótipos avaliadas. Assim como ‘Fuji’, o cultivar ‘Gala’ é ancestral de segunda geração de ‘SCS426 Venice’, mas parece apresentar maior capacidade geral de combinação do que ‘Fuji’.

Ao considerar a análise conjunta de descritores morfoagronômicos e de marcadores moleculares (Figura 1C), verificou-se um padrão de resposta muito semelhante aos agrupamentos baseados unicamente nos marcadores moleculares. A estimativa do coeficiente de correlação cofenética foi de 0,93, indicando bom ajuste do método UPGMA à matriz original de dissimilaridade. Nessa análise, a dissimilaridade variou de 0,33 (‘SCS426 Venice’ e ‘M-10/09’) a 0,61 (‘Epagri 405 Fuji Suprema’ e ‘SCS417 Monalisa’), com média igual a 0,46. Ao analisar a correlação entre matrizes, verificou-se que as distâncias geradas a partir dos dados morfoagronômicos e dos marcadores moleculares apresentaram correlação de 0,35 (Tabela 3). Já as distâncias definidas pelo conjunto de caracteres (morfoagronômicos e moleculares) foram correlacionadas em 0,78 com as distâncias definidas pelos dados morfoagronômicos, e em 0,86

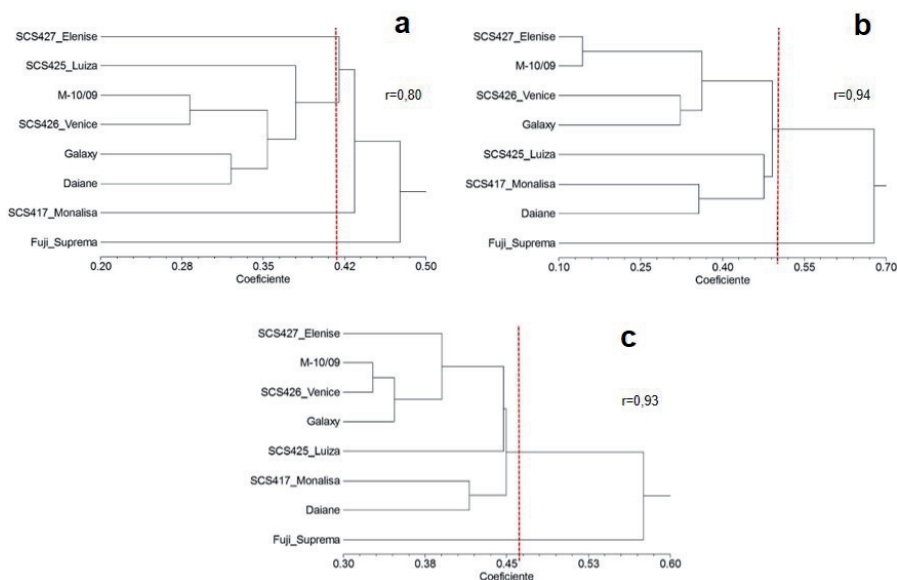


Figura 1. Dendrogramas de agrupamento entre genótipos copa de macieira pelo método UPGMA gerados a partir das matrizes de dissimilaridade definidas com base no uso de descritores morfoagronômicos (a), marcadores moleculares (b) e descritores morfoagronômicos e marcadores moleculares conjuntamente (c).  $r$  = coeficiente de correlação cofenética. A linha vermelha vertical representa a dissimilaridade média (0,41, 0,50 e 0,46, respectivamente) entre os genótipos e foi utilizada como ponto de corte para o dendrograma.

com as distâncias identificadas com base nos marcadores moleculares. Dessa forma, verifica-se forte contribuição dos marcadores moleculares na identificação da variabilidade genética entre os genótipos avaliados. A baixa magnitude da correlação entre as matrizes dos descritores morfoagronômicos e a de marcadores moleculares se dá pelo fato de os marcadores considerados poderem estar associados a outros caracteres que não os contemplados no conjunto de descritores considerados e/ou estarem associados a regiões intergênicas, não expressas.

O desempenho dos genótipos em cada descritor morfoagronômico é decorrente da constituição genética e do efeito do ambiente em sua expressão (*Fenótipo = genótipo + ambiente*) nas

condições de cultivo consideradas, com maior ou menor contribuição do ambiente dependendo da natureza genética de cada caráter (RAMALHO et al., 2008). Logo, apesar da maior capacidade aparente em discriminar a variabilidade genética entre genótipos, essa avaliação pode contribuir para muitos erros associados aos efeitos do ambiente e aos critérios adotados pelo avaliador na classificação dos genótipos nas diferentes classes pré-estabelecidas para cada descritor. No caso da macieira, esse problema é agravado pelo fato dos genótipos padrões adotados pelo SNP/Mapa (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2012) não serem tradicionalmente cultivados no Brasil, dificultando sobremaneira a caracterização por parte do ava-

liador. A vantagem dos marcadores moleculares é a possibilidade de acessar a variabilidade em nível de DNA. Apesar de possíveis erros associados às condições experimentais, marcadores SSR são conhecidos por apresentar resultados com alta repetibilidade e reprodutibilidade (JONES et al., 1997).

A exploração de técnicas como o sequenciamento de regiões específicas do genoma parece ser a técnica mais eficiente para a diferenciação entre genótipos de macieira, por ser capaz de identificar diferenças de uma base nitrogenada (GALLI et al., 2005; ORAGUZIE et al., 2005; SANSALONI, 2012). Esse tipo de alteração não é possível ou é extremamente difícil de ser identificada via eletroforese em gel de agarose ou de

Tabela 3. Características e eficiência de 12 iniciadores SSR (*Simple Sequence Repeat*) e respectivos marcadores adotados na análise dos genótipos de macieira

Iniciador SSR	Sequência 5' – 3'	Grupo de ligação	Total de marcadores	Intervalo de tamanho contendo os fragmentos avaliados (pb)	Total de marcadores polimórficos	Polimorfismo identificado (%)
CH04g10_F*	CAAAGATGTGGTGTGAAGAGGA	15	6	100-200	5	83,3
CH04g10_R*	GGAGGCCAAAAGAGTGAACCT					
CH05d11_F*	CACAACCTGATATCCGGGAC	12	9	150-200	4	44,4
CH05d11_R*	GAGAAGGTCGTACATTCCTCAA					
CH05e03_F*	CGAATATTTCACTCTGACTGGG	2	8	150-250	4	50,0
CH05e03_R*	CAAGTTGTGTACTGCTCCGAC					
CH02d08_F*	TCCAAAATGGCGTACCTC TC	11	14	200-400	10	71,4
CH02d08_R*	GCAGACACTCACTCACTATCTCTC					
CH02c11_F*	TGAAGGCAATCACTCTGTGC	10	10	200-300	5	50,0
CH02c11_R*	TTCCGAGAATCCTCTTCGAC					
CH01f02_F**	ACCACATTAGAGCAGTTGAGG	12	9	150-250	5	55,6
CH01f02_R**	CTGGTTTGTTCCTCCAGC					
GD12_F***	TTGAGGTGTTTCTCCATTGGA	3	9	100-250	5	55,6
GD12_R***	CTAACGAAGCCGCATTCTTT					
CH04c07_F*	GGCCTTCATGTCTCAGAAG	14	5	100-150	4	80,0
CH04c07_R*	CCTCATGCCCTCCAACA					
CH01h01_F**	GAAAGACTTGCAGTGGGAGC	17	8	100-150	4	50,0
CH01h01_R**	GGAGTGGGTTTGAGAAGGTT					
GD147_F***	TCCCGCATTCTCTGC	13	9	100-200	3	33,3
GD147_R***	GTTTAAACCGCTGTGCTGAAC					
Hi02c07_F****	AGAGCTACGGGGATCCAAT	1	5	100-150	1	20,0
Hi02c07_R****	GTTTAAAGCATCCGATTGAAAGG					
CH04e03_F*	TTGAAGATGTTGGCTGTGC	5	9	150-250	2	22,2
CH04e03_R*	TGCATGTCTGTCTCCTCCAT					
<b>Total (desempenho conjunto para os iniciadores SSR)</b>			<b>101</b>	<b>- x -</b>	<b>52</b>	<b>51,5</b>

\* Publicado inicialmente por Liebhard et al. (2002); \*\* Publicado inicialmente por Gianfranceschi et al. (1998); \*\*\* Publicado inicialmente por Hokanson et al. (1998); \*\*\*\* Publicado inicialmente por Fernández-Fernández et al. (2008).

poliacrilamida. No entanto, a técnica de sequenciamento tem a desvantagem de apresentar elevado custo, inviabilizando sua adoção na rotina de análises de variabilidade genética entre indivíduos.

## Conclusões

– As técnicas utilizadas para a caracterização da variabilidade genética permitem diferenciar os genótipos avaliados, sendo que o cultivar ‘Fuji Suprema’ foi o mais dissimilar.

– O uso de marcadores moleculares torna mais confiável a diferenciação entre genótipos em função da não interferência do ambiente nos resultados.

## Agradecimentos

À Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), Universidade do Estado de Santa Catarina (Udesc), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (Fapesc), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo fomento à pesquisa e financiamento de bolsas de estudo.

## Referências

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

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F.; EVANS, K.M.; CLARKE, J.B.; GOVAN, C.L.; JAMES, C.M.; MARIČ, S.; TOBUTT, K.R. Development of an STS map of an interspecific progeny of *Malus*. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v.4, n.3, p.469-479, 2008.

GALLI, Z.; HALÁSZ, G.; KISS, E.; HESZKY, L.; DOBRÁNSZKI, J. Molecular identification of commercial apple cultivars with microsatellite markers. **HortScience**, St. Joseph, v.40, n.7, p.1974-1977, 2005.

GIANFRANCESCHI, L.; SEGLIAS, N.; TARCHINI, R.; KOMJANC, M.; GESSLER, C. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.96, n.8, p.1069-1076, 1998.

GOWER, J.C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**, Arlington, v.27, n.4, p.857-871, 1971.

HIDRAS – HIGH-QUALITY DISEASE RESISTANT

APPLES FOR A SUSTAINABLE AGRICULTURE. HIDRAS SSRdb: complete list of SSR markers. Milano, 4 out. 2009. Disponível em: <<http://www.hidras.unimi.it/HiDRAS-SSRdb/pages/CompleteSSRtable.php>>. Acesso em: 25 out. 2017.

HOKANSON, S.C.; SZEWC-MCFADDEN, A.K.; LAMBOY, W.F.; MCFERSON, J.R. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* Borkh. core subset collection. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.97, n.5-6, p.671-683, 1998.

JACKSON, J.E. **The biology of apples and pears**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2003.

JONES, C.J.; EDWARDS, K.J.; CASTAGLIONE, S.; WINFIELD, M.O.; SALA, F.; VAN DE WIEL, C.; BREDEMEIJER, G.; VOSMAN, B.; MATTHES, M.; DALY, A.; BRETTSCHEIDER, R.; BETTINI, P.; BUIATTI, M.; MAESTRI, E.; MALCEVSKI, A.; MARMIROLI, N.; AERT, R.; VOLCKAERT, G.; RUEDA, J.; LINACERO, R.; VAZQUEZ, A.; KARP, A. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.3, n.5, p.381-390, 1997.

KITAHARA, K.; MATSUMOTO, S. Sequence of the S<sub>10</sub> cDNA from ‘McIntosh’ apple and a PCR-digestion identification method. **HortScience**, St. Joseph, v.37, n.1, p.187-190, 2002.

LIEBHARD, R.; GIANFRANCESCHI, L.; KOLLER, B.; RYDER, C.D.; TARCHINI, R.; VAN DE WEG, E.; GESSLER, C. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.10, n.4, p.217-241, 2002.

MACHADO, C.F.; JESUS, F.N.; LEDO, C.A.S. Divergência genética de acessos de maracujá utilizando descritores quantitativos e qualitativos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.37, n.2, p.442-449, 2015.

MAEHLER, M.; ROUSSEUW, P.; STRUYF, A.; HUBERT, M.; HORNIK, K.; STUDER, M.; ROUDIER, P.; GONZALEZ, J. **The cluster package**. Vienna: The R Foundation, 2017. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/cluster/cluster.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2017.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Proteção de cultivares no Brasil**. Brasília, DF: Mapa, 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Macieira frutífera (*Malus spp.*)**: novo formulário descritor. Brasília, DF: Mapa, 2012. Disponível em: <[agropecuarios/insumos-agricolas/protecao-de-cultivar/arquivos-frutiferas/MACA\\_FRUTIFERA\\_FORMULARIO\\_30OUT2012P.DOC>. Acesso em: 8 mar. 2018.](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-</a></p></div><div data-bbox=)

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

NEITZKE, R.S.; BARBIERI, R.L.; RODRIGUES, W.F.; CORRÊA, I.V.; CARVALHO, F.I.F. Dissimilaridade genética entre acessos de pimenta com potencial ornamental. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v.28, n.1, p.47-53, 2010.

OLIVEIRA, M.S.P.; FERREIRA, D.F.; SANTOS, J.B. Seleção de descritores para caracterização de germoplasma de açaizeiro para produção de frutos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.41, n.7, p.1133-1140, 2006.

ORAGUZIE, N.C.; YAMAMOTO, T.; SOEJIMA, J.; SUZUKI, T.; SILVA, H.N. DNA fingerprinting of apple (*Malus spp.*) rootstocks using Simple Sequence Repeats. **Plant Breeding**, Berlin, v.124, n.2, p.197-202, 2005.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P.; SOUZA, E.A.; GONÇALVES, F.M.A.; SOUZA, J.C. **Genética na agropecuária**. 4.ed. Lavras: Editora da UFPA, 2008.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.1. New York: Exeter Software, 2000.

SANSALONI, C.P. **Desenvolvimento e aplicações de DaRT (Diversity Arrays Technology) e genotipagem por sequenciamento (Genotyping-by-Sequencing) para análise genética em eucalyptus**. 2012. 100f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2012.

SILVEIRA, D.C.; BONETTI, L.P.; TRAGNAGO, J.L.; NETO, N.; MONTEIRO, V. Caracterização agromorfológica de variedades de milho crioulo (*Zea mays* L.) na região noroeste do Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia**, Cruz Alta, v.1, n.1, p.1-11, 2015.

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

VIEIRA, E.S.N.; VON PINHO, E.V.R.; CARVALHO, M.G.G.; SILVA, P.A. Caracterização de cultivares de soja por descritores morfológicos e marcadores bioquímicos de proteínas e isoenzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.31, n.1, p.86-94, 2009.

VIEIRA, M.L.C.; SANTINI, L.; DINIZ, A.L.; MUNHOZ, C.F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.39, n.3, p.312-328, 2016. ■