

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

MAPEAMENTO GENÉTICO EM POPULAÇÃO DE MAÇÃ (*Malus X domestica* Borkh) DE CARACTERES AGRONÔMICOS ASSOCIADOS À EXIGÊNCIA DE FRIO HIBERNAL

Carolina Tessele  
Engenheira Agrônoma/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia  
Ênfase Melhoramento e Biotecnologia Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Julho de 2012

## FOLHA DE HOMOLOGAÇÃO

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia por ter possibilitado a realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

À Embrapa Uva e Vinho por possibilitar recursos para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora, professora Carla Andréa Delatorre, pela amizade, ensinamentos, orientação, apoio e confiança nos últimos oito anos.

Ao pesquisador Luís Fernando Revers, meu coorientador, por seus ensinamentos, atenção, companheirismo e amizade.

À pesquisadora Ana Beatriz Costa Czermainski pelos ensinamentos, e por todo o apoio durante o último ano de mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia pelo conhecimento compartilhado.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia Marisa e aos funcionários do departamento de Plantas de Lavoura Alice, Fábio e Karine.

Aos pesquisadores e a equipe de apoio a pesquisa da Embrapa Uva e Vinho, em especial à Vanessa Buffon, pelo apoio e amizade. E ao pessoal do Laboratório de Fisiologia Vegetal, Cris, Diana, Daniel e Marcelo.

Ao Dr. Diogo Denardi Porto por sua colaboração, amizade e contribuições.

As 'minhas' bolsistas, Yohanna, Camila, Jaiana e Roberta, pela ajuda na realização das avaliações de campo e amizade. Aos bolsistas, Gustavo e

Pâmella, da Estação Experimental de Fruticultura Temperada (Embrapa/Vacaria).

Aos colegas do curso de mestrado/ doutorado e colegas de laboratório: Ana Paula, Ana Carolina, Adriana, Adriano, Catarine, Daniel, Danielle, Diovanni, Everton, Felipe, Juliano, Kelly, Martin, Taiguer, Thais, Thanise, Sibila, Silmara e Vitor (Embrapa).

Em especial as amigas Thanise, Ana Carolina, Kelly e Ana Paula pela amizade e apoio nas horas necessárias.

À minha amiga, Ana Paula Beck Brunetto, pelos conselhos, conversas, incentivo e apoio nos estudos.

Aos meus irmãos, aos quais devo tudo o que sou, Maria, Verônica, Aloísio e Silvana, por sempre me amar, apoiar e incentivar. Aos meus sobrinhos Pedro Enrico e Ana Júlia pelos momentos de alegria, e cunhado Régis pelo apoio.

Aos meus pais, Oniva e Arlindo (*in memoriam*) que sempre incentivaram e acreditaram que o estudo nos liberta...

# MAPEAMENTO GENÉTICO EM POPULAÇÃO DE MAÇÃ (*Malus X domestica* Borkh) DE CARACTERES AGRONÔMICOS ASSOCIADOS À EXIGÊNCIA DE FRIO HIBERNAL<sup>1</sup>

Autora: Carolina Tessele  
Orientadora: Carla Andréa Delatorre  
Coorientador: Luís Fernando Revers

## RESUMO

A macieira necessita de estímulo do frio para a queda das folhas ao final do ciclo, à dormência hiberna e a sua quebra desta. A não ocorrência adequada de frio no período do inverno resulta em brotação e florescimento irregular, resultando em desenvolvimento vegetativo e reprodutivo deficientes. Os objetivos deste trabalho foram de caracterizar indivíduos da população  $F_1$  para caracteres associados ao requerimento de frio hiberna como data de brotação e floração, construir um mapa genético de ligação em população clonal  $F_1$  e mapear QTLs associados a estes caracteres. Os genótipos da população  $F_1$  de estudo segregaram para os caracteres fenotípicos de brotação vegetativa e floração. Os mapas genéticos dos genitores 'M13/91' e 'Fred Hough' foram obtidos com 729 e 711 marcadores funcionais do tipo SNP, respectivamente. Dezesete grupos de ligação foram obtidos para cada genitor, cobrindo 1361 cM e 1066 cM para 'M13/91' e 'Fred Hough', respectivamente. As posições dos marcadores mapeados estão consistentes com o mapa consenso. Na extremidade do grupo de ligação 9, QTLs majoritários, possivelmente associados a fatores genéticos importantes para as características avaliadas, foram identificados nos mapas de ambos os genitores. Nesta região foram mapeados quatro marcadores genéticos significativamente ligados aos QTLs majoritários para brotação vegetativa e floração, explicando de 32,3% a 73,4% da variação fenotípica observada, respectivamente. Estes resultados sustentam a hipótese de que a extremidade do grupo de ligação 9 possui fatores genéticos associados ao controle do tempo de brotação e floração regulado pela exposição ao frio. Nesta região encontram-se genes de transcritos preditos com grande similaridade ao gene *Flowering Locus C* de *Arabidopsis thaliana*.

---

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (83p.) Julho, 2012.

# GENETIC MAPPING OF AN APPLE (*Malus X domestica* Borkh) POPULATION FOR AGRONOMIC TRAITS RELATED TO COLD REQUIREMENT<sup>1</sup>

Author: Carolina Tessele  
Adviser: Carla Andréa Delatorre  
Co-Adviser: Luís Fernando Revers

## ABSTRACT

Apple trees require cold stimulus for leaf shedding at the end of the growth cycle and for winter dormancy. The non-occurrence of the appropriate cold condition during the winter causes irregular sprouting and flowering, resulting in deficient vegetative and reproductive growth. This study aimed to characterize individuals from a F<sub>1</sub> population derived from 'Fred Hough' and 'M13/91' for cold requirement associated traits, like vegetative bud burst and flowering, to develop a genetic linkage map for both genitors and identify QTLs associated with these traits. The F<sub>1</sub> population showed segregation for time for vegetative sprouting and time for flowering. A total of 729 and 711 functional SNP type markers were used to generate a map for each parent. For both parents, 17 linkage groups were obtained; covering 1361 cM and 1066 cM for 'M13/91' and 'Fred Hough', respectively. The position of the SNP loci in the obtained maps is consistent with the genomic sequence. At the end of linkage group 9, major QTLs genetically associated with the agronomical traits evaluated were identified for both genitors. In this region of the linkage group 9, four SNP markers were significantly associated with the major QTLs for vegetative bud burst and time of flowering, explaining 32,3% to 73,4% of the total phenotypic variation observed. Our results demonstrate that the same region of linkage group 9 contains important genetic determinants for the control of time of bud burst and flowering. Moreover, assessing the genomic sequence in this region, two predicted transcripts with similarity to the Flowering Locus C from *Arabidopsis thaliana* were identified.

---

<sup>1</sup>Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (83p.) July, 2012.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1.1 Descrição da planta.....	6
2.1.2 Fenologia.....	8
2.1.3 Condições climáticas para a macieira.....	10
2.1.4 Dormência na macieira.....	13
2.1.5 Melhoramento genético da macieira.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Avaliação fenotípica.....	25
3.1.1 Caracteres avaliados.....	26
3.2 Extração e quantificação do DNA.....	28
3.3 Genotipagem em larga escala com SNPs.....	28
3.4 Mapeamento genético.....	29
3.5 Mapeamento dos QTLs.....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1. Análise fenotípica.....	32
4.2. Seleção dos marcadores.....	37
4.3 Mapa genético.....	38
4.4 Mapeamento de QTLs.....	50
4.4.1 QTLs identificados para data de brotação vegetativa.....	51
4.4.2 QTLs identificados para data de floração.....	57
4.4.3 QTLs identificados para 50 % de floração.....	58
4.4.4 Distribuição de frequências fenotípicas para os alelos de um locus associado .....	59
4.4.5 Genes candidatos.....	63
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	66
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
7 APÊNDICES.....	77

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Genealogia dos genitores 'M13/ 91' e 'Fred Hough' de maçã e o requerimento de frio (horas de frio) .....	25
2. Número de dias para brotação das testemunha, cv Fuji, nos campos experimentais de Bento Gonçalves-RS e Vacaria-RS, 2011 .....	33
3. Tipo de segregação e número de marcadores SNP analisados para a progênie do cruzamento dos genótipos de macieira 'M13/ 91' X 'Fred Hough' .....	36
4. Características dos mapas genéticos para os genitores 'M13/ 91' X 'Fred Hough' construídos com marcadores SNPs utilizando a estratégia do duplo-pseudocruzamento teste .....	39
5. Resumo da análise de QTL associados às características fenotípicas, para genitor paterno 'M13/91' da população F <sub>1</sub> para o pomar de Bento Gonçalves, 2011 .....	54
6. Resumo da análise de QTL associados às características fenotípicas, para genitor paterno 'M13/91' da população F <sub>1</sub> para o pomar de Vacaria, 2011 .....	55
7. Resumo da análise de QTL associados às características fenotípicas, para o genitor materno 'Fred Hough' da população F <sub>1</sub> para o pomar de Bento Gonçalves e Vacaria, 2011 .....	56
8. Teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para hipótese de independência entre categorias das variáveis fenológicas para Bud_Veg (Precoce, Intermediária e Tardia), Bud_Flo (Precoce, e Tardia) e ndFlo(50) (Floração Curta e Floração Longa) e classes de alelos, para Bento Gonçalves e Vacaria, por marcador cuja significância foi destacada nas tabelas 5, 6 e 7 pelo teste K* (Kruskal-Wallis) .....	61

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Gema apical de macieira no estágio de brotação, primórdios foliares indicados pela seta. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves-RS, 2011 .....	27
2. Frequências de brotação vegetativa da População F <sub>1</sub> de 'M13/91 X 'Fred Hough' no pomar de Bento Gonçalves (A) e Vacaria (B) – RS, para o período 2011/ 2012 .....	34
3. Frequências de floração da População F <sub>1</sub> de 'M13/91 X 'Fred Hough' no pomar de Bento Gonçalves (A) e Vacaria (B) – RS, para o período 2011/ 2012 .....	35
4. Mapa de ligação de <i>Malus X Domestica</i> Borkh dos genitores 'M13/91' e 'Fred Hough'. Os grupos de ligação (LG) de cada genitor estão indicados por M ('M13/ 91'), FH ('Fred Hough') e numerados conforme Maliepaard <i>et al.</i> (1998). Grupos homólogos estão indicados pelo alinhamento de marcadores comuns entres os mapas dos genitores identificados pela cor vermelha e ligados por linhas. O comprimento dos grupos de ligação é apresentado em ordem crescente de cima para baixo, à esquerda em cM (Kosambi) .....	41
5. Distribuição da frequência da progênie com relação aos alelos dos marcadores moleculares cuja significância foi destacada nas tabelas 5, 6 e 7 pelo teste K* (Kruskal-Wallis). Cada gráfico encontra-se indicado pelo respectivo marcador. BG – Bento Gonçalves; Vac – Vacaria; Veg – data de brotação vegetativa; Flo – data de floração; Flo(50) – data de 50 % de floração; nn x np, os marcadores segregando a partir de 'Fred Hough'; Im X Il, os marcadores segregando a partir de 'M13/91'; e hk x hk, os marcadores segregando para os dois genitores .....	62
6. Alinhamento das sequências proteicas dos modelos de genes cujos transcritos preditos possuem similaridade de sequência ao gene <i>Flowering Locus C</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtFLC). <i>FLC-like</i> de pera (acesso no GenBank BAI99733.1); MDP0000126259 - chr9 de macieira (início: 695589 pb - fim: 697096 pb); MDP0000167381- chr9 de macieira (início: 691905 pb - fim:	

695392 pb). Reproduzido com permissão de Porto *et al.*  
(comunicação pessoal) ..... 65

## 1 INTRODUÇÃO

O mais provável centro de origem da macieira encontra-se localizado na região entre o Cáucaso e o Leste da China. Acredita-se que o desenvolvimento das espécies atuais tenha iniciado após o final da última era glacial. O seu cultivo pelo homem remonta a milhares de anos.

A macieira é uma fruteira de clima temperado (FCT), que sofre estímulo do frio para a queda das folhas ao final do ciclo e à dormência hiberna. Para que um novo ciclo vegetativo e reprodutivo seja estabelecido é necessário um determinado acúmulo de frio intenso e regular. Entre as FCT, a macieira é considerada uma das mais exigentes em frio para a quebra da dormência das gemas. A não ocorrência adequada de frio no período do inverno resulta em brotação e florescimento irregulares, resultando em desenvolvimento vegetativo e reprodutivo deficientes.

As principais cultivares utilizadas nos centros produtores do Hemisfério Norte e da Região Sul do Brasil requerem um elevado número de horas de frio (temperaturas abaixo de 7,2°C), para que ocorra a quebra da dormência das gemas, obtendo-se, assim florescimento, brotação e frutificação normais. De maneira geral, as cultivares comerciais cultivadas no Brasil exigem, entorno de 800 horas de frio. Mas, com as mudanças climáticas ocasionadas pelo aquecimento global que tendem a contribuir

para um cenário desfavorável, projeta-se um aumento na temperatura da Região Sul entre 1,0 e 2,5°C até 2050, resultando em menor acúmulo de horas de frio. Estas mudanças exigirão cultivares cada vez menos exigentes em horas de frio hiberna para que a cadeia produtiva brasileira de maçã permaneça competitiva.

Atualmente, a produção de maçãs no Brasil permite a exportação da fruta. Na safra de 2008-09 a produção da fruta foi de 1.184,3 mil toneladas em uma área de 36,3 mil hectares, segundo dados do IBGE (2010). Em 2010, o Brasil exportou em torno de US\$ 55 milhões desta fruta (IBRAF, 2010). A Região Sul é a maior produtora de maçã do país, sendo os polos de Vacaria (RS), São Joaquim (SC) e Fraiburgo (SC) os mais adequados para o cultivo, devido às condições climáticas favoráveis, que possibilitam a produção de frutos com qualidade elevada.

As duas cultivares mais produzidas são a Fuji e a Gala, ambas altamente exigentes em frio. Há tendência de substituição destas por clones (mutações) com coloração mais acentuada de vermelho, que é associada, pelo consumidor, a uma maior qualidade dos frutos. Com o avanço do melhoramento genético foram desenvolvidas, no Brasil, cultivares comerciais com menor exigência de frio, como a cultivar Eva, desenvolvida pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), que necessita de 300 a 350 horas de frio para que a quebra de dormência ocorra naturalmente e, que é comercializada nos meses de dezembro e janeiro. Outras cultivares, como Daiane (resistente à mancha de Glomerela), Imperatriz (dupla finalidade – polinizadora e produtora) e Monalisa (resistente à sarna da macieira e com

pouco requerimento de frio) vem sendo introduzidas, porém ainda representam menos de 5% da área plantada.

Em espécies perenes, o uso de biotecnologia, associada ao melhoramento clássico, possibilita acelerar o desenvolvimento, reduzir a área necessária para avaliação e, por consequência, disponibilizar mais rapidamente aos produtores as novas cultivares que minimizem os riscos de produção.

Para permitir a transferência de genes envolvidos na redução do requerimento de frio para genótipos com qualidade agronômica, via transgenia ou seleção assistida, faz-se necessário o conhecimento dos mecanismos responsáveis pelo processo de dormência e do seu controle genético. Uma das alternativas para iniciar investigação neste sentido, é a construção de um mapa genético, que permitirá identificar as regiões genômicas potencialmente associadas a caracteres agronômicos relacionados ao requerimento de frio hibernal e contribuir para o desenvolvimento de marcadores moleculares como ferramentas adicionais na seleção de genótipos com menor requerimento em frio hibernal.

### Hipótese científica

- Locos de marcadores funcionais do tipo SNP podem estar localizados em regiões próximas de genes controladores do processo de dormência e, que se encontram associados a QTLs (*Quantitative Trait Loci*) com efeito sobre caracteres agronômicos associados ao requerimento de frio hibernal.

### Objetivo principal

Construir um mapa genético referência para identificação de QTLs associados a caracteres de interesse agronômico e com potencial para o desenvolvimento de marcadores moleculares para uso na seleção assistida de genótipos de maçã com melhor adaptação ao sul do Brasil.

### Objetivos específicos

- Construir um mapa genético de ligação em população clonal  $F_1$ , resultante do cruzamento entre genótipos de maçã com contraste para o caráter requerimento de frio hibernal.
- Mapear QTLs associados ao requerimento de frio hibernal em maçã.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A maçã é uma fruta de clima temperado cujo centro de origem é a região entre o Cáucaso e o Leste da China. Pertencente à família Rosaceae, agrupando 100 gêneros e mais de 2000 espécies (EPAGRI, 2006). As cultivares modernas são resultado da hibridização de *Malus sylvestris* com outras espécies de *Malus* (Harris *et al.*, 2002; Cornille *et al.*, 2012). A produção comercial da fruta é dominada por seis cultivares que correspondem por 50% da produção mundial, mesmo existindo mais de 7500 cultivares disponíveis no mundo (Way *et al.*, 1990; EPAGRI, 2006).

O Brasil encontra-se entre os vinte maiores produtores mundiais de maçã, a produção na safra de 2009/ 2010 segundo o IBGE (2011) foi de 1,3 milhões de toneladas. O rendimento médio por hectare foi de 33,1 toneladas em área colhida de 38,6 mil hectares. Na América Latina, o Brasil alterna a segunda posição no ranking, com a Argentina, sendo o Chile o principal produtor (FAO, 2010).

Os principais estados produtores de maçã são Santa Catarina, responsável por 59% da produção nacional, Rio Grande do Sul, responsável por 46% e Paraná com 4% da produção (IBGE, 2010). No Rio Grande do Sul a produção se concentra em 28 municípios com 608 produtores – que juntos totalizam área de 14,9 mil hectares. Os principais municípios são Vacaria,

com 6,9 mil hectares, Caxias do Sul, com 2 mil hectares, Bom Jesus, com 1,7 mil hectares e Muitos Capões, com 870 hectares (AGAPOMI, 2011).

### **2.1.1 Descrição da planta**

A macieira é uma espécie de fruteira lenhosa e decídua. Faz parte da subfamília *Pomoideae*, que se caracteriza por possuir um receptáculo profundo em forma de taça, cujas paredes inferiores se unem aos carpelos. Estes se unem e contem geralmente dois ovários. O fruto é um pomo, formado por um receptáculo carnudo que envolve os ovários, nos quais o endocarpo pode ser coriáceo ou pétreo e, na maior parte das cultivares, apresentam mais de uma semente (EPAGRI, 2006).

A maçã (*Malus X domestica*, Borkh) é uma espécie diplóide e o conjunto básico de cromossomos é  $n = 17$ . Entretanto, são encontradas variedades triplóides, tetraplóides e hexaplóides, que surgiram espontaneamente através de fertilização entre gametas não reduzidos (Huaracha *et al.*, 2004; Petri, 2002). O tipo de reprodução predominante é a alogamia, mesmo sendo considerada uma planta monóica – já que possui flores hermafroditas com gineceu e androceu viáveis. A polinização cruzada é necessária devido à autoincompatibilidade existente em muitas cultivares de macieira (Weirtheim & Schimdt, 2005), limitando a autofertilização de flores e diminuindo a frutificação. A autoincompatibilidade é determinada geneticamente pelos alelos-S, ocorrendo a inibição do desenvolvimento do tubo polínico quando o alelo-S do pólen for similar ao dos expressos no pistilo (Olmsted, 1989). A polinização é realizada por insetos (Petri, 2002).

A macieira é considerada uma planta de dias neutros para muitos dos seus processos como, por exemplo, para retenção da folha, que parece estar ligada à ausência de fotoperiodismo. Desta forma, a senescência e a abscisão da folha (na entrada do outono) supostamente são reguladas pelas baixas temperaturas e não sofrem influência do comprimento do dia (EPAGRI, 2006).

Na macieira todos os brotos têm origem nas gemas. Estas podem estar dispostas ao longo de brotos longos ou nos esporões; quanto à posição podem ser gemas apicais/ terminais (na ponta dos ramos) ou gemas laterais (na axila da folha). A formação das gemas apicais pode ser considerada uma continuação do eixo após o término do crescimento. O desenvolvimento das gemas laterais se dá a partir de pequenas secções do meristema apical que permanece nas axilas das folhas (Jackson, 2003).

O sistema de brotos na macieira é formado por brotos longos (maior que 20 cm), brindilas (entre 5 e 20 cm) e esporões (menor que 5 cm), (Segura *et al.*, 2007). Os brotos podem ser classificados em três tipos - brotos de lenho com gemas laterais de folhas (frequentemente terminados em gema mista), brotos auxiliares com uma a duas folhas formadas na mesma estação de crescimento e uma gema dormente, e brotos vegetativos longos desenvolvidos ao final da estação de crescimento com entrenós curtos e indumento (EPAGRI, 2006).

As flores de macieira se diferenciam e se desenvolvem dentro das gemas apicais dos esporões ou nas gemas apicais ou laterais dos ramos longos. A transição de gema vegetativa para mista ocorre apenas após a estrutura vegetativa da gema estar completa. Inúmeros fatores estão

envolvidos na proporção de gemas que deveriam dar origem a flores e que efetivamente dão. Estes fatores de controle podem envolver o equilíbrio hormonal (Hoad, 1984), a disponibilidade de nutrientes (principalmente carboidratos) (Sachs, 1977) e a interação destes (Ryugo, 1986).

As primeiras folhas a emergir em macieira são as das gemas presentes nos esporões (Forshey *et al.*, 1987). As demais folhas se desenvolvem nas brotações novas, nas gemas laterais, apicais e nos esporões. O número de folhas produzidas pela planta sofre redução sob estresse hídrico e deficiências nutricionais, e está vinculado ao controle hormonal.

### **2.1.2 Fenologia**

A fenologia é o estudo da ocorrência de eventos biológicos repetitivos e as causas destes em relação às forças seletivas bióticas e abióticas, assim como da sua inter-relação entre as fases caracterizadas por estes acontecimentos, dentro de uma espécie ou de várias espécies (Lieth, 1974).

O conhecimento da fenologia auxilia no entendimento da regeneração e reprodução das plantas. A partir da necessidade de detalhamento claro e objetivo das etapas de desenvolvimento das plantas surgiram os estádios fenológicos que compõem as escalas fenológicas. Atualmente, existem escalas fenológicas que são utilizadas para diversas espécies, e possibilitam a descrição e reprodução do ciclo da planta, por estádios bem caracterizados (Maia Rego *et al.*, 2007).

Meier e colaboradores (1994) desenvolveram uma chave para identificação e estabeleceram estádios fenológicos de crescimento para

macieira e pereira – *Pome fruit/ Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical Industry (BBCH) scales*.

A fenologia de uma espécie não é fixa, podendo ser alterada pelo efeito interativo entre fotoperíodo e temperatura. Uma mesma variedade pode alongar ou reduzir o ciclo dependendo das combinações de temperatura e fotoperíodo (Maia Rego *et al.*, 2007). Sendo assim, a fenologia de floração também é influenciada pelas alterações no ambiente, tais como a amplitude da estação chuvosa ou alterações de temperatura, mudanças que podem acontecer com relativa rapidez (Franks *et al.*, 2007).

Nas plantas, o desenvolvimento é afetado de forma direta pela temperatura do ar. Portanto, em locais ou épocas mais quentes, o desenvolvimento é mais rápido, resultando na precocidade das plantas. Quando a oscilação térmica anual for acentuada, muitas espécies perenes entram em dormência no período de inverno, para se proteger de temperaturas baixas (Maia Rego *et al.*, 2007). Somente após a ocorrência de uma determinada quantidade de horas de frio, há a liberação da dormência e retomada do crescimento.

No Brasil, a redução do número de horas de frio está sendo observada, por diversos grupos de pesquisa que trabalham com a hipótese de que isto terá um efeito sobre o padrão fenológico e a produtividade das espécies de clima temperado (Assad *et al.*, 2004). Em trabalho desenvolvido em Vacaria avaliando a influência da temperatura em cultivares de macieiras observou-se que a fenologia varia entre safras, sobretudo em função da temperatura do ar, sendo que o número de dias entre eventos fenológicos aumenta à medida que diminui a temperatura mínima do ar (Cardoso, 2011).

Em macieiras, quando a exigência de frio não é satisfeita, muitas gemas vegetativas e floríferas permanecem dormentes, mesmo que as condições ambientais sejam favoráveis ao crescimento (EPAGRI, 2006).

O tipo de porta-enxerto tem maior influência no vigor das plantas de macieira, mas outros fatores causam interferência. Esta influência pode ser sobre a planta como um todo ou sobre o vigor das suas diferentes estruturas de frutificação. No primeiro caso, ocorre por um desequilíbrio nutricional ou problemas físicos inerentes ao solo. Quando ocorre em ramos isolados, nas estruturas de frutificação, pode ser consequência de fatores ambientais como luminosidade e temperatura (Forshey, 1986).

### **2.1.3 Condições climáticas para a macieira**

A macieira por ser uma fruteira de clima temperado apresenta problemas na adaptação climática. O objetivo principal na busca por variedades mais adaptadas às condições climáticas do Sul do Brasil é por genótipos de baixo a médio requerimento de frio hibernal (entre 50 – 400 horas de frio), capazes de superar a dormência, juntamente com elevada exigência em horas de calor para o início da floração. Pois, as mudanças climáticas, ocasionadas pelo aquecimento global, tendem a contribuir para um cenário desfavorável. Projeta-se um aumento na temperatura da Região Sul entre 1,0 e 2,5°C até 2050, resultando em menor acúmulo de horas de frio. Essas novas cultivares seriam mais adaptadas aos invernos mais amenos e com flutuação de temperatura, mas não se mostram adequadas para longos períodos de armazenagem em câmaras frias (Pommer & Barbosa, 2009). Além disso, como os invernos, na Região Sul, são

marcados pela ocorrência de curtos períodos com temperaturas elevadas (conhecidos como veranicos), as cultivares com baixo requerimento de frio como a 'Anna' correm o risco de brotarem antes da primavera levando a perdas no pomar por geadas.

A medida de frio pode ser realizada de diversas maneiras, utilizando como base a temperatura de 7,2°C ou abaixo, proposta por Weinberger (1950) e Doorenbos (1953), ou acima, como sugerido por Erez & Lavee (1971).

Richardson *et al.* (1974), com base no trabalho de Erez & Lavee (1971), criaram um método atribuindo diferentes valores para cada temperatura, apresentando o método de Utah para ser utilizado na cultura do pessegueiro. O método considera que as temperaturas efetivamente funcionais para superação da dormência encontram-se entre 1,5° e 12,4°C, sendo a faixa ótima entre 2,5°C e 9,1°C. A adaptação do método de Utah por Shaltout & Unrath (1983) resultou no "Modelo Carolina do Norte" utilizado comumente na cultura da maçã. Neste modelo a faixa funcional está situada entre 1,6°C e 16,4°C, com pico máximo em 7,2°C.

Com base na teoria de que dois fatores são responsáveis pela floração em frutíferas caducifólias foi desenvolvido um modelo estatístico para determinar as unidades de frio e os graus-dia acumulados, sendo estes os fatores (Ashcroft *et al.*, 1977).

Os modelos de Utah e Carolina do Norte foram adaptados por Ebert *et al.* (1986) para as condições do Sul do Brasil. A adaptação consistiu em que as altas temperaturas resultassem da acumulação negativa de frio pelo

tempo decorrido de até 96 horas após o registro da última unidade positiva de frio.

As cultivares Gala e Fuji são as mais cultivadas devido as suas características de sabor e aparência, representam em torno de 95% da área cultivada com macieiras e são altamente exigentes de frio (IBRAF, 2010). Já, as cultivares Eva, Anna e Condessa se caracterizam por requererem menor quantidade de horas de frio (IAPAR, 2012; Ribeiro, P.A., 1985; Denardi & Camilo, 1998).

Para a produção econômica de maçãs é necessário que a quebra de dormência seja adequada, pois a produção de frutos está relacionada com o número de flores e o índice de área foliar. Nos locais em que não há um adequado acúmulo de frio durante o inverno, existe a possibilidade de ocorrer a assincronia entre o florescimento das cultivares produtoras e suas respectivas fornecedoras de pólen (Soltész, 2003). Diversos métodos químicos que utilizam reguladores de crescimento e compostos minerais são utilizados para quebra de dormência visando um florescimento adequado (Petri, 1997; Botelho & Müller, 2007; Mohamed, 2008). Dentre os diversos indutores de brotação disponíveis no mercado, os mais utilizados no sistema brasileiro de produção de maçãs são a cianamida hidrogenada ( $H_2CN_2$ ) e o óleo mineral (Petri *et al.*, 2006). Porém, a adoção da produção integrada de frutas para macieira e produção orgânica vem restringindo o uso de produtos químicos para a quebra de dormência. Já que, para esses sistemas de produção agrícola existem restrições ao uso de produtos industrializados. E, com a falta de alternativas para contornar a flutuação da temperatura nos

invernos amenos, tem-se um grande limitador para a manutenção da produção sustentável e exportação do produto (Sanhueza *et al.*, 2003).

#### **2.1.4 Dormência na macieira**

As características genéticas da dormência podem ser controladas por fatores intrínsecos na gema (endodormência), por fatores da planta - mas fora da gema (paradormência) e por fatores ambientais (ecodormência) (Lang *et al.*, 1997).

Os dois fatores ambientais que induzem mudança de paradormência (dormência de verão ou inibição correlativa) para endodormência (dormência de inverno ou de descanso) em gemas e, simultaneamente o início da aclimação ao frio, são a redução do fotoperíodo e da temperatura. Na estação de inverno, as gemas passam de endodormentes para ecodormentes (dormência imposta ou quiescência) e os tecidos vegetais se encontram mais resistentes ao frio (Nissila & Fuchigami, 1978). Com o início da primavera as temperaturas se elevam, estas mudanças resultam na saída da dormência e retorno do crescimento nos tecidos das plantas. Assim, um ciclo consecutivo de entrada e saída da dormência no ciclo de uma planta lenhosa de crescimento anual (Fuchigami *et al.*, 1982) é sobreposto no desenvolvimento sazonal e conseqüente perda de resistência a frio.

A entrada em dormência na macieira é um mecanismo para sobrevivência em baixas temperaturas, pois durante este período as atividades metabólicas são reduzidas. Para que na primavera a planta inicie um novo ciclo vegetativo, faz-se necessária a exposição a um determinado período com baixas temperaturas – para o acúmulo necessário de frio. A

intensidade e regularidade de baixas temperaturas são essenciais, já que se ocorrer oscilação durante este período pode ocasionar uma dormência prolongada ou brotação e floração desuniformes (Cook & Jacobs, 2000). Em macieira, a suspensão do crescimento e indução da dormência não estão relacionadas ao fotoperíodo, mas à temperatura (Heide & Prestrud, 2005).

Labuschagne e colaboradores (2002a) obtiveram como resultado no estudo da dormência em macieiras na África do Sul, região com condições climáticas similares as do Sul do Brasil, que sem aplicação de produtos químicos para quebra da dormência, a necessidade de frio das cultivares não foi satisfeita. Estas apresentaram sintomas de dormência prolongada - que incluíam descanso prolongado, brotação dessincronizada e redução da ramificação.

A dominância apical é um dos processos reponsáveis pela inibição do desenvolvimento do meristema vegetativo, sendo imposta pelas folhas em gemas auxiliares. A desfolha no período do verão resulta em floração em pessegueiros (Lloyd & Couvillon, 1974). Estes processos são conhecidos como inibição correlativa, que é externa e, geralmente, ocorre a certa distância a partir do meristema inibido. Este mecanismo de inibição apresenta implicações para os fatores morfogenéticos que determinam a estrutura de árvore (Champagnat, 1983).

O principal mecanismo de controle da dormência em gemas, no período correspondente ao verão e início do outono, é a inibição correlativa, quando estas se encontram paradormentes (Lang, 1987). Durante este período a brotação das gemas pode ser estimulada se a fonte de inibição correlativa for removida. Já, no período correspondente ao inverno (maio,

junho e julho no hemisfério sul), é necessário um estímulo maior para a superação da dormência nas gemas, pois estas se encontram em endodormência. Após o acúmulo de frio hibernar, as gemas podem, mais uma vez, serem induzidas à brotação sob condições ambientais propícias ou controladas. A manutenção da dormência a campo é devido às temperaturas baixas, com o aumento destas ocorre a saída da ecodormência que no hemisfério sul corresponde ao período de agosto e setembro. Com base em estudos realizados - a interação entre esses três tipos de dormência se sobrepõem no tempo e pode envolver mecanismos em comum.

Um dos tipos de inibição correlativa é a dominância apical, na qual as gemas laterais dormentes utilizam muito pouco dos recursos da planta. Se a porção apical de um broto for retirada por animais, ou se um ramo for quebrado ou podado, as gemas laterais são liberadas da dormência e crescem novos ramos. Então, as gemas mais próximas da gema apical removida brotam, e rapidamente a dominância apical é restaurada. Este processo tem a função de conservar as fontes de fotoassimilados através da reposição da área fotossinteticamente ativa. Barlow & Hancock (1960, 1962) comprovaram que com a remoção de folhas novas, ou do ponteiro, as gemas laterais brotam. A retirada de parte do tecido ou anelamento do caule (casca e câmbio), acima de uma gema lateral, promove a brotação desta (Greene & Autio, 1994). Faust (1989) observou que ao vergar um ramo horizontalmente promove-se a brotação das gemas laterais da porção superior do ramo. Nestes casos, a translocação de fitohormônios,

especialmente auxinas, e a velocidade de transporte de assimilados no ramo estão envolvidos no controle da dormência.

As cultivares de maçã apresentam grande diferença no grau de dominância apical. No trabalho de Volz *et al.* (1994), as plantas da cultivar Fuji, que não receberam tratamento para quebra de dormência, ramificaram menos que as cultivares Braeburn ou Gala. Mas, quando as três cultivares receberam tratamento com hormônios, a ramificação foi similar. No entanto, cultivares com baixo requerimento de frio, como Anna, não apresentam evidência direta que possuam dominância apical menor que as com elevado requerimento de frio (Faust *et al.*, 1995).

Os determinantes genéticos da dormência e as características afins, tal como tempo de brotação vegetativa inicial, ainda necessitam de mais estudos para a compreensão dos seus mecanismos, e isso dificulta o melhoramento genético desses caracteres. Hauagge & Cummins (1991) em estudo sobre o requerimento de frio em macieira, estimaram a herdabilidade no sentido amplo para o período de dormência das gemas vegetativas em 43 clones que se desenvolveram sob condições simuladas de inverno subtropical em  $0,76 \pm 0,04$  (em 1986) e  $0,81 \pm 0,04$  (em 1987). Estes autores concluíram que o carácter baixo requerimento de frio na cultivar Anna é controlado por, pelo menos, um gene dominante e que genes menores interagem para modular os seus efeitos. Em cultivares com baixo requerimento de frio as gemas apresentam uma dormência menor.

O carácter tempo de brotação vegetativa inicial está relacionado com endodormência (Bradshaw & Stettler, 1995), mas várias outras características podem ser associadas com a dormência, tais como a posição

e número de brotos (gemas) e duração da brotação. O requerimento de frio hibernal é considerado, por diferentes autores, uma característica genética complexa - multigênica ou parcialmente controlada por múltiplos genes (Dennis, 1987; Howe *et al.*, 2000; Frewen *et al.*, 2000). A variação genética para necessidade de frio foi investigada por Labuschagné *et al.* (2002b), para o tempo de brotação, reprodutivo e vegetativo, a herdabilidade no sentido amplo foi em média de 75% e 69%, respectivamente - indicando alto grau de determinação genética.

### **2.1.5 Melhoramento genético da macieira**

O melhoramento genético da macieira tem como principais objetivos a busca por maior produtividade, sabor, aparência, tolerância ao armazenamento e resistência a doenças. Muitos anos de pesquisa são necessários para o desenvolvimento de uma nova cultivar de maçã. A macieira possui período de juvenilidade de quatro a dez anos (Visser, 1967), o que torna longo o período de seleção, já que características produtivas só podem ser avaliadas após o término deste período (Janick *et al.*, 1996). No entanto, Sestras e colaboradores (2010) desenvolveram um estudo com híbridos de maçã resultantes do cruzamento de cultivares comerciais com espécies silvestres (*Malus coronaria*, *M. floribunda*, *M. niedzwetzkyana*, *M. Zumie M. Prunifolia*) que apresentaram período de juvenilidade de 6 a 9,3 anos.

Visser (1970) observou na seleção de plântulas de macieira para a característica vigor – as que tiveram maior vigor inicial apresentaram posteriormente maior eficiência para reprodução, reduzindo o tempo em

todas as etapas – desde o viveiro até a propagação das árvores. E, a probabilidade de encontrar variedades precoces aumentou dentro deste grupo.

Nos programas de melhoramento de maçã, o período de juvenilidade determina o número de anos necessários até que os genótipos, resultantes dos cruzamentos, possam ser avaliados para os objetivos específicos. O que, resulta em uso de espaço e custo de mão de obra elevados. Por isso, a adoção de ferramentas de biotecnologia, que permitam reduzir o tempo para seleção de novas cultivares de maçã e dinamizem este processo, é necessária. Assim, tem-se procurado utilizar a seleção assistida por marcadores moleculares, visando reduzir o número de genótipos a serem mantidos até a idade produtiva (Maliepaard *et al.*,1998). Os marcadores moleculares são segmentos de DNA, identificados por técnica específica, que permitem diferenciar dois ou mais genótipos e possuem segregação mendeliana. Diversos marcadores moleculares que marcam uma região do genoma ligada a alguma característica de interesse agrônômico têm sido desenvolvidos, permitindo assim a seleção indireta das características de interesse, em gerações segregantes precoces. São também ferramentas úteis para detectar variações no genoma e representam estritamente a variação genética – sem influência do ambiente (Borém & Caixeta, 2009).

Nos programas de melhoramento de frutíferas, os marcadores representam uma ferramenta adicional, permitindo comparação entre indivíduos, identificação de duplicatas e classificação do germoplasma em grupos de interesse (Engelborhset *al.*, 1998). As avaliações são realizadas

antes do material ir para o campo, reduzindo os custos e tempo para produção de novas variedades nos programas de melhoramento genético.

Os marcadores moleculares têm sido utilizados no melhoramento genético de frutíferas para caracterização de germoplasma, estudos de diversidade genética, construção de mapas genéticos, mapeamento de QTLs e auxílio na seleção (Kijas *et al.*, 1995; Crouch *et al.*, 1998; Cipriani *et al.*, 1999; Ulanovsky *et al.*, 2002; Silfverberg-Dilworth *et al.*, 2006; Durel *et al.*, 2007; Segura *et al.*, 2007; Igarashi *et al.*, 2008; Richards *et al.*, 2008; Cavana *et al.*, 2008; Segura *et al.*, 2008; Segura *et al.*, 2009; Cabrera *et al.*, 2009; Moriya *et al.*, 2009; vanDyk *et al.*, 2010; Moriya *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2010; Guitton *et al.*, 2011).

Dentre os tipos disponíveis de marcadores moleculares, os microssatélites (SSR), que foram descritos por Hamada e colaboradores (1982), são sequências formadas por um até seis nucleotídeos, repetidas em cadeia (*tandem*) e flanqueadas por regiões conservadas nos genomas. Essas regiões repetitivas representam regiões consideradas instáveis do genoma, que se encontram sob alterações causadas por mutações a taxas mais elevadas que as observadas em sequências não repetitivas. Por serem marcadores altamente polimórficos e multialélicos são úteis nos estudos de genética. As diferenças existentes nos alelos são decorrência das repetições distintas que ocorrem ao acaso, resultado do *crossing over* desigual ou devido ao escape momentâneo da DNA polimerase (*DNA polymerase slippage*) durante a replicação da molécula de DNA (Liebhard *et al.*, 2003).

Os marcadores moleculares do tipo SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) pertencem a uma categoria de marcadores moleculares

desenvolvida pela conversão de um determinado marcador em outro. Proposto por Paran & Michelmore (1993), SCAR é a conversão de marcadores do tipo “Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso” (RAPD – *Random Amplification of Polymorphic DNA*), gerados através de *primers* curtos não específicos (8 a 12 nucleotídeos), em marcadores de sequência específica, isto é, a conversão de um determinado amplicon com baixa reprodutibilidade, ou difícil de ser interpretado, em um marcador fidedigno. Isto ocorre devido ao maior tamanho dos *primers* (16 a 24 nucleotídeos) e à temperatura de pareamento (mais adstringente - amplificando bandas únicas no genoma). Este tipo de marcador pode conter sequências de DNA repetitivo e ser usado tanto como pontos de referência física quanto como marcadores genéticos (Paran & Michelmore, 1993).

Os marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) são baseados na detecção de polimorfismos decorrentes da alteração de uma única base no genoma – A, T, C ou G. São de natureza bi-alélica, decorrente de mutação em uma única base, e devem apresentar frequência de no mínimo 1 % na população. Quando não é possível estimar essa frequência o SNP é chamado de putativo, sendo encontrados tanto nas regiões expressas quanto nas não-expressas. O sequenciamento de cerca de 85% do genoma da cultivar Golden Delicious de macieira resultou na descoberta de milhares de polimorfismos de DNA, cerca de 4,4 SNPs por quilobases (kb) (Velasco *et al.*, 2010). Já, outros estudos indicam a ocorrência de um SNP a cada 149 pb dentro de sequências codificantes de ‘Royal Gala’ (Chagné *et al.*, 2008) e, um SNP a cada 52 pb no germoplasma de *Malus* (Micheletti *et al.*, 2011). Diferentemente de outros marcadores, os SNPs

quando utilizados para genotipagem não se baseiam no comprimento dos alelos, e seu reconhecimento pode ser automatizado (Giordano *et al.*, 1999).

O desenvolvimento de consórcios internacionais, como *Durable Apple Resistance in Europe* (D.A.R.E.) e *High-quality Disease Resistant Apples for a Sustainable Agriculture* (HiDRAS) e a colaboração entre grupos de pesquisa, para dinamizar o conhecimento da genômica estrutural e funcional na maçã, resultou na disponibilidade de marcadores microssatélites, na geração de mais de 324 mil sequências expressas de DNA (ESTs), na predição de mais de 23731 Unigenes e 110 UniSTS, na identificação de mais de 1880 proteínas e no projeto de sequenciamento do genoma pelo IASMA Research Center (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Estes esforços resultaram em metodologias, como o chip RosBREED\_Apple\_10k, que levarão a avanços significativos na seleção assistida por marcadores moleculares e na identificação de genes e QTLs associados a fenótipos de interesse agrônômico, permitindo que a macieira constitua um modelo de fruta climatérica para estudos de adaptação às mudanças sazonais (dormência e vernalização) e dos efeitos sobre a produtividade.

O termo QTL é utilizado para nominar as regiões cromossômicas (locos) que controlam os caracteres quantitativos (Falconer & Mackay, 1996). Os mapas genéticos, ou mapas de ligação, são representações gráficas da localização relativa de segmentos de DNA e/ou caracteres fenotípicos nos cromossomos de uma espécie, determinada pela frequência de recombinação destes marcadores ou caracteres em uma população segregante. O conhecimento de informações, como a localização dos QTLs nos grupos de ligação, caracterização e quantificação de seus efeitos,

número de locos associados a determinado caráter e distribuição no genoma permitem o estudo das suas heranças, ajudando no aperfeiçoamento dos métodos de seleção e melhoramento (Vieira *et al.*, 2006).

Os mapas genéticos, além de possibilitar o estudo e a localização dos QTLs e a determinação de seus efeitos, permitem a pesquisa em diferentes áreas, tais como, o conhecimento da estrutura do genoma, a clonagem de blocos de genes de interesse e o estudo de sintenia em espécies relacionadas (Liu, 1998). As etapas para a construção de um mapa de ligação envolvem a escolha dos genitores para cruzamento (maior polimorfismo genético), o desenvolvimento de uma progênie segregante, obtenção de marcadores contrastantes entre os genitores com segregação mendeliana na população de mapeamento e estabelecimento da ordem dos marcadores e da distância entre eles.

O recente sequenciamento do genoma da macieira por um grupo de 86 cientistas liderados por Velasco (2010) possibilitará a identificação de genes quando QTLs forem identificados. Já foram identificados QTLs para as características de crescimento, qualidade de fruto, pragas e doenças. Os genes *Rvi6* e *Rvi2* foram associados à sarna em macieira por Bus *et al.*, (2002), e dois marcadores encontram-se associados com os genes *ACS1* e *ACO1* para firmeza da polpa/ amolecimento (Oraguzie *et al.*, 2004; Zhu & Barritt, 2008).

Para o mapeamento de espécies perenes são necessárias estratégias que requeiram o desenvolvimento de poucas gerações (reduzindo o tempo necessário na formação da população), já que possuem um ciclo de vida longo. O mapeamento genético deve ser realizado em população  $F_1$ , que

deverá possuir um alto grau de segregação para a característica de interesse, pelo método duplo pseudo-cruzamento teste (Grattapaglia & Sederoff, 1994). Este é o método mais utilizado para espécies perenes e de polinização aberta, como no caso da macieira.

Esse método consiste na geração de progênie (irmãos completos) resultante do cruzamento entre plantas altamente heterozigotas. A progênie é equivalente a de um cruzamento teste para cada um dos locos que for heterozigoto em um pai e homozigoto em outro, segregando na proporção 1:1 para estes locos. A confirmação é posterior tanto no genótipo parental quanto na progênie segregante. Sendo que um dos genitores é utilizado como testador pela possibilidade de apresentar homozigose para o loco sob análise, e se estabelecem duas análises - uma para cada genitor gerando dois mapas que podem ser unidos posteriormente (Vieira *et al.*, 2006).

A eficiência da construção do mapa de ligação genética pelo método duplo pseudo-cruzamento teste depende do valor de heterozigose genética na espécie e da quantidade de polimorfismo detectado entre os genótipos pelos marcadores genéticos utilizados (Cervera *et al.*, 2001).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a avaliação de caracteres associados ao requerimento de frio foi utilizada uma população  $F_1$ , originada do cruzamento entre 'M13/91' e 'Fred Hough' (Tabela 1) e desenvolvida pelo programa de melhoramento da Epagri - Estação Experimental de Caçador em 2007, localizada no município de Caçador – SC, latitude 26°42'32" sul, longitude 51°00'50" oeste e altitude de 960 metros. O cruzamento foi feito em 2003, as sementes foram germinadas durante o outono/ inverno de 2004 e os *seedlings* foram transplantados para viveiro no inverno de 2005. Os genótipos foram enxertados sobre porta-enxerto M9 em abril de 2009. Este se caracteriza por adequado controle do vigor da planta, capacidade de induzir índice de frutificação rapidamente, ótima produtividade e produção de frutos de melhor qualidade. A enxertia foi realizada na sede da empresa Lazzari no município de Vacaria – RS, onde as plantas permaneceram na câmara fria pelo período de 90 dias. Após, foram plantadas no pomar da mesma, sendo transferidas para os pomares definitivos em agosto de 2010, quando foram estabelecidos os pomares em duas áreas experimentais da Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves e em Vacaria – RS (Apêndice 1).

TABELA 1. Genealogia dos genitores 'M13/ 91' e 'Fred Hough' de maçã e o requerimento de frio (horas de frio  $\leq 7,2^{\circ}\text{C}$ ).

<b>Genótipos</b>	<b>Genealogia</b>	<b>Requerimento de frio</b>
M13/ 91	Mollie's Delicious/ Princesa	até 450
Fred Hough	NJ-76/Coop-14	550 a 600

Concordante às características genéticas dos genitores, era esperado que a população para mapeamento, dentre muitas outras características, segregasse também para requerimento de frio.

A população estabelecida nos campos experimentais foi composta por 163 genótipos em Bento Gonçalves e 127 genótipos em Vacaria. A diferença no número de genótipos nos campos deve-se a falhas nas enxertias. Mesma razão pela qual os genitores também não se encontram nos campos experimentais, mesmo tendo sido realizadas duas tentativas em anos subsequentes. No ano de 2011, foi obtido sucesso, porém sem tempo hábil para o plantio do pomar definitivo. Como os genitores seriam utilizados na referência fenológica, isto não interferiu na prospecção dos QTLs.

### **3.1 Avaliação fenotípica**

A avaliação fenotípica foi realizada em plantas re-enxertadas, em 2009 para plantio em 2010 nos pomares experimentais da Embrapa Uva e Vinho, localizados no município de Bento Gonçalves-RS (Lat. 29° 09'S, Long. 51° 31'W e altitude de 640 metros) e Vacaria-RS (Lat. 28° 33'S, Long. 50° 57'W e altitude de 955 metros). As avaliações de campo foram realizadas durante a estação de crescimento de 2011/2012. No pomar de Bento Gonçalves-RS, durante o inverno de 2011, ocorreu um acúmulo de

474,15 horas de frio (HF) e no pomar situado em Vacaria-RS ocorreu um acúmulo de 885 horas de frio (HF) (Apêndice 2).

O manejo do solo seguiu as recomendações para a cultura da macieira. A aplicação de fungicidas e inseticidas foi realizada segundo recomendação técnica para controle de oídio, mancha de gala, sarna, pulgão e grafolita. As plantas não sofreram podas ou práticas de condução durante o período de coleta dos dados.

A ocorrência de cancro (*Cryptosporiopsis perennans*) nos ramos das plantas, nos dois pomares - Bento Gonçalves e Vacaria-RS, fez necessária a raspagem do tecido infectado no caule e nos ramos. Após, foi realizada a aplicação de pasta fungicida à base de benomyl + cobre + adesivo (tinta), na proporção de 3:1:5 conforme recomendação técnica.

### **3.1.1 Caracteres avaliados**

Os caracteres fenotípicos avaliados foram:

- Data de brotação vegetativa (Bud\_Veg): obtida através da anotação do dia, no qual o genótipo apresentava uma gema com ponta verde (C);
- Data de floração (Bud\_Flo): obtida pela anotação do dia, em que o genótipo apresentava a primeira gema mista com pontas verdes (C);
- Data em que o genótipo apresentou percentual de 50% (Flo50) de gemas mistas abertas.

Os pomares foram avaliados três vezes por semana, a partir de primeiro de agosto de 2011 (data zero) até 31 de janeiro de 2012. Para o pomar de Bento Gonçalves foram anotados três períodos de floração, já

para o pomar de Vacaria foram consideradas as datas da floração mais abundantes para o período de floração.

Para brotação vegetativa e florífera foi considerada a gema como brotada quando esta apresentava as primeiras folhas verdes conforme a Figura 1. A avaliação dos caracteres foram com base na escala fenológica da BBCH (Meier *et al.*, 1994) e na portaria nº 1 (2000) com os descritores de macieira do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.



FIGURA1. Gema apical de macieira no estágio de brotação, primórdios foliares indicados pela seta. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves-RS, 2011.

Os graus-dia foram calculados para o ano de 2011 a partir da data zero até janeiro de 2012, segundo a equação propostas por Vila Nova *et al.* (1972):

$$\text{GDA} = T_{\text{med}} - T_{\text{b}}, \text{ para } T_{\text{m}} > T_{\text{b}}$$

Sendo GDA: graus-dia acumulados a partir da data zero,  $T_{\text{med}}$  a temperatura média diária ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $T_{\text{m}}$  a temperatura mínima diária ( $^{\circ}\text{C}$ ), e  $T_{\text{b}}$  a temperatura base inferior ( $^{\circ}\text{C}$ ). Considerou-se como temperatura base inferior  $4,5^{\circ}\text{C}$ , sendo esta a temperatura necessária para o desenvolvimento de gemas de frutíferas temperadas (Richardson *et al.*, 1975).

### 3.2 Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico dos genitores e de 192 indivíduos da população foi extraído de folhas jovens, segundo metodologia modificada descrita por Lefort & Douglas (1999). A quantificação do DNA foi determinada em espectrofotômetro (GeneQuant<sup>pro</sup>, Amersham Biosciences®). A qualidade foi avaliada pelas razões  $A_{260}/A_{230nm}$  e  $A_{260}/A_{280nm}$  e em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL).

### 3.3 Genotipagem em larga escala com SNPs

Para genotipagem da população F<sub>1</sub>, com os marcadores tipo SNP, foi utilizado o chip RosBREED\_Apple\_10k fabricado de acordo com a tecnologia Infinium da Illumina, Inc (San Diego, Califórnia) e disponível publicamente para comercialização. O RosBREED\_Apple\_10k inclui 9.000 SNPs projetados para uso em germoplasma de macieira em escala mundial, desenvolvidos com base em 27 genótipos fundadores importantes de macieira e no genoma da cultivar Golden Delicious (Velasco *et al.*, 2010). O serviço de genotipagem para todos os indivíduos da progênie foi realizado pelo Laboratório de Análises Genéticas e Genotipagem, no Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia (ICBR) da Universidade da Flórida utilizando o protocolo descrito por Fan e colaboradores (2006).

As amostras de DNA genômico foram preparadas para envio na concentração de 50 ng µl<sup>-1</sup>, diluídas em 10 mM de Tris/ 1 mM EDTA. As amostras foram colocadas em microplacas para PCR convencional de 96

poços seladas, embaladas em caixa de isopor com gelo seco e enviadas por correio expresso.

A validação dos SNPs foi realizada pelo emprego do algoritmo desenvolvido para a Ferramenta R por Alencar & Pappas (comunicação pessoal) e os escores obtidos foram utilizados para a seleção final dos marcadores. Os escores variaram de 0 a 1, no qual marcadores com pontuação  $\geq 0,6$  são admitidos para uso em mapeamento.

Após análise dos locos polimórficos para os genitores, foi montada uma matriz com cada indivíduo da progênie, seguindo os critérios de codificação de família de irmãos completos (CP) do programa JoinMap® 4 – ‘M13/91’ (genitor paterno) x ‘Fred Hough’ (genitor materno): Im x II, os marcadores segregando a partir do genitor paterno; nn x np, os marcadores segregando a partir do genitor materno; e hk x hk, os marcadores segregando para os dois genitores; resultando em uma tabela de polimorfismos para todos os locos segregantes de cada genitor.

### **3.4 Mapeamento genético**

O mapa genético foi construído utilizando a estratégia do duplo-pseudocruzamento teste, conforme descrito por Grattapaglia & Sederoff (1994), utilizando-se o software JoinMAP® 4 (Van Ooijen, 2006). No decorrer da análise, os dados dos genitores foram mantidos em separado. Para verificar a segregação mendeliana 1:1 de cada loco, foi aplicado o teste de ajustamento de segregação (teste de aderência qui-quadrado ( $\chi^2$ )), sendo estabelecido um nível de decisão:  $\chi^2 \geq 15$ . Os locos que apresentaram um valor até o limite do  $\chi^2$  calculado de 15 foram incluídos nas análises, pois

nem sempre as taxas de recombinação são as mesmas em todo o genoma. Uma segunda análise foi realizada com os locos presentes em ambos os genitores e, da mesma forma, aplicou-se o teste de ajustamento de segregação. Para os marcadores que segregaram na proporção 1:2:1 (tipo  $hk \times hk$ ) utilizou-se o mesmo valor de  $\chi^2$ . As marcas segregando 1:2:1 foram incluídas na geração dos mapas para ambos os genitores, pois permitem a identificação dos cromossomos homólogos e a possibilidade de integração dos mapas (Maliepaard *et al.*, 1998).

Valores de escores de LOD mínimo de 2,0 e máximo de 10, e frequência de recombinação de 0,4 foram utilizados para determinar os grupos de ligação (GL). As distâncias em centiMorgans (cM), foram obtidas pela função de Kosambi (1944). A melhor ordem para cada GL do mapa foi baseada na segunda de três tentativas de ordenamento geradas, exceto nos casos em que apenas um mapa foi gerado, ou quando resultou em dois mapas (selecionado o segundo). As posições dos marcadores tipo GDsnp\*\*\*\* foram confirmadas no mapa consenso da macieira (<http://www.rosaceae.org>). A representação gráfica dos mapas dos genitores e alinhamento dos cromossomos homólogos foi gerada pelo software MapChart (Voorrips, 2002).

### **3.5 Mapeamento dos QTLs**

Os conjuntos de dados fenológicos para data de brotação vegetativa, data de floração e floração da planta em 50%, foram utilizados para identificar regiões com potenciais QTLs. As regiões com possíveis QTLs foram identificadas utilizando-se inicialmente mapeamento por intervalo

simples (MI). Posteriormente, as marcas com maiores escores de LOD foram selecionadas como co-fatores para mapeamento de QTLs por múltiplo QTL restrito (rMQM - *restricted Multiple-QTL Model Building*). Os QTLs foram declarados significativos quando o LOD máximo, obtido após o mapeamento por rMQM, ultrapassou o LOD *threshold* do GL e do genoma (calculados com taxa de erro de 0,05 para mais de 1000 permutações relativas pelo teste de permutação). A significância dos QTLs identificados foi adicionalmente avaliada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Todas as análises para identificação de QTLs foram realizadas utilizando-se o pacote de softwares MapQTL 3.0 (Van Ooijen *et al.*, 2002).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Análise fenotípica

As horas de frio acumuladas no pomar de Bento Gonçalves (474,15 HF) foram superiores ao requerimento do genitor paterno 'M13/ 91' (até 450 HF), mas inferiores a do genitor materno 'Fred Hough' (550 a 600 HF) (Apêndice 2). A necessidade de frio em Vacaria foi suprida para os genitores já no mês de agosto ( $\pm 600$ HF), atingindo um acúmulo de 744 HF ao final deste mês (Apêndice 2).

Para o presente trabalho, os genitores não se encontravam plantados nos pomares, pois as enxertias não foram exitosas. Com base, no trabalho desenvolvido por Petri e colaboradores (2008) avaliando o comportamento fenológico de espécies polinizadoras para as cultivares Fuji e Gala, em Caçador-SC, a amplitude do período de floração predominantemente observada ficou entre 30/09 e 30/10. Dessa forma, os genótipos da população tiveram suas datas de brotação vegetativa e de floração comparadas com testemunhas da cultivar Fuji (alto requerimento de frio), presente em ambos os pomares (Tabela 2). Os indivíduos resultantes do cruzamento demonstraram segregação com alta variabilidade para requerimento de frio hibernal possibilitando seu uso para o estudo deste caráter.

A progênie, no pomar de Bento Gonçalves, apresentou o seguinte comportamento: dos 159 genótipos presentes no pomar, 74 apresentaram somente brotação vegetativa, 85 apresentaram floração – sendo que 9 floresceram antes de apresentarem brotação vegetativa. No pomar de Vacaria dos 116 genótipos presentes, 92 genótipos apresentaram brotação vegetativa e 24 genótipos tiveram floração antes da brotação vegetativa. Portanto, observa-se nos genótipos uma inconstância para o período de brotação entre os ambientes, isto pode estar relacionado ao estresse por déficit hídrico, a ocorrência de doenças durante o ciclo da cultura, ao acúmulo de frio e as reservas disponíveis para a planta.

TABELA 2. Número de dias para brotação da testemunha, cv Fuji, nos campos experimentais de Bento Gonçalves-RS e Vacaria-RS, 2011.

Local	Brotção vegetativa*		Floração*	
	Média	Desvio	Média	Desvio
Bento Gonçalves	71	8	61	8
Vacaria	51	1	69	2

\*Dias após data zero.

A análise das datas de brotação vegetativa para o pomar de Bento Gonçalves (período de 2011/ 2012) revelaram ausência de distribuição normal. No entanto, para o pomar de Vacaria, para o mesmo período, a progênie apresentou uma distribuição de frequência bimodal, apresentando dois picos, demonstrando boa representatividade da população, sendo que, a maioria dos genótipos brotou antes da testemunha, cultivar Fuji (Figura 2).

Na avaliação das datas de floração da progênie foram encontrados comportamentos distintos nos dois ambientes estudados. Em Bento Gonçalves, a população apresentou ausência de distribuição normal, com metade dos genótipos florescendo antes da testemunha cultivar Fuji. Em

Vacaria, a progênie apresentou distribuição normal, mas como nenhum genótipo floresceu aos 77 dias após a data zero, o gráfico apresenta uma depressão separando os genótipos em dois grupos. O primeiro grupo (primeiro pico) com data de floração precoce e o segundo grupo (segundo pico) tardio (Figura 3).

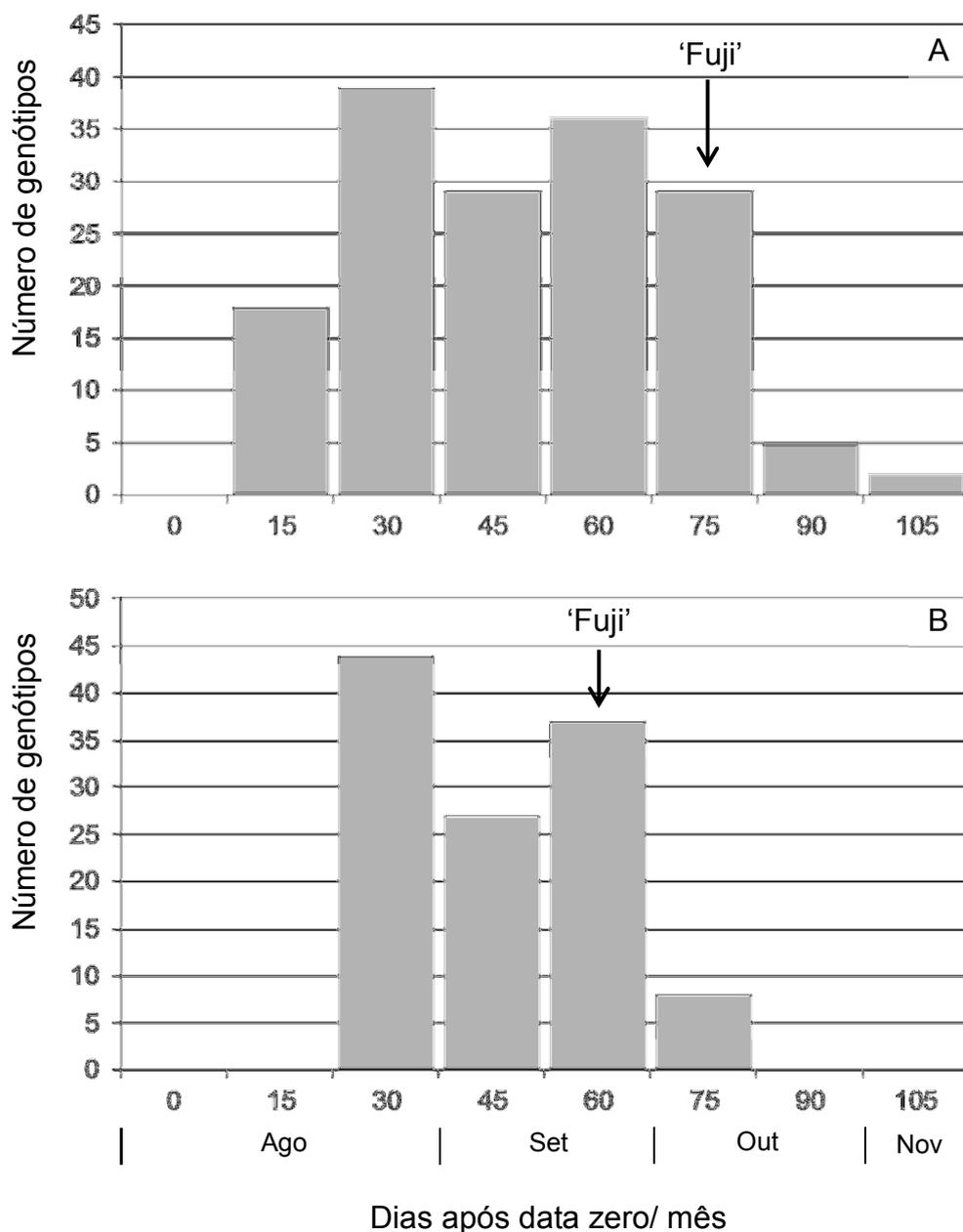


FIGURA 2. Frequências de brotação vegetativa da População F1 de 'M13/91' X 'Fred Hough' no pomar de Bento Gonçalves (A) e Vacaria (B) – RS, em 2011.

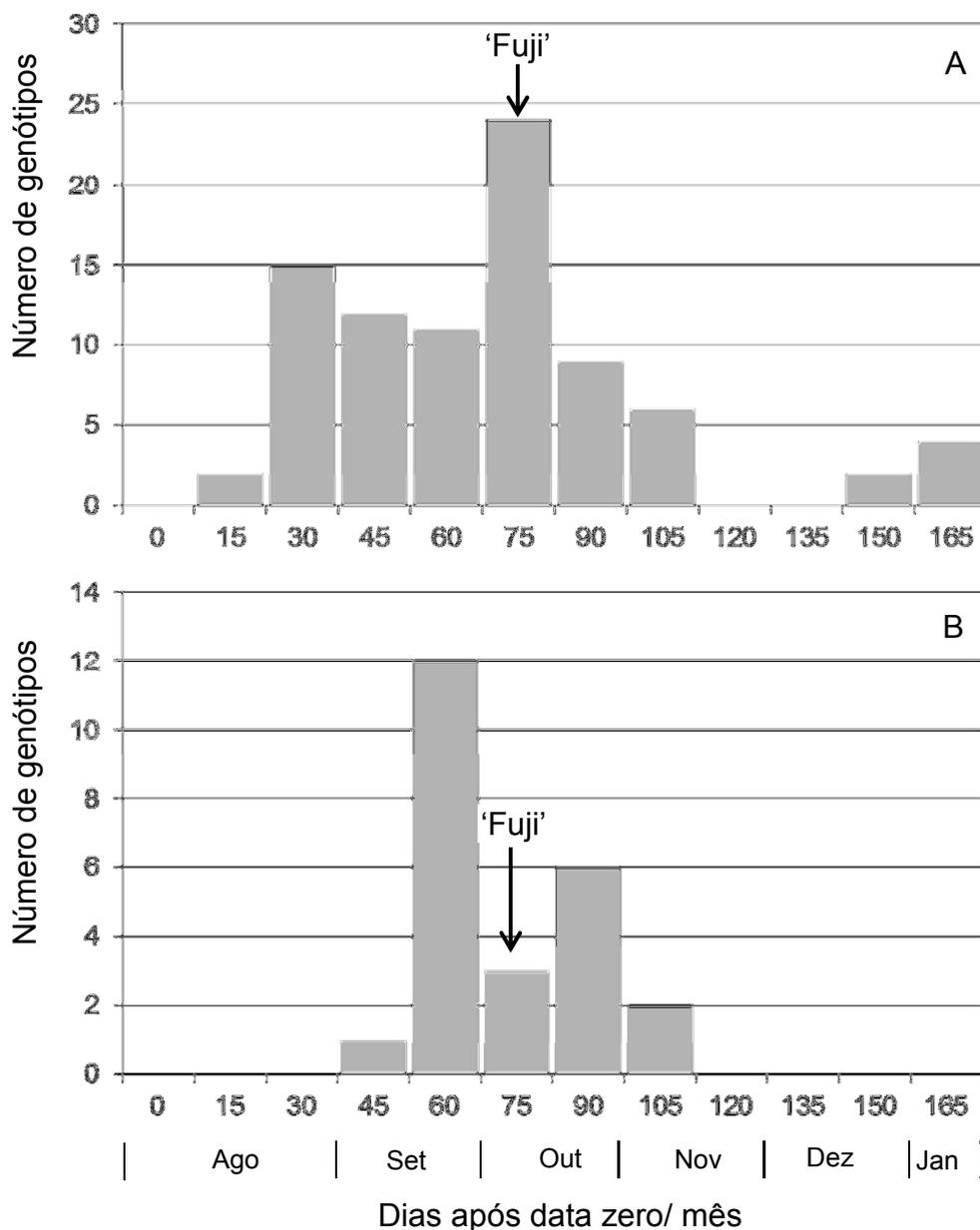


FIGURA 3. Frequências de brotação florífera da População F1 de 'M13/91' X 'Fred Hough' no pomar de Bento Gonçalves (A) e Vacaria (B) – RS, para o período 2011/ 2012.

A divisão dos genótipos em dois grupos – tardios e precoces, sugere um efeito genético sobre o comportamento fenológico. Hauagge & Cummins (1991) determinaram que o carácter de baixo requerimento de frio é controlado por, pelo menos, um gene dominante e que os genes menores interagem para modular os efeitos deste. Igualmente, Labuschagné *et al.*

(2002b) indicaram alto grau de determinação genética para os caracteres de tempo de brotação vegetativa e de floração.

Os resultados para data de brotação vegetativa indicaram antecipação para este carácter, uma vez que mais de 80% (Bento Gonçalves) e 69 % (Vacaria) dos genótipos brotaram antes da testemunha, cv. Fuji. Estes resultados indicam que nesta população é possível a seleção de genótipos com menor requerimento de frio que os genitores.

Tem sido demonstrado que, além do requerimento de frio para redução da endodormência, para a brotação e a floração de frutíferas temperadas requer a quebra da ecodormência, necessitando portando de uma determinada quantidade de calor (Citadin *et al.*, 2001). O cálculo do GDA foi realizado adotando a data zero como data inicial para ambos os ambientes, pois houve grande variação do período de queda de folhas na população F1 (Apêndice 5).

A soma térmica acumulada calculada em graus-dia foi de 580,25 GDA e 451,28 GDA a partir da data zero até 30/09/2011 para Bento Gonçalves e Vacaria, respectivamente, sendo este o período no qual a maioria dos genótipos brotaram. Em Bento Gonçalves, o primeiro genótipo apresentou brotação vegetativa com GDA de 12,18 e 308,65 HF e, em Vacaria de 132,41 GDA e 518 HF, o que sugere uma relação negativa entre o requerimento de frio e de soma térmica para brotação. Em pêssago não foi observado efeito do aumento de HF sobre o requerimento de calor para brotação (Citadin *et al.*, 2001). Em Bento Gonçalves mais da metade dos genótipos (82) brotaram em 14/09/2011 (44 dias), sendo o GDA de 388,91 e 468,45 HF, tendo atingido quase o total do acúmulo de frio (faltando 5:30

horas). Todos os genótipos haviam brotado em 31/10/2011 com GDA de 984,37. Metade dos genótipos de Vacaria brotaram até 09/09/2011 (40 dias) sendo o GDA de 265,41 e 744 HF, mas como o acúmulo de frio estendeu-se até outubro, todos os genótipos haviam brotado em 06/10/2011 com GDA 511,45 e  $\pm$  870 HF.

Quanto a floração, em Bento Gonçalves, os genótipos começaram a florescer com acúmulo de 135,78 GDA (362,75 HF), sendo que o maior número de genótipos floresceram com acúmulo de 783,87 GDA. Em Vacaria os genótipos começaram a florescer com 286,43 GDA (744 HF) e a maioria floresceu com acúmulo de 870,53 GDA.

Em Bento Gonçalves, onde o acúmulo de frio foi menor, os genótipos necessitaram de uma maior soma térmica para brotar, já para o ambiente de Vacaria onde o acúmulo de frio foi mais intenso necessitou-se menor GDA (Figura 3; Apêndice 2 e 4). Observa-se que ao final do período de brotação em Bento Gonçalves o acúmulo de GDA foi de 984,37 e para Vacaria foi de 511,45 GDA – próximo da metade do primeiro ambiente (Apêndice 4).

Conclui-se que o menor acúmulo de horas de frio, resulta em maior necessidade de soma térmica para a brotação das gemas dos genótipos. Resultado similar foi encontrado por Putti e colaboradores (2000) com cultivares de maçã Gala e Fuji, em ambiente controlado.

#### **4.2. Seleção dos marcadores**

O tipo de segregação e o número de marcadores SNPs provenientes do chip RosBREED\_Apple\_10k, utilizados para gerar o mapa de 'M13/ 91' X 'Fred Hough' encontram-se relacionados na Tabela 3.

TABELA 3. Tipo de segregação e número de marcadores SNP analisados para a progênie do cruzamento dos genótipos de macieira 'M13/91' X 'Fred Hough'.

Segregação	Tipo	SNPs
<hkxhk>*	1:2:1	521
<lmxll>**	1:1	713
<nnxnp>***	1:1	549
Total	-	1783

\*Marcadores segregando para ambos os genitores. \*\*Marcadores segregando a partir do genitor 'M13/91'. \*\*\*Marcadores segregando a partir do genitor 'Fred Hough'.

Do total possível de marcadores, 5191 apresentaram escore de *Gen Train* (GT)  $\geq 0,6$  para a progênie. Os marcadores monomórficos somaram 3336 e, outros 72 foram nulos para pelo menos um dos genitores ou para ambos, não sendo utilizados na geração dos mapas.

### 4.3 Mapa genético

No mapa molecular construído para o genitor materno 'Fred Hough', 66,45% dos marcadores (nn x np e hk x hk) foram incluídos. O mapa gerado apresentou 17 grupos de ligação (Figura 4), sendo que os grupos de ligação apresentaram de 17 a 69 marcadores e variaram em tamanho de 41 a 95 cM, com média de 63 cM em um mapa com cobertura total de 1066 cM. A distância média entre marcadores por grupo de ligação foi de 1,7 cM. O grupo com o maior número de marcadores foi GL 2. Para alcançar esses resultados foram utilizados 1070 marcadores SNPs na geração do mapa, sendo que 711 foram distribuídos em grupos de ligação, 207 não foram ligados a nenhum grupo e 152 não se posicionaram (Tabela 4).

O mapa molecular para genitor paterno 'M13/91' utilizou 59,08% do total dos marcadores (lm x ll e hk x hk). O mapa construído resultou em 17

grupos de ligação (Figura 4), apresentando de 20 a 69 marcadores, com variação de tamanho de 49 a 103 cM, média de 80 cM e com cobertura total de 1361 cM. A distância média entre marcadores por grupo de ligação foi de 2,0 cM. O grupo de ligação 2 apresentou o maior número de marcadores. Na construção desse mapa utilizou-se 1234 marcadores SNPs, sendo que 729 foram distribuídos em grupos de ligação, 254 não foram ligados a nenhum grupo e 251 não se posicionaram (Tabela 4).

TABELA 4. Características dos mapas genéticos para os genitores 'M13/ 91' x 'Fred Hough' construídos com marcadores SNPs utilizando a estratégia do duplo-pseudocruzamento teste.

<b>Características</b>	<b>'M13 /91'</b>	<b>'Fred Hough'</b>
Número de marcadores analisados	1234	1070
Número de marcadores mapeados	729	711
Número de marcadores não agrupados*	254	207
Número de marcadores não posicionados**	251	152
Número de grupos de ligação (GL)	17	17
Média de marcadores/GL	43	42
Número de marcadores/amplitude GL	20-69	17-69
Comprimento total (cM)	1361	1066
Comprimento médio do GL (cM)	80	63
Comprimento/amplitude GL (cM)	49-103	41-95
Distância média mapeada entre locos (cM)	2,0	1,7
Número de lacunas entre 10 e 20 cM	11	7
Número de lacunas > 20 cM	0	1

\*Não foram atribuídos a nenhum GL. \*\*Não utilizados por apresentarem conflitos de localização ou ligação insuficiente com outros locos.

O maior comprimento de região livre de marcadores (*gap*) foi de 40,8 cM no GL 5 para o genitor 'Fred Hough'. Para o genitor 'M13/91', 11 regiões de *gaps* foram identificadas, variando entre 10 e 20 cM (Tabela 4 e Figura 4).

Em macieira encontra-se um número significativo de mapas genéticos construídos a partir de diferentes cultivares e que apresentam tamanho superior a 1000 cM. Os mapas saturados com marcadores moleculares, tipo AFLP, RAPD, SSR e SCAR, para as cultivares Fiesta X Discovery, apresentam tamanho de 1144 cM e 1455 cM, respectivamente (Liebhard *et al.*, 2003), para 'Telamon' X 'Braeburn', 1039,3 cM e 1245,1 cM, respectivamente (Kenis & Keulemans, 2005), para 'Ralls Janet' X 'Delicious', 1082 cM e 1031 cM (Igarashi *et al.*, 2008), para 'Golden Delicious' X 'Anna', 1124,5cM e 1292,6 cM, para 'Sharpe's Early' X 'Anna', 1012,9 cM e 1050,6 cM, respectivamente (Van Dyk *et al.*, 2010), para Starkrimson X Granny Smith obteve-se comprimento de 1027 cM, já para o cruzamento das cultivares X3263 X Belrène o comprimento foi de 1068 cM (Celton *et al.*, 2011). Com base nos tamanhos desses mapas, concluiu-se que o tamanho encontrado para a população em estudo assemelha-se e confirma os encontrados na literatura.

Com relação ao número de grupos de ligação encontrados, foi confirmado o número de 17 cromossomos para macieira, corroborando os resultados encontrados por Maliepaard e colaboradores (1998), e dos mapas construídos na última década para macieira, bem como os resultados do sequenciamento do genoma da macieira (Velasco *et al.*, 2010).

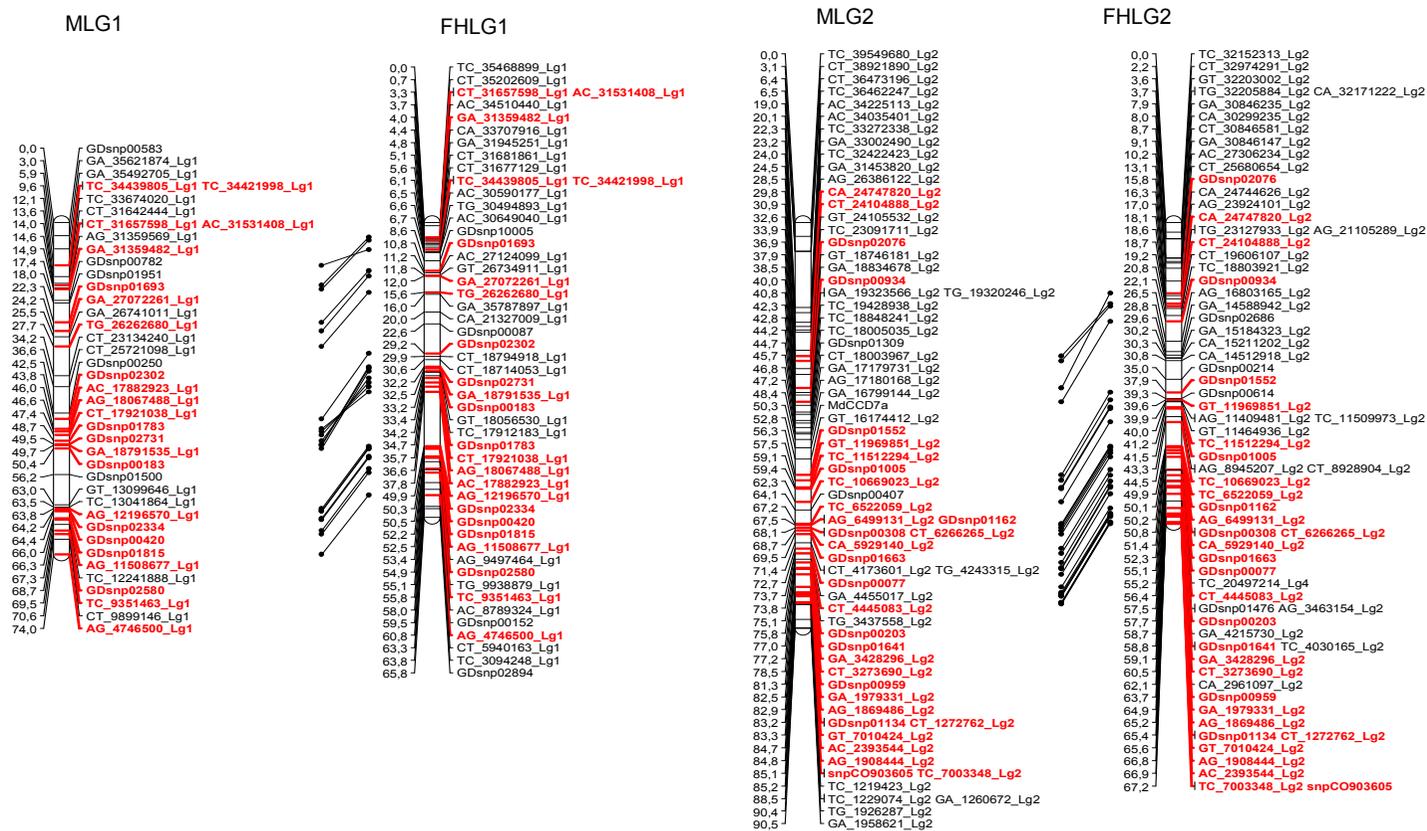
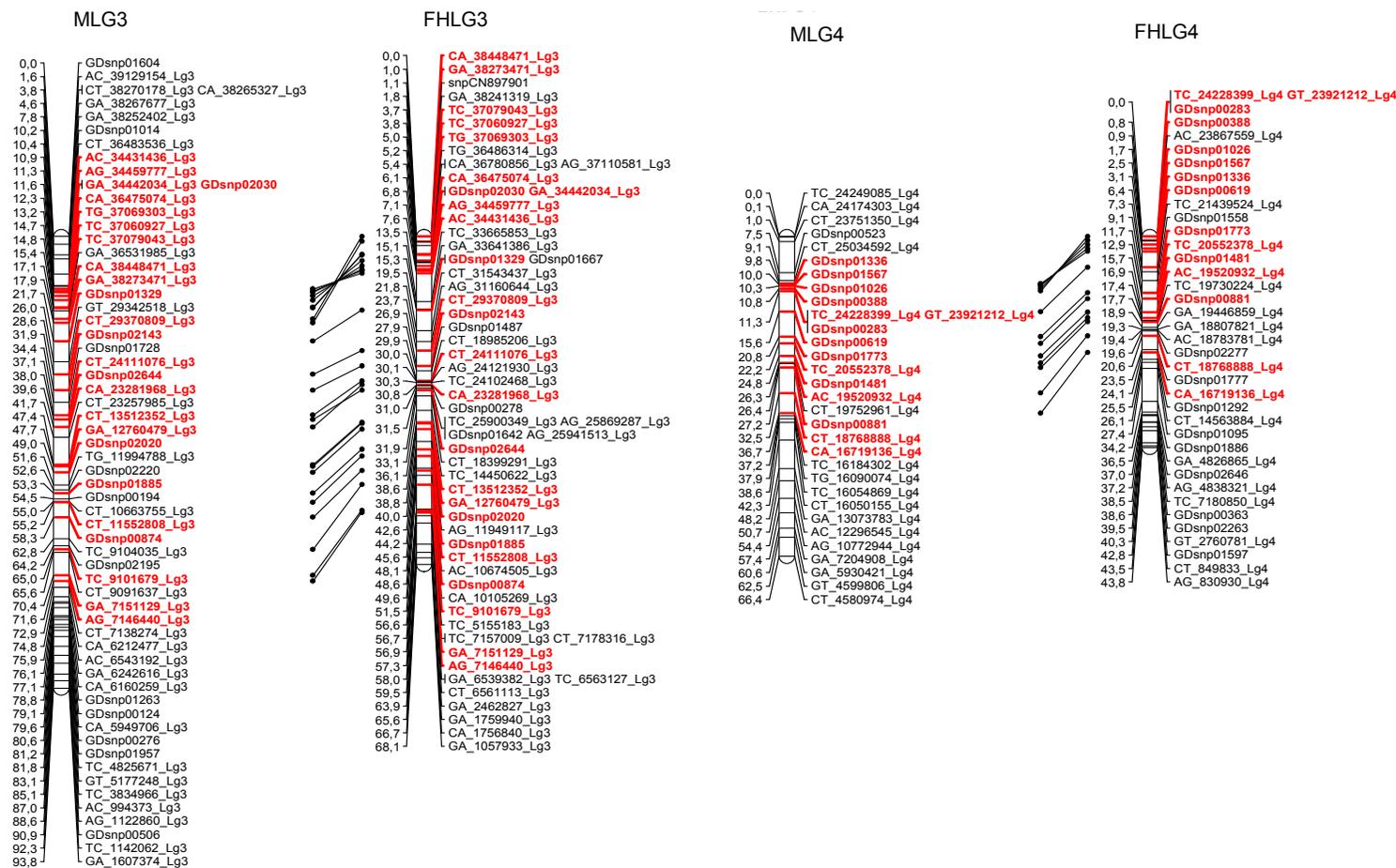
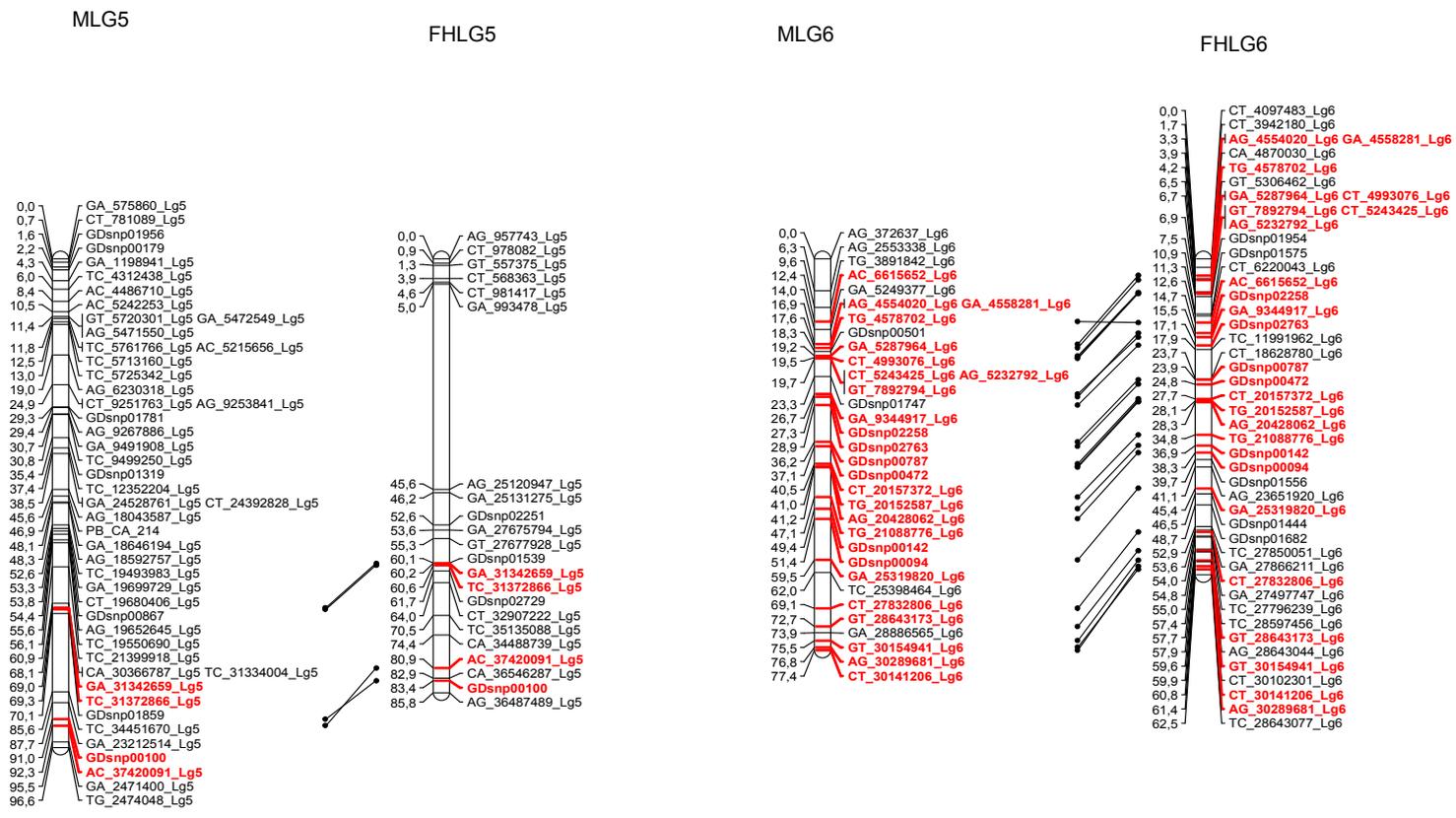


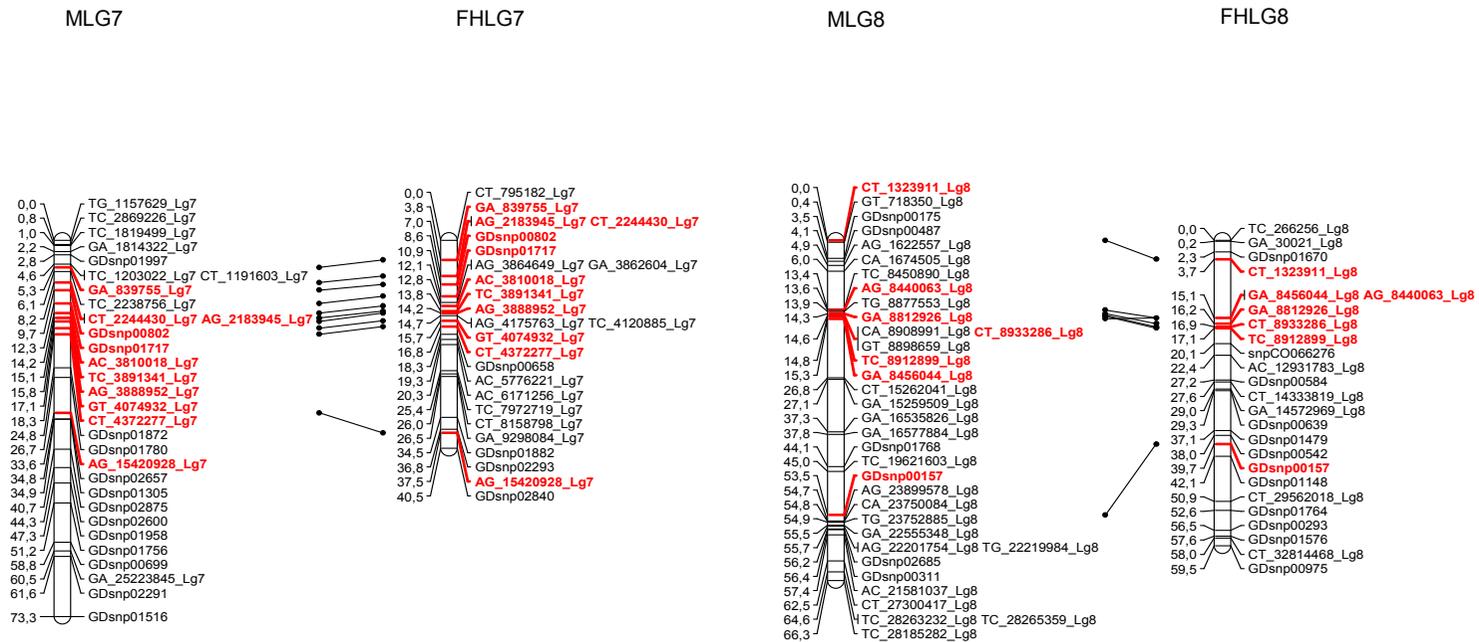
FIGURA 4. Mapa de ligação de *Malus X Domestica* Borkh dos genitores ‘M13/91’ e ‘Fred Hough’. Os grupos de ligação (LG) de cada genitor estão indicados por M (M13/ 91), FH (Fred Hough) e numerados conforme Maliepaard *et al.* (1998). Grupos homólogos estão indicados pelo alinhamento de marcadores comuns entre os mapas dos genitores identificados pela cor vermelha e ligados por linhas. O comprimento dos grupos de ligação é apresentado em ordem crescente de cima para baixo, à esquerda em cM (Kosambi, 1944).



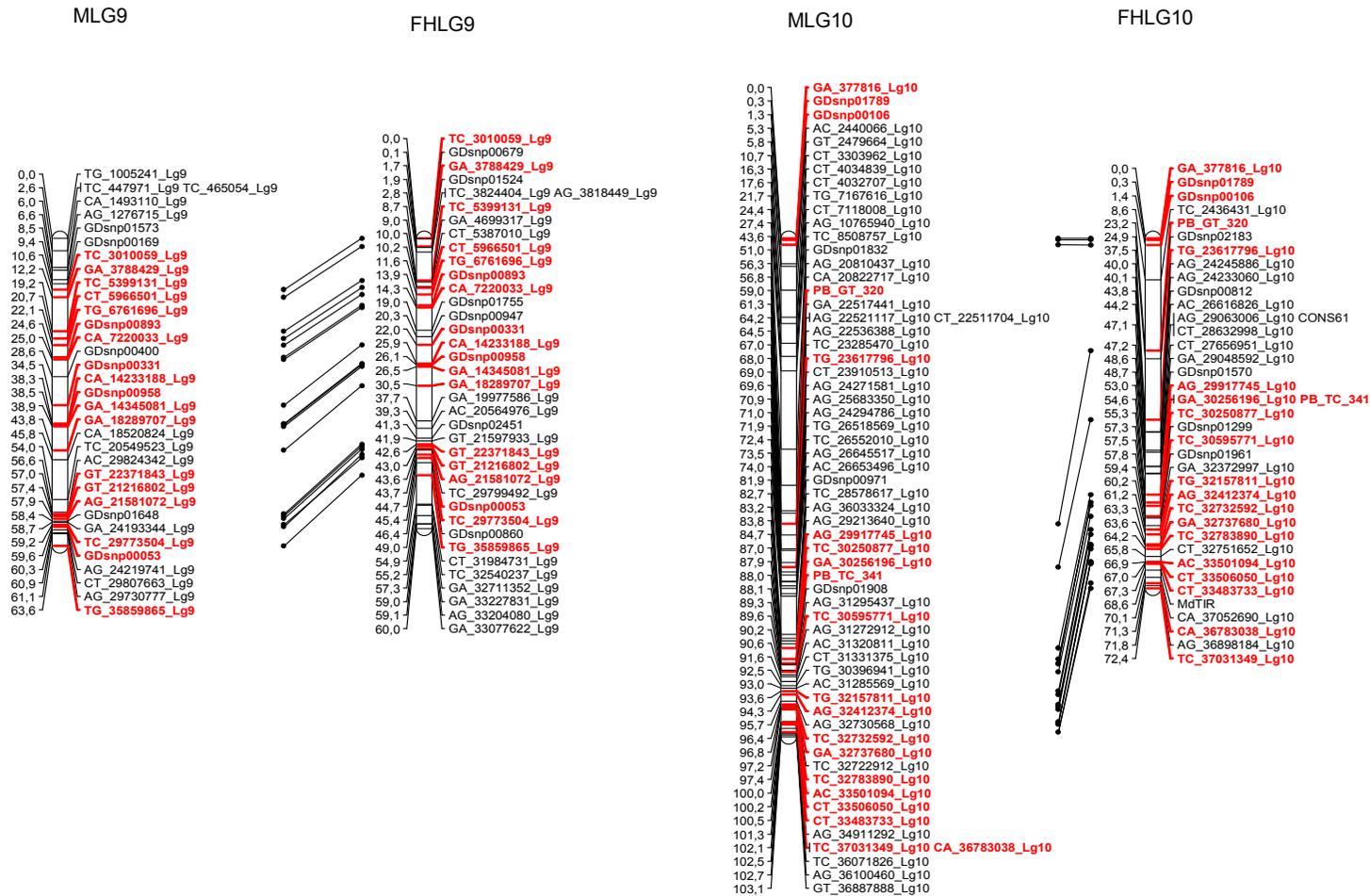
continuação FIGURA 4. Mapa de ligação de *Malus X Domestica* Borkh dos genitores 'M13/91' e 'Fred Hough'.



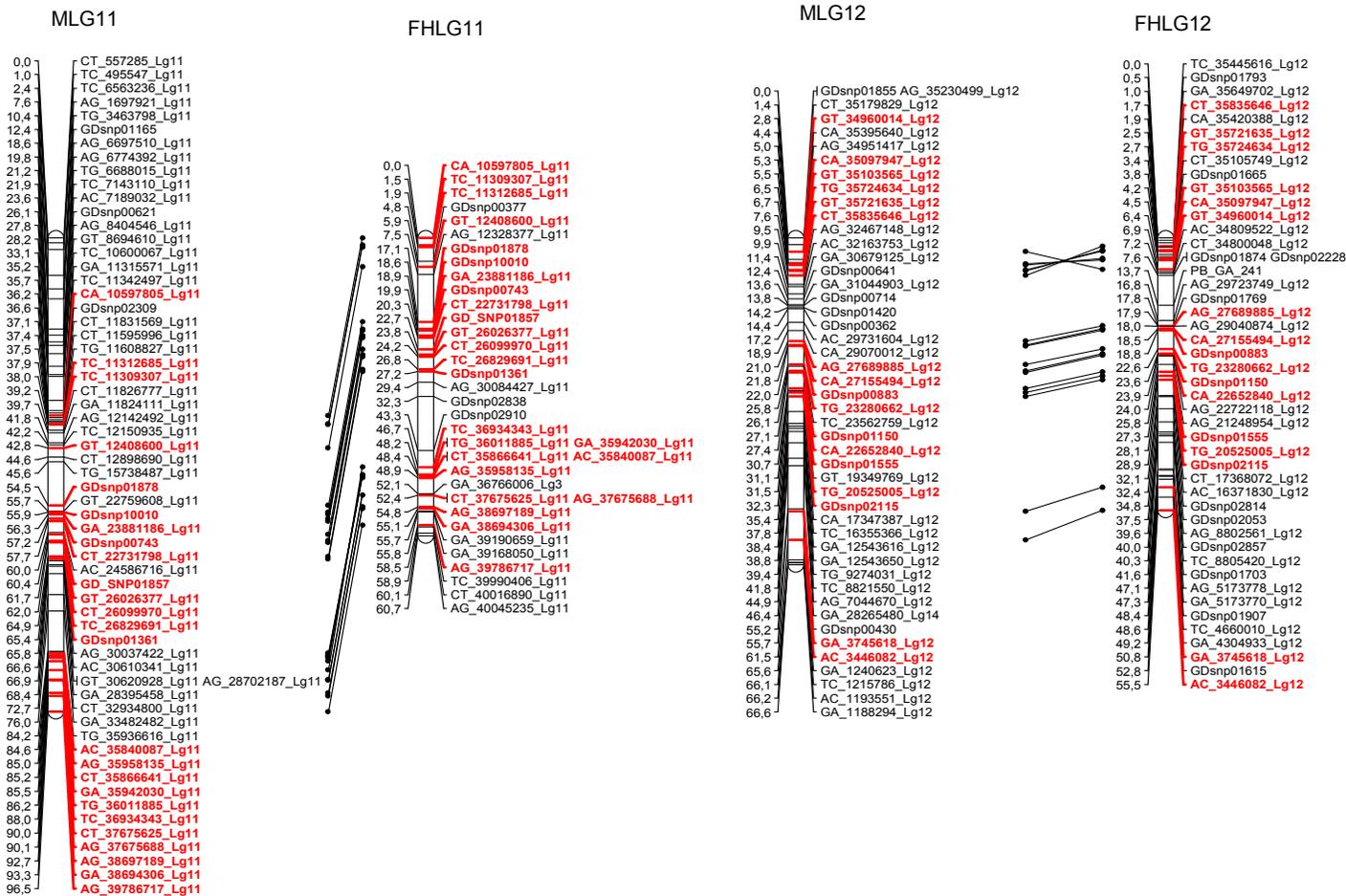
continuação FIGURA 4. Mapa de ligação de *Malus X Domestica* Borkh dos genitores 'M13/91' e 'Fred Hough'.



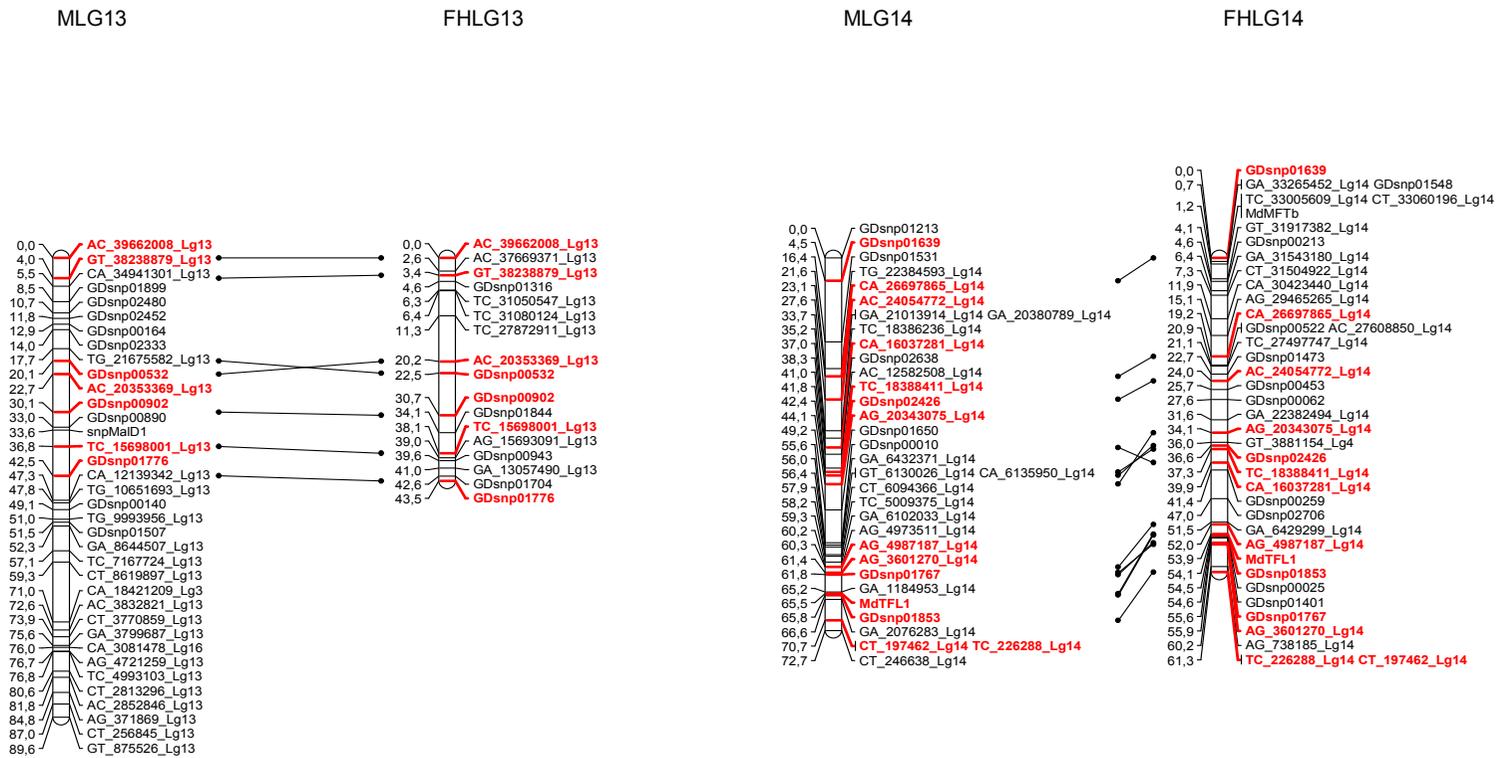
continuação FIGURA 4. Mapa de ligação de *Malus X Domestica* Borkh dos genitores 'M13/91' e 'Fred Hough'.



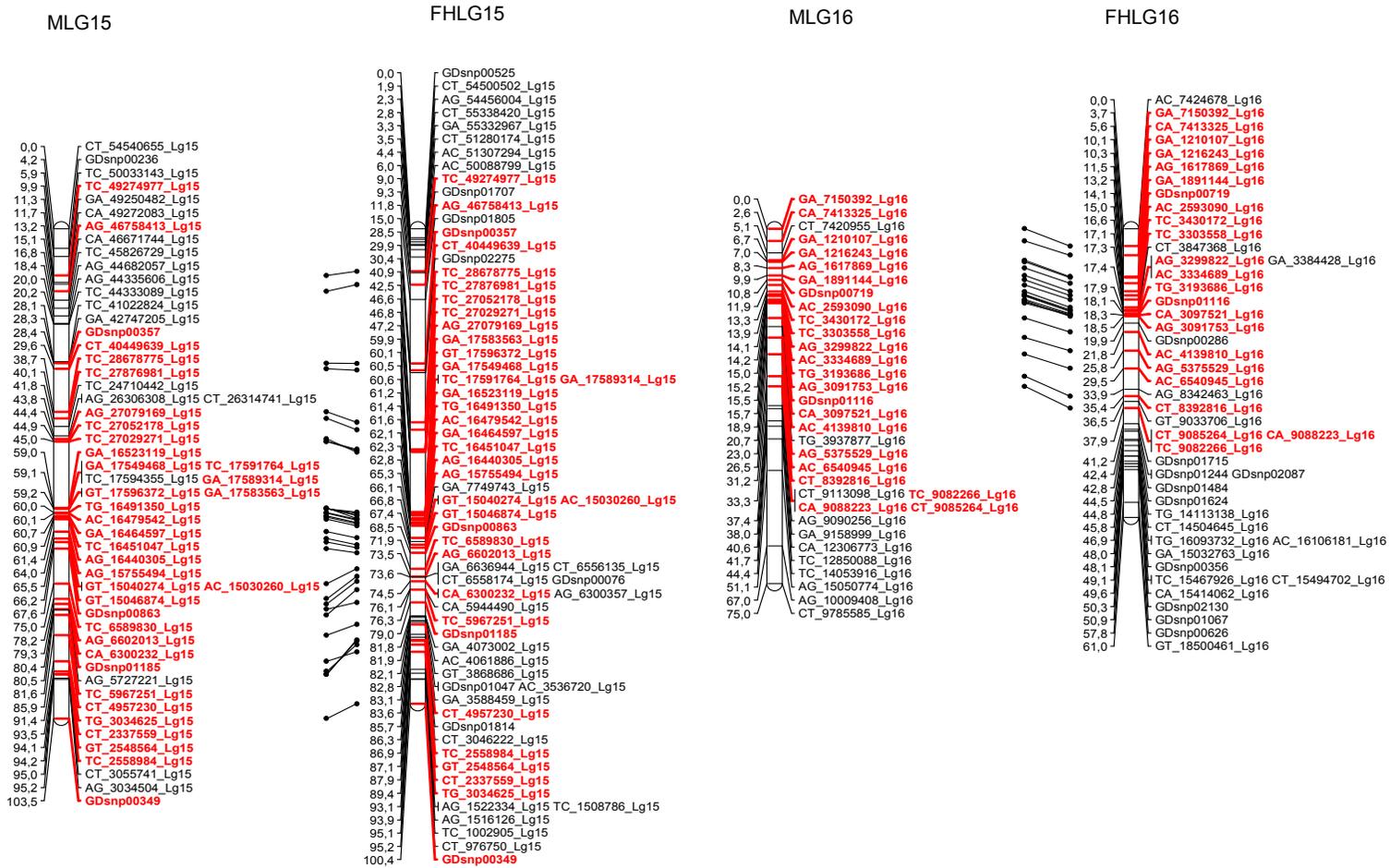
continuação FIGURA 4. Mapa de ligação de *Malus X Domestica* Borkh dos genitores 'M13/91' e 'Fred Hough'.



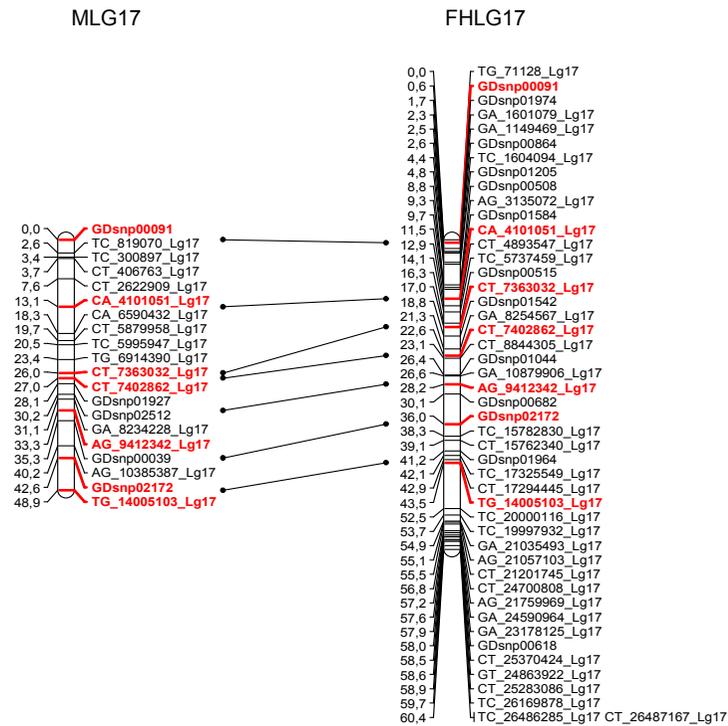
continuação FIGURA 4. Mapa de ligação de *Malus X Domestica* Borkh dos genitores 'M13/91' e 'Fred Hough'.



continuação FIGURA 4. Mapa de ligação de *Malus X Domestica* Borkh dos genitores 'M13/91' e 'Fred Hough'.



continuação FIGURA 4. Mapa de ligação de *Malus X Domestica* Borkh dos genitores 'M13/91' e 'Fred Hough'.



continuação FIGURA 4. Mapa de ligação de *Malus X Domestica* Borkh dos genitores 'M13/91' e 'Fred Hough'.

A disponibilidade das sequências do genoma da macieira em associação a um mapa de ligação de alta densidade permite seu uso como uma poderosa ferramenta para o desenvolvimento de mecanismos para seleção assistida, pois 90,2% dos genes possuem sua localização identificada nos cromossomos. Portanto, a escolha da ferramenta baseada no chipRosBREED\_Apple\_10k (*Illumina Infinium*) foi acertada como estratégia de mapeamento realizada neste estudo. Os resultados aqui obtidos comprovaram sua eficiência, já que o tamanho do mapa, o comprimento dos GL e a densidade de marcadores são similares aos mapas construídos com marcadores tipo AFLP, SSR, SCAR e RAPD. E, igualmente importante, o fato dos marcadores moleculares que compõem o chip RosBREED\_Apple\_10k (*Illumina Infinium*) terem sido desenvolvidos a partir de sequências ESTs homólogas a genes de interesse, possibilitaram a construção dos mapas genéticos com marcadores funcionais informativos.

#### **4.4 Mapeamento de QTLs**

Para a população 'M13/ 91' X 'Fred Hough' foram detectados QTLs associados à data de brotação vegetativa, data floração e data de 50% de floração. O mapeamento por intervalo simples (MI) permitiu a identificação de um maior número de QTLs quando comparado com o mapeamento por rMQMe com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Portanto, a partir da combinação destes resultados, conforme descrito na seção de materiais e métodos, as associações com os marcadores que apresentaram os maiores LODs nas três estratégias de análise e aderência aos requisitos de significância pelos testes de permutação foram considerados como QTLs

significantes. Esta estratégia foi igualmente utilizada para espécies perenes por diversos grupos de pesquisa. Celton e colaboradores (2011) utilizaram mapeamento por intervalo e MQM para detectar QTLs em macieira. Em damasco, Campoy *et al.* (2011) utilizaram mapeamento por intervalo e teste de permutação para determinar a significância de QTLs. Sánchez-Péres *et al.* (2011) detectaram QTLs para requerimento de frio e calor para florescimento em amendoeira [*Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb] com mapeamento por intervalo e teste de permutação. No presente trabalho, para os caracteres fenológicos data floração e data de 50% de floração, provenientes de Vacaria, não foi possível realizar o teste de permutação para determinar a significância do QTL devido, provavelmente, ao elevado percentual de dados perdidos. Pois, como relatado anteriormente, somente 24 genótipos apresentaram floração.

#### **4.4.1 QTLs identificados para data de brotação vegetativa**

Para o genitor paterno 'M13/91', o qual requer menor número de horas de frio, em Bento Gonçalves, o principal QTL identificado para data de brotação vegetativa localizou-se na extremidade do GL 9 (LOD de 20,9) e explicou 46,5% da variação fenotípica observada. Um segundo QTL foi detectado no GL 2, porém com baixo LOD (3,28) e contribuição de 8,4% para explicação da variação fenotípica observada (Tabela 5). Em Vacaria, o QTL principal para esta característica também foi localizado no topo do GL 9 (LOD de 9,84 para os marcadores TC\_447971\_Lg9/ TC\_465054\_Lg9), sendo responsável por 36,4% da explicação da variação fenotípica observada. Sugerindo que realmente haja um QTL para brotação vegetativa

nesta região do GL 9, uma vez que esta foi observada nos dois ambientes. Outros dois QTLs de menor efeito foram identificados no GL 2 em Vacaria. Estes apresentaram LOD inferior (2,48 e 2,33) aos LOD *thresholds* dos testes de significância (GL (6,3) e do genoma (8,6)), e juntos explicaram 44,9 % da variação fenotípica (Tabela 6). Salienta-se que estes QTLs diferem do observado no GL 2 em Bento Gonçalves. Somente avaliações em outros locais e anos poderão confirmar a significância destes QTLs detectados no GL 2, uma vez que outras características do ambiente, além do número de horas de frio, podem ter afetado o início da brotação vegetativa.

Para o genitor materno 'Fred Hough', o principal QTL identificado para data de brotação vegetativa também foi encontrado na extremidade do GL 9 (marcador molecular TC\_3010059\_LG9 - com LOD de 12,36 em Bento Gonçalves e de 4,37 em Vacaria) que respondeu por 32,3 % da variação fenotípica observada em Bento Gonçalves e por 21,1% em Vacaria (Tabela 7). A identificação, também neste genitor, desta região reforça sua importância para a característica. No GL 2 novamente foram encontrados QTLs associados à data de brotação vegetativa com menor efeito. Em Bento Gonçalves, um QTL (LOD 3,0, inferior aos LOD *thresholds*), explicando 9,5 % do caráter fenotípico (Tabela 7) foi encontrado e, em Vacaria foram encontrados dois QTLs (LOD de 2,76 e 3,64), responsáveis por 12% e 10,8% da variação fenotípica, respectivamente (Tabela 7). Em Vacaria, no GL 16 foi identificado outro QTL (LOD de 2,36), explicando 14,1% da variação fenotípica. No entanto, em Vacaria os QTLs identificados para M13/91, por não apresentarem LOD maior que os LODs *thresholds* dos testes de significância (GL e genoma) precisam ser examinados com

cuidado e necessitam ser avaliados em outros anos para confirmação da sua significância.

É interessante que para ambos os pais em Bento Gonçalves foi obtido no GL 2, QTLs mais distantes da extremidade do GL, enquanto que em Vacaria, novamente para ambos os pais, os QTLs estiveram mais próximos da extremidade (Tabelas 5, 6 e 7). É possível que estas diferenças estejam associadas à interação genótipo-ambiente, ou seja, em condições ambientes diversas, genes diferentes são requeridos na modulação da quebra da dormência.

A importância do GL 9 no tempo requerido para brotação vegetativa é confirmada pelos resultados obtidos por outros grupos de pesquisa. Conner e colaboradores (1998) identificaram oito QTLs para brotação vegetativa em outras variedades de maçã, sendo que, o QTL detectado no GL 3 foi posteriormente considerado homólogo ao QTL do GL 9 por Kenis & Keulemans (2004), através do mapeamento por marcadores SSR. Van Dick e colaboradores (2010) também detectaram um QTL de grande efeito para data de brotação vegetativa na extremidade do GL 9. O QTL explicou entre 4.8% ('Golden Delicious') e 40.1% ('Anna') da variação fenotípica e, 11.9% (Sharpe's Early) e 44.6% (Anna).

Já, Celton e colaboradores (2011) identificaram QTLs para brotação vegetativa no GL 2. E, na região inicial do GL 9 identificaram um QTL para a característica de ponta verde, parâmetro fenológico semelhante ao avaliado neste trabalho.

TABELA 5. Resumo da análise de QTL associados às características fenotípicas para o genitor paterno 'M13/91' da população F<sub>1</sub> para o pomar de Bento Gonçalves, 2011.

Característica	Posição (cM)	GL	Marcador <sup>cof</sup>	LOD MI	LOD rMQM	LOD GL	LOD Genoma	% explicação	K*(df)	P
Brotação vegetativa	20,9	2	<i>GDsnp01663</i>	2,88	3,28	5,4	7,6	8,4	10,317 (2)	***
	0	9	<i>TG_1005241_Lg9</i>	20,50	20,90	6,8	7,6	46,5	67,743 (1)	*****
Brotação florífera	18,3	6	<i>GDsnp00501</i>	3,38	1,99	4,6	7,6	17,9	6,950 (1)	***
	23,3	6	<i>GDsnp01747</i>	3,36	4,03	4,6	7,6	18,1	0,788 (2)	-
	2,6	9	<i>TC_447971_Lg9</i>	12,71	11,32	6,8	7,6	52,4	46,689 (1)	*****
	2,6	9	<i>TC_465054_Lg9</i>	12,71	11,32	6,8	7,6	52,4	48,135 (1)	*****
50%floração	6,3	6	<i>AG_2553338_Lg6</i>	2,82	2,73	4,6	7,6	18,7	7,438 (1)	***
	9,6	6	<i>TG_3891842_Lg6</i>	2,76	2,64	4,6	7,6	16,7	7,222 (1)	***
	2,6	9	<i>TC_447971_Lg9</i>	12,21	12,09	6,8	7,6	53,3	47,724 (1)	*****
	2,6	9	<i>TC_465054_Lg9</i>	12,21	12,09	6,8	7,6	53,3	48,855 (1)	*****

<sup>cof</sup>Marcadores em itálico foram utilizados como cofatores para o mapeamento por rMQM e para o teste de permutação.

K\* Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Valor P:\*\*\*: 0,01 , \*\*\*\*\*: 0,0001.

TABELA 6. Resumo da análise de QTL associados às características fenotípicas para o genitor paterno ‘M13/91’ da população F<sub>1</sub> para o pomar de Vacaria, 2011.

Característica	Posição (cM)	GL	Marcador <i>cof</i>	LOD MI	LOD rMQM	LOD GL	LOD Genoma	% explicação	K*(df)	P
Brotação vegetativa	0,0	2	GA_1958621_Lg2	3,52	2,48	6,3	8,6	16,1	4,442 (1)	**
	0,0	2	TG_1926287_Lg2	3,52	2,48	6,3	8,6	16,1	4,346 (1)	**
	7,1	2	GT_7010424_Lg2	3,29	2,33	6,3	8,6	12,7	12,446 (2)	****
	2,6	9	<i>TC_447971_Lg9</i>	10,81	9,84	4,1	8,6	36,7	41,583 (1)	*****
	2,6	9	<i>TC_465054_Lg9</i>	10,81	9,84	4,1	8,6	36,7	38,119 (1)	*****
Brotação florífera	85,6	5	<i>TC_34451670_Lg5</i>	4,46	2,99	-	-	66,4	2,377 (1)	-
	0,0	9	<i>TG_1005241_Lg9</i>	3,24	2,55	-	-	47,7	12,546 (1)	*****
	2,6	9	<i>TC_447971_Lg9</i>	5,12	3,65	-	-	73,0	10,044 (1)	****
	2,6	9	<i>TC_465054_Lg9</i>	5,12	3,65	-	-	73,0	10,044 (1)	****
50% floração	85,6	5	<i>TC_34451670_Lg5</i>	5,55	6,22	-	-	74,4	1,757 (1)	-
	2,6	9	<i>TC_447971_Lg9</i>	4,47	5,15	-	-	69,7	7,643 (1)	***
	2,6	9	<i>TC_465054_Lg9</i>	4,47	5,15	-	-	69,7	7,643 (1)	***
	6,0	9	<i>CA_1493110_Lg9</i>	3,03	1,84	-	-	68,5	8,368 (1)	****

*cof* Marcadores em itálico foram utilizados como cofatores para o mapeamento por rMQM e para o teste de permutação.

K\* Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Valor P: \*\* : 0,05 \*\*\* : 0,01 \*\*\*\* : 0,005 \*\*\*\*\* : 0,001 \*\*\*\*\* : 0,0005 \*\*\*\*\* : 0,0001.

TABELA 7. Resumo da análise de QTL associados às características fenotípicas, para o genitor materno 'Fred Hough' da população F<sub>1</sub> para o pomar de Bento Gonçalves e Vacaria, 2011.

Característica	Posição (cM)	GL	Marcador <sup>cof</sup>	LOD MI	LOD rMQM	LOD GL	LOD Genoma	% explicação	K*(df)	Valor P
-----Bento Gonçalves-----										
Bud_Veg	14,9	2	<i>GDSNP01663</i>	3,19	3,00	5,7	8,4	9,50	11,350 (2)	****
	0,0	9	<i>TC_3010059_LG9</i>	12,51	12,36	6,2	8,4	32,30	20,934 (2)	*****
Bud_Flo	0,0	9	<i>TC_3010059_LG9</i>	7,00	7,00	4,8	7,3	33,90	8,346 (2)	**
Flo50	0,0	9	<i>TC_3010059_LG9</i>	6,42	6,42	5,0	8,5	33,40	5,840 (2)	*
-----Vacaria-----										
Bud_Veg	1,7	2	<i>GT_7010424_LG2</i>	3,04	2,76	5,1	10,1	12,00	12,110 (2)	****
	9,6		<i>AG_3463154_LG2</i>	2,71	3,64	5,1	10,1	10,80	7,223 (1)	***
	9,7		<i>GDSNP01476</i>	2,71	3,64	5,1	10,1	10,80	7,034 (1)	***
	0,0	9	<i>TC_3010059_LG9</i>	5,60	4,37	5,4	10,1	21,10	10,593 (2)	***
	25,8	16	<i>AG_5375529_LG16</i>	3,54	2,36	5,7	10,1	14,10	10,888 (2)	****

<sup>cof</sup>Marcadores em itálico foram utilizados como cofatores para o mapeamento por rMQM e para o teste de permutação.

K\* Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Valor P: \*:0,1 \*\*:0,05 \*\*\*:0,01 \*\*\*\*:0,005 \*\*\*\*\*:0,001 \*\*\*\*\*:0,0005 \*\*\*\*\*:0,0001.

O mapeamento de QTLs para o requerimento de frio em Rosáceas ainda não foi plenamente realizado com sucesso, pois para determinar com precisão o requerimento de frio de cada genótipo seria necessário estabelecer no mínimo um pomar pequeno para cada indivíduo. Destes se retirariam estacas contendo gemas apicais para testes em condições controladas. Todos os trabalhos desenvolvidos até o presente momento foram de mapeamento indireto e, por consequência, pouco precisos, visto que nenhum dos genes reconhecidamente associados ao processo de controle da dormência foi identificado nas regiões dos QTLs mapeados.

Em outras rosáceas, QTLs para quebra de dormência em *Prunus* - amêndoa (Sánchez-Pérez *et al.*, 2007), damasco (Olukolu *et al.*, 2009) e pêssigo (Fan *et al.*, 2010) encontram-se localizados nos grupos de ligação 1, 5 e 7, comuns entre damasco e pêssigo. Indicando a conservação destas regiões entre as espécies.

#### **4.4.2 QTLs identificados para data de floração**

No genitor 'M13/91' identificou-se um QTL de grande efeito para data floração (TC\_447971\_Lg9/ TC\_465054\_Lg9) no GL 9 (LOD 11,32), responsável por 52,4% da explicação da variação fenotípica observada em Bento Gonçalves e 73% em Vacaria (Tabelas 5 e 6). Salienta-se que nesta mesma região identificou-se um QTL para data de brotação vegetativa (Tabela 5). No ambiente de Bento Gonçalves, no GL 6 foram encontrados mais dois QTLs de menor efeito, distanciados em 5 cM (LOD de 1,99 e 4,03), cuja significância ainda necessita ser melhor avaliada por meio de novas avaliações fenológicas. Estes QTLs foram responsáveis por

explicarem 17,9% e 18,1% da variação fenotípica, respectivamente. Da mesma forma, em Vacaria, um QTL foi obtido no GL 5 (LOD 2,99). Para o genitor 'Fred Hough' também foi identificado o QTL da região inicial do GL 9 (LOD 7), explicando 33,9% do caráter (Tabela 7).

QTLs para floração já foram identificados em maçã nos GL 1, GL 6, GL 8, GL 9, GL 12 e GL 17 em diferentes anos, sugerindo que o caráter seja modulado por vários genes, e a importância relativa destes varie com o ambiente (Celton *et al.*, 2011). Em trabalhos com o gênero *Prunus*, também da família das Rosaceas, várias regiões cromossômicas também foram associadas à necessidade de frio (Fan *et al.*, 2010).

#### **4.4.3 QTLs identificados para 50 % de floração**

Para o genitor 'M13/91' identificou-se um QTL de grande efeito para 50% de floração (TC\_447971\_Lg9/ TC\_465054\_Lg9) no topo do GL 9 (LOD 12,09) responsável por 53,3% da explicação fenotípica em Bento Gonçalves e 69,7% em Vacaria. Estes mesmos marcadores identificaram QTL para data de floração (Tabela 5 e 6), o que de certa forma era esperado, uma vez que estas características fenotípicas estão associadas e, portanto, genes que afetam uma têm influência sobre a outra. Apenas em Bento Gonçalves, no GL 6 foram identificados dois QTLs de menor efeito (LOD 2,73 e 2,64) distanciados 3 cM que explicam 18,7% e 16,7% de variação fenotípica, respectivamente. Devido a proximidade destes marcadores é possível que representem o mesmo QTL. Já em Vacaria, na região terminal do GL 5 foi identificado um QTL de grande efeito com LOD 6,22, responsável por 74,4% da variação fenotípica. No genitor 'Fred Hough' o mesmo QTL identificado

na extremidade do GL 9 para data de brotação foi associado a data de floração e a 50% de floração, indicando a alta correlação entre estas características fenotípicas. Essas características encontram-se associadas, podendo depender dos mesmos fatores genéticos ou são o mesmo caráter avaliado de maneira distinta.

#### **4.4.4 Distribuição de frequências fenotípicas para os alelos de um locus associado**

No estudo atual, foram avaliadas as diferenças de frequências fenotípicas para os alelos associados aos locos que apresentaram QTLs para as características de brotação vegetativa, floração e 50% de floração (Tabela 8 e Figura 5). A significância foi determinada pelo teste de hipótese de independência ( $\chi^2$ ), no qual o valor do  $\chi^2$  (calculado) > 20 rejeita a hipótese nula ( $H_0$ ), de que a ligação dos marcadores seja aleatória.

Alelos dos marcadores TC\_447971\_Lg9 e TC\_465054\_Lg9 (genitor 'M13/91'), em Vacaria, para a característica de data de brotação vegetativa, mostram clara diferença de distribuição fenotípica com os valores de  $\chi^2$ (calculado) de 41 e 40 (Tabela 8), respectivamente, separando os genótipos em dois grupos distintos (Figura 5), evidenciando a associação significativa entre um dos alelos destes locos avaliados à data de brotação vegetativa. Alelos destes mesmos marcadores, em Bento Gonçalves, apresentaram distribuição associada às características de data de floração ( $\chi^2$  (calculado) de 68 e 50, respectivamente) e de 50% de floração ( $\chi^2$  (calculado) de 50 e 52, respectivamente) (Tabela 8). Entretanto, em Vacaria,

para 50 % de floração, estes marcadores, não foram significativos, pois o valor do  $\chi^2$ (calculado) foi de 7,3 para ambos.

Alelos do marcador TG\_1005241\_Lg9 (genitor 'M13/91'), em Bento Gonçalves, para a característica de data para brotação vegetativa, também apresentou clara distribuição fenotípica, com  $\chi^2$  (calculado) de 67. Já para o genitor 'M13/91', um alelo do marcador TC\_3010059\_Lg9 foi significativamente associado à característica de data para brotação vegetativa, com o valor de  $\chi^2$ (calculado) de 21 (Tabela 8). O marcador TC\_34451670\_Lg5 (genitor 'M13/91', em Vacaria) apresentou valor calculado do teste de  $\chi^2$  baixo para data de floração e 50% de floração (1,2 e 1,5, respectivamente) (Tabela 8).

Os resultados indicam que os QTLs ligados aos marcadores, responsáveis pelas características de data para brotação vegetativa e 50% de floração, segregam na progênie, sendo que 43 genótipos são comuns para os dois ambientes avaliados quando se refere à brotação vegetativa. Além disso, os marcadores destacados em itálico na Tabela 8, doados pelo genitor 'M13/91' (alelos 'm') encontram-se associados à brotação antecipada em geral (Figura 5).

Com base nesses resultados, fica claro e evidente que a região da extremidade do GL 9 pode ser explorada para o desenvolvimento de marcadores genéticos para seleção de genitores e indivíduos com menor requerimento de frio. A investigação detalhada desta região poderá prover informações para identificação de haplótipos capazes de identificar com relativa eficiência os genótipos precoces para as características avaliadas.

TABELA 8. Teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para hipótese de independência entre categorias das variáveis fenológicas para Bud\_Veg (Precoce, Intermediária e Tardia), Bud\_Flo (Precoce, e Tardia) e ndFlo(50) (Floração Curta e Floração Longa) e classes de alelos, para Bento Gonçalves e Vacaria, por marcador cuja significância foi destacada nas tabelas 5, 6 e 7 pelo teste K\* (Kruskal-Wallis).

<b>Bento Gonçalves</b>				
Marcador	Classificação alelos	Variável fenológica	Teste de $\chi^2$ (calculado)	Prob.
TC_3010059_Lg9 (genitor Fred Hough)	hh,hk,kk	Bud_Veg	21,951	0,0002
TG_1005241_Lg9 (genitor M13/91)	ll,lm	Bud_Veg	67,526	<0,0001
TC_447971_Lg9 (genitor M13/91)	ll,lm	Bud_Flo Flo50	67,667 50,109	<0,0001 <0,0001
TC_465054_Lg9 (genitor M13/91)	ll,lm	Bud_Flo Flo50	50,349 51,981	<0,0001 <0,0001
<b>Vacaria</b>				
Marcador	Classificação alelos	Variável fenológica	Teste de $\chi^2$ (calculado)	Prob.
TC_34451670_Lg5 (genitor M13/91)	ll,lm	Bud_Flo Flo50	1,245 1,495	0,2646 0,2214
TC_447971_Lg9 (genitor M13/91)	ll,lm	Bud_Veg Flo(50)	41,336 7,304	<0,0001 0,0069
TC_465054_Lg9 (genitor M13/91)	ll,lm	Bud_Veg Flo50	40,375 7,304	<0,0001 0,0069

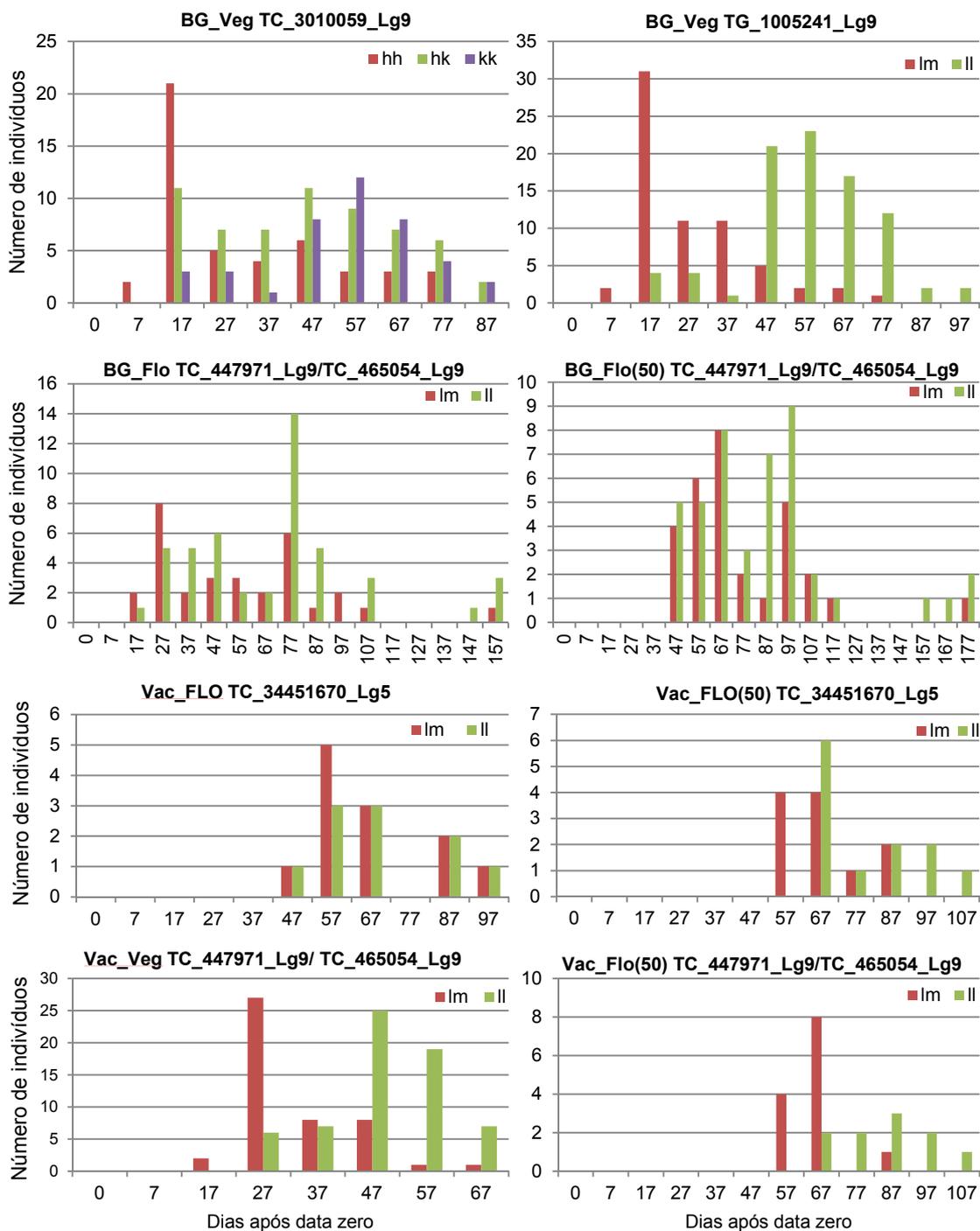


FIGURA 5. Distribuição da frequência da progênie com relação aos alelos dos marcadores moleculares cuja significância foi destacada nas tabelas 5, 6 e 7 pelo teste  $K^*$  (Kruskal-Wallis). Cada gráfico encontra-se indicado pelo respectivo marcador. BG – Bento Gonçalves; Vac – Vacaria; Veg – data de brotação vegetativa; Flo – data de floração; Flo(50) – data de 50% de floração; nn x np, os marcadores segregando a partir de ‘Fred Hough’; lm X ll, os marcadores segregando a partir de ‘M13/91’; e hk x hk, os marcadores segregando para os dois genitores.

#### 4.4.5 Genes candidatos

Os marcadores *TC\_447971\_Lg9*, *TC\_465054\_Lg9* e *TG\_1005241\_Lg9* (Tabela 5, 6 e 7), que explicam cerca de 50% ou mais da variação das características fenológicas analisadas, situam-se aproximadamente nos primeiros 1.000.000 pares de bases da extremidade do GL 9. Mais especificamente, nas posições 450674, 467827 e 1008013, respectivamente. Nesta região, Porto e colaboradores (comunicação pessoal) identificaram duas sequências cujos transcritos apresentam semelhança de 42,6% ao gene *Flowering Locus C (FLC)* de *Arabidopsis*: MDP0000126259 - chr9 (início: 695589 pb - fim: 697096 pb), e MDP0000167381 - chr9 (início: 691905 pb - fim: 695392 pb) (Figura 6).

*FLC* é um dos principais genes responsáveis pelo controle do tempo de floração, e é altamente regulado pela exposição ao frio. Um desses transcritos mostrou expressão diferencial em 'Castel Gala', em avaliações de microarranjos, em resposta ao acúmulo de 168 horas de frio (Porto *et al.*, comunicação pessoal). Portanto, o mapeamento de QTLs nesta região do GL 9 constitui uma evidência adicional e reforça o possível papel destes genes no controle da brotação e floração em macieira.

A prospecção de genes candidatos para a utilização na SAM em macieira até o momento identificou um baixo número de candidatos, tais como, o gene *MdMYB10* no locus *Rni* - co-segregante para cor vermelha da polpa e da folha de macieira no GL 9 (Chagné *et al.*, 2007), o gene *Md-ACO1* relacionado com a síntese de etileno, identificado a partir de um QTL no GL 10 associado à firmeza de polpa (Costa *et al.*, 2010).

Diversos genes envolvidos no ciclo celular foram identificados nas regiões dos QTLs detectados no GL 9, envolvidos com brotação vegetativa e florífera (Celton *et al.*, 2011). O que confirma a importância dessa região cromossômica para as características de brotação.

O presente trabalho contribui para a consolidação das informações necessárias para o desenvolvimento de ferramentas de seleção assistida e planejamento de cruzamentos via seleção de genitores de valor agrônomico superior. No entanto, para fundamentar a significância dos QTLs encontrados para as três características – data de brotação vegetativa, data de floração e 50% de floração, será necessário confirmar a importância dos QTLs, e identificar a interação entre os QTLs e os ambientes. Para utilização posterior desses marcadores moleculares na seleção direta dos caracteres agrônomicos será necessária a validação dos QTLs em outras populações e, se possível em maior número de ambientes.

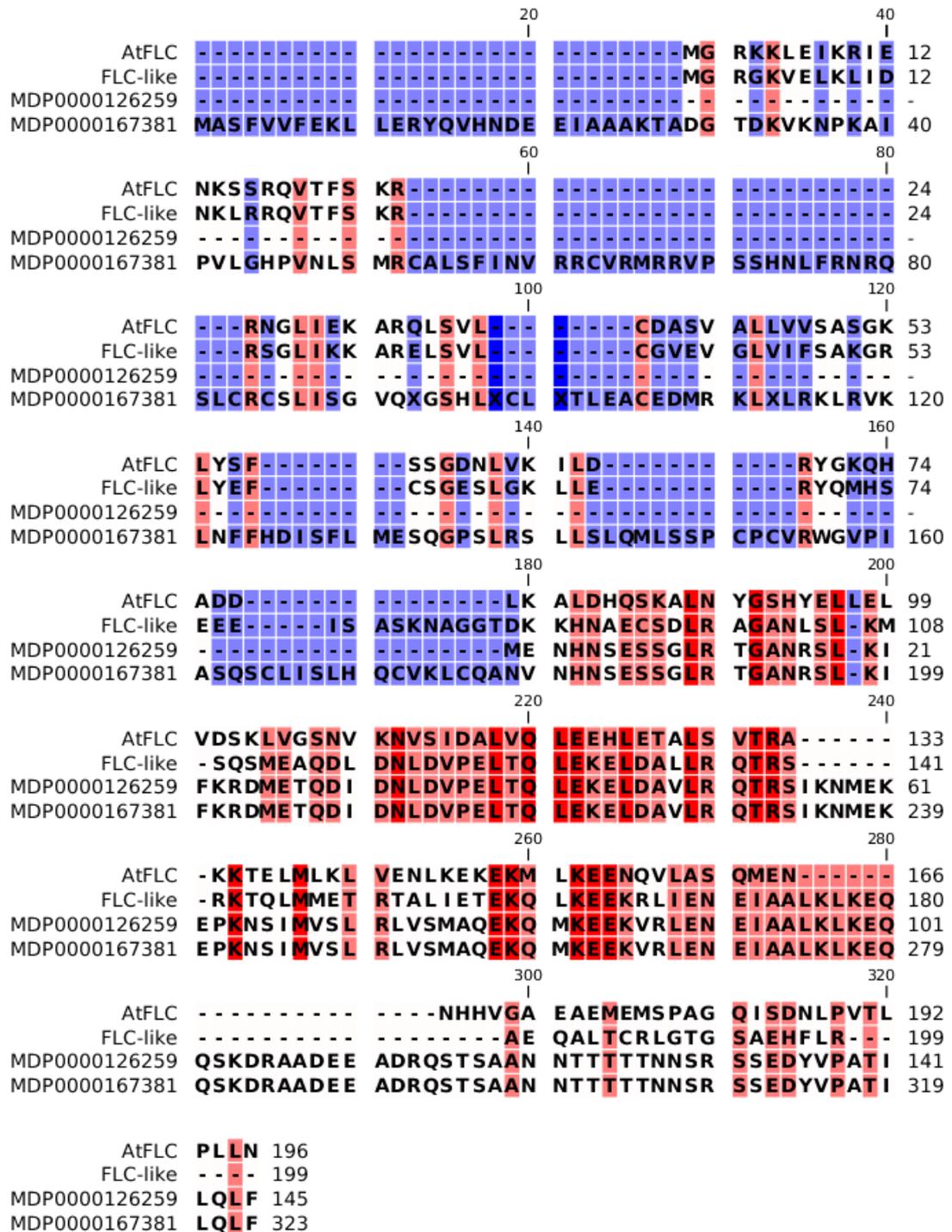


FIGURA 6. Alinhamento das sequências proteicas dos modelos de genes cujos transcritos preditos possuem similaridade de sequência ao gene *Flowering Locus C* de *Arabidopsis thaliana* (AtFLC). *FLC-like* de pera (acesso no GenBank BAI99733.1); MDP0000126259 - chr9 de macieira (início: 695589 pb - fim: 697096 pb); MDP0000167381- chr9 de macieira (início: 691905 pb - fim: 695392 pb). Reproduzido com permissão de Porto (comunicação pessoal).

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

Os genótipos da população F<sub>1</sub> são segregantes para os caracteres fenotípicos avaliados, datas de brotação vegetativa, de brotação florífera e 50% de floração.

Os mapas genéticos para os genitores da população estudada possuem 17 grupos de ligação e boa distribuição dos marcadores nestes grupos, permitindo seu uso para prospecção de QTLs.

A extremidade do GL 9 possui fatores genéticos importantes associados ao controle do tempo de floração e regulados pela exposição ao frio, sendo identificados QTLs para as três características avaliadas. No genitor 'M13/91', um QTL de grande efeito associado com as três características avaliadas foi detectado ligado aos marcadores TC\_447971\_Lg9 e TC\_465054\_Lg9. Já, no genitor 'Fred Hough' o QTL está ligado ao marcador molecular TC\_3010059\_LG9.

Nesta região do grupo de ligação 9 encontram-se transcritos com similaridade ao gene *Flowering Locus C*, de *Arabidopsis thaliana*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAPOMI. **Dados estatísticos**. 2011. Disponível em: <<http://www.agapomi.com.br/dadosestatisticos.php>>. Acesso em: 29 mar. 2012.

ASHCROFT, G. L.; RICHARDSON, E. A.; SEELEY, S. D. A statistical method of determining chill unit and growing degree hour requirements for deciduous fruit trees. **HortScience**, Alexandria, v. 12, n. 4, p. 347-349, 1977.

ASSAD, E. D. et al. Impacto das mudanças climáticas no zoneamento agroclimático do café no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p. 1057-1064, 2004.

BARLOW, H. W. B.; HANCOCK, C. R. The experimental modification of branch form in an apple rootstock. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 1, n. 121, p. 208-215, 1960.

BARLOW, H. W. B.; HANCOCK, C. R. The influence of the leaf on the development of its axillary meristem. **Report of the East Malling Research Station for 1961**, Maidstone, v. 1, p. 71-76, 1962.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: Editora, Folha de Viçosa, 2009. 374 p.

BOTELHO, R. V.; MÜLLER, M. M. L. Evaluation of garlic extract on bud dormancy release of Royal Gala apple trees. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 47, n. 6, p. 738-741, 2007.

BRADSHAW B. D. J.; STETTLER R. F. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. IV. Mapping QTLs with large effects on growth, form and phenology traits in a forest tree. **Genetics**, Austin, v. 1, n. 139, p. 963-973, 1995.

BUS, V. G. M. et al. An update on apple scab resistance breeding in New Zealand. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 1, n. 595, p. 43-47, 2002.

CABRERA, A. et al. Development and bin mapping of a Rosaceae Conserved Ortholog Set (COS) of markers. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 562, 2009.

CAVANA, M. et al. Genetic diversity in ancient apple germplasm from northwest Italy. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 83, p. 549-554, 2008.

CELTON, J. M. et al. Deciphering the genetic determinism of bud phenology in apple progenies: a new insight into chilling and heat requirement effects on flowering dates and positional candidate genes. **New Phytologist**, Cambridge, v. 1, n. 192, p. 378-392, 2011.

CERVERA M. T. et al. Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. **Genetics**, Austin, v. 158, p. 787-809, 2001.

CIPRIANI, G. et al. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L) Batsch): isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, p. 65-72, 1999.

CHAGNÉ, D. et al. Mapping a candidate gene (MdMYB10) for red flesh and foliage colour in apple. **BMC Genomics**, London, v. 8, n. 212, p. 1-11, 2007.

COOK, N. C.; JACOBS, G. Progression of apple (*Malus x domestica* Borkh.) bud dormancy in two mild winter climates. **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 1, n. 75, p. 233–236, 2000.

COSTA, C. et al. QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus X domestica* Borkh.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 11, p. 3029–3039, 2010.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 19, p. 299-306, 2001.

CROUCH, H. K. et al. Segregation of microsatellite loci from haploid and diploid gametes in *Musa*. **Crop Science**, Madison, v. 38, p. 211-217, 1998.

DENARDI, A.; NUNES, E. C. Avanços do programa de melhoramento genético da macieira na Epagri. **Jornal da Fruta**, Lajes, v. 187, p. 10, 2007.

DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Daiane: nova cultivar de macieira para colheita em março. **Revista Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 11, n. 3, p. 6-8, 1998.

DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Maçã 'Imperatriz'. In: DONADIO, L. C. (Ed.). Novas variedades brasileiras de frutas. **Sociedade Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, n. 205, p. 118-119, 2000.

DENNIS, F. G. 2 Methods of studying rest – temperature alternation and genetic-analysis. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 5, p. 820-824, 1987.

DOORENBOS, J. Review of the literature on dormancy in buds of woody plants. **Landbouwhoogeschool**, Wageningen, v. 53, p. 1-23, 1953.

EBERT, A. et al. First experiences with chill units models in southern Brazil. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 184, p. 89-96, 1986.

ENGELBORGHIS, I.; SWENNEN, R.; VAN CAMPENHOUT, S. Capacidad del AFLP para detectar diferencias genéticas y variantes somaclonales en *Musa* spp. **Infomusa**, Montpellier, v. 76, n. 2, p. 3-6, 1998.

EPAGRI. **A cultura da macieira**. 2. ed. Florianópolis: EPAGRI, 2006. 743 p.

EREZ, A.; LAVEE, S. The effect of climatic conditions on dormancy development of peaches buds. I. Temperature. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 96, p. 711-714, 1971.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4th ed. Edinburgh: Longman Group Limited, 1996. 464 p.

FAN S. et al. Mapping quantitative trait loci associated with chilling requirement, heat requirement and bloom date in peach (*Prunus persica*). **New Phytologist**. Cambridge, v. 185, n. 4, p. 917-30, 2010.

FAN, J. B. et al. Illumina universal bead arrays. **Methods in enzymology**, New York, v. 1, n. 410, p. 57-73, 2006.

FAO. **Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação**. Disponível em: < <https://www.fao.org.br/>>. Acesso em: 20 jun. 2012.

FAUST, M. **Physiology of temperate zone fruit trees**. New York: Wiley, 1989.

FAUST, M. Involvement of apical dominance in winter dormancy of apple buds. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 1, n. 395, p. 47-56, 1995.

FINETTO, G. A. Investigation of the effects of light and rain on overcoming of dormancy in some apple cultivars. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 662, p. 93-100, 2004a.

FINETTO, G. A. The behavior of some apple rootstocks in relation to the chilling requirement. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 662, p. 245-251, 2004b.

FORSHEY, C. Chemical fruiting thinning of apples. **New York: Food and Life. Sciences Bulletin**, New York, v. 1, n. 116, p. 7, 1986.

FORSHEY, C. G.; WIERES, R. W.; VAN KIRK, J. R. Seasonal development of the leaf canopy of 'MacSpur McIntosh' apple trees. **Horticultural Science**, Budapest, v. 1, n. 20, p. 881-883, 1987.

FRANKS, S. J.; SIM, S.; WEIS, A. E. Rapid evolution of flowering time by an annual plant in response to a climate fluctuation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 4, p. 1278-1282, 2007.

FREWEN, B. E. et al. Quantitative trait loci and candidate gene mapping of bud set bud flush in *Populus*. **Genetics**, Austin, v. 154, n. 2, p. 837-845, 2000.

FUCHIGAMI, L. H. et al. A degree growth stage (°GS) model and cold acclimation in temperate woody plants. In: PLANT cold hardiness and freezing stress. New York: Academic Press, 1982. p. 93-116.

GIORDANO, M. et al. Identification by denaturing high-performance liquid chromatography of numerous polymorphisms in candidate region for multiple sclerosis susceptibility. **Genomics**, San Diego, v. 1, n. 56, p. 247-253, 1999.

GIRARDI, C. L. (Ed.). **Maçã: pós-colheita**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. 109 p. (Frutas do Brasil, 39).

GIVRY, S. et al. Carthagene: multipopulation integrated and radiated hybrid mapping. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 8, p. 1703-1704, 2005.

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

GREENE, D. W.; AUTIO, W. R. Notching techniques increase branching of young apple trees. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.1, n. 119, p. 678-682, 1994.

GRIFFITHS, A. et al. **Introdução à genética**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 123 - 192.

HAERTER, J. A. **Biorreguladores e anelamento do tronco na formação de gemas florais em pereiras cv. William's Bom Chretien**. 2003. 74 f. Tese (Doutorado em Fruticultura de Clima Temperado) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003.

HAMADA, H.; PETRINO, M. G.; KAKUNAGA, T. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington. v. 79, p. 6465-6469, 1982.

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

HAUAGGE, R.; CUMMINS, J. N. Genetics of Length of Dormancy Period in *Malus* Vegetative Buds. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, n. 116, p. 121-126, 1991.

HEIDE, O. M.; PRESTUD, A. K. Low temperature, but not photoperiod, controls growth cessation and dormancy induction and release in apple and pear. **Tree Physiology**, Oxford, v. 25, p. 109-114, 2005.

HOAD, G.V. Hormonal regulation of fruit-bud formation in fruit trees. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 149, p. 13-23, 1984.

HOWE, G. T. et al. Quantitative genetic of bud phenology, frost damage, and winter survival in an F-2 family of hybrid poplars. **Theoretical and Applied Genetic**, Berlin, v. 101, n. 4, p. 632-642, 2002.

HUARACHA, E. M. et al. Phenotypic reaction and genetic analysis using AFLP-derived SCARs for resistance to apple scab. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 5, p. 260-266, 2004.

IAPAR. **Macieira cultivar 75 – eva**. Disponível em: <<http://www.iapar.br/arquivos/File/folhetos/maciera/maciera.html>>. Acesso em: 29 mar. 2012.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 20 Jun. 2012.

IBRAF. **Instituto Brasileiro de Frutas**. Disponível em: <[http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est\\_frutas.asp](http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp)>. Acesso em: 19 Jun. 2012.

IGARASHI, M. et al. Linkage maps of the apple (*Malus X domestica* Borkh.) cvs 'Ralls Janet' and 'Delicious' include newly developed EST markers. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 22, p. 95-118, 2008.

JANICK, J. et al. Apple. In: FRUIT breed: tree and tropical fruits. New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 1-77. v. 1.

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

KIJAS, J. M. H.; FOWLER, J. C. S.; THOMAS, M. R. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. **Genome**, Ottawa, v. 38, p. 349-355, 1995.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. **Annual of Eugenics**, London, v. 12, p. 172-175, 1944.

LABUSCHAGNÉ, I. F. et al. Genotypic variation in prolonged dormancy symptoms in apple families. **Horticultural Science**, Budapest, v.1, n. 37, p. 157-163, 2002a.

LABUSCHAGNÉ, I. F. et al. Genetic variation in chilling requirement in apple progeny. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 1, n. 127, p. 663-672, 2002b.

LABUSCHAGNÉ, I. F. et al. Budbreak number in apple seedlings as selection criterion for improved adaptability to mild winter climates. **Horticultural Science**, Budapest, v. 1, n. 38, p. 1186-1190, 2003.

LANG, G. A. Dormancy, a new universal terminology. **Horticultural Science**, Budapest, v. 1, n. 22, p. 817-820, 1987.

LANG, G. A. et al. Endo-, para-, and eco-dormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. **Horticultural Science**, Budapest, v. 22, p. 371–377, 1987.

LEFORT, F.; DOUGLAS, G. C. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. **Annals of Forest Science**, Versailles, v. 56, p. 259-263, 1999.

LIEBHARD, R. et al. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus X domestica* Borkh). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 8, p. 1497-1508, 2003.

LIETH, H. Purpose of a phenology book. In: LIETH, H. (Ed.). **Phenology and seasonality modeling**. Berlin: Springer, 1974. p. 3-19.

LIU, B. H. **Statistical genomics**: linkage, mapping and QTL analysis. Boca Raton: CRC Press, 1998. 605 p.

MAIA REGO, G.; BONATO NEGRELLE, R. R.; CERDEIRA MORELLATO, L. P. **Fenologia**: ferramenta para conservação, melhoramento e manejo de recursos vegetais arbóreos. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. p. 291-310.

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

MEIER, U. H. et al. Phänologische Entwicklungsstadien des Kernobstes (*Malus domestica* Borkh. Und *Pyrus communis* L.) des Steinobstes (*Prunus-Arten*), der Johannisbeere (*Ribes-Arten*) und der Erdbeere (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Nachrichtenbl**, Pflanzenschutzd, n. 46, p. 141-153, 1994.

MEILAN, R. Phytohormones that antagonize gas tend to promote flowering. **New Forest**, Dordrecht, v. 14, p. 179-202, 1997.

MOHAMED, A. K. A. The effect of chilling, defoliation and hydrogen cyanamide on dormancy release, bud break and fruiting of Anna apple cultivar. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 118, p. 25-32, 2008.

MORIYA, S. et al. Development of a Marker-assisted Selection System for Columnar Growth Habit in Apple Breeding. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v. 78, p. 279-287, 2009.

MORIYA, S.; IWANAMI, H.; TAKAHASHI, S. Genetic mapping of the crown gall resistance gene of the wild apple *Malus sieboldii*. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 1, p. 195-203, 2010.

MURAWSKI, H. A contribution to apple cultivation research, 10: results of cultivation of apple species with late leafing-out blooming (in German). **Züchter**, Berlin, v. 1, n. 3, p. 134-139, 1967.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 19 jun. 2012.

NISSILA, P. C.; FUCHIGAMI, L. H. The relationship between vegetative maturity and the first stage of cold acclimation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 1, n. 103, p. 710-711, 1978.

OLMSTED, R.G. The origin and function of self-incompatibility in flowering plants. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 2, n. 3, p. 127-136, 1989.

OLUKOLU, B. et al. Genetic linkage mapping for molecular dissection of chilling requirement and budbreak in apricot (*Prunus armeniaca* L.). **Genome**, Ottawa, v. 1, n. 52, p. 819-828, 2009.

ORAGUZIE, N. C. et al. Inheritance of the Md-ACS1 gene and its relationship to fruit softening in apple (*Malus × domestica* Borkh.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 1, n. 108, p. 1526-1533, 2004.

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 85, p. 985-993, 1993.

PETRI, J. L. Formação de flores, polinização e fertilização. In: A CULTURA da macieira. Florianópolis: EPAGRI, 2002. p. 229-260.

PETRI, J. L. Intrusion of apple tree budding by hydrogenated cyanamide and mineral oil under influence of temperature. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 71-75, 1997.

PETRI, J. L.; PALLADINI, L. A.; POLA, A. C. Dormência e indução à brotação em macieira. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis, 2006. p. 261-297.

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

PUTTI, G. L.; PETRI, J. L.; MENDEZ, M. E. Temperaturas efetivas para a dormência da macieira (*Malus domestica* Borkh). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 210-212, 2003.

RIBEIRO, P. A. Descrição e comportamento de algumas cultivares de macieira no Sul do Brasil. In: MANUAL da cultura da macieira. Florianópolis: EMPASC, 1985. p. 59-91.

RICHARDS, C. M.; VOLK, G. M., REILLEY, A. A. Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple. **Tree Genetics & Genomes**, Germany, v. 5, p. 339-347, 2008.

RICHARDSON, E. A. et al. Pheno-climatography of spring peach bud development. **HortScience**, Alexandria, v. 10, n. 3, p. 236-237, 1975.

RYUGO, K. Promotion and inhibition of flower initiation and fruit set by plant manipulation and hormones, a review. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 1, n. 179, p. 301-307, 1986.

SACHS, R. M. Nutrient diversion: an hypothesis to explain the chemical control of flowering. **Horticultural Science**, Budapest, v. 1, n. 12, p. 220-222, 1977.

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

SESTRAS, R. et al. The variability of juvenile period, fruits size and response to diseases attack on  $f_1$  interspecific apple hybrids and the efficiency of selection. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj**, Napoca, v. 1, n. 38, p. 234-240, 2010.

SHALTOU, A. D.; UNRATH, C. R. Rest completion prediction for 'Starkrimson Delicious' apples. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 108, n. 6, p. 957-961, 1983.

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

SOLTÉSZ, M. Apple. In: FLORAL biology, pollination and fertilisation zone fruit species and grape. Budapest: Akadémia Kiadó, 2003. p. 237-316.

TYDEMAN, H. M. The relation between time of leaf break and of flowering in apple seedlings. **Annual Report. East Malling Research Station**, Maidstone, p. 70-72, 1964.

ULANOVSKY, S. et al. Use of molecular markers in detection of synonymies and homonymies in grapevines (*Vitis vinifera* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 1, n. 92, p. 241-254, 2002.

VILLA NOVA, N. A. et al. Estimativa de graus-dia acumulados acima de qualquer temperatura base em função das temperaturas máxima e mínima. **Ciência da Terra**, São Paulo, n. 30, p. 1-8, 1972.

VAN DYK, M. M. et al. Identification of a major QTL for time of initial vegetative budbreak in apple (*Malus x domestica* Korkh.). **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 1, n. 6, p. 489-502, 2010.

VAN OOIJEN, J. W. **JoinMap® 4**: software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Wageningen: Kyazma B.V., 2006.

VAN OOIJEN, J. W. et al. **MapQTL® 4.0**: software for the calculation of QTL positions on genetic maps. Wageningen: Plant Research International, 2002.

VELASCO, R. et al. The genome of the domesticated apple (*Malus X domestica* Borkh.). **Nature Genetics Advance**, New York, v. 42, n. 10, p. 833-839, 2010.

VIEIRA; et al. **Mapeamento genético de caracteres quantitativos e sua interação com o ambiente**. Planaltina: Embrapa Cerrado, 2006. 28 p.

VOLZ, R. K.; GIBBS, H. M.; POPENOE, J. Branch induction on apple nursery trees: effects of growth regulators and defoliation. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 1, n. 22, p. 277-283, 1994.

VOORRIPS, R. E. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **Journal of Heredity**, Washington, v. 1, n. 93, p. 77-78, 2002.

WAY, R.D. et al. Apples. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 1, n. 290, p. 1-62, 1990.

WEINBERGER, J. H. Chilling requirements of peach varieties. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 1, n. 56, p. 122-128, 1950.

WEIRTHEIM, S. J.; SCHMIDT, H. Flowering, pollination and fruit set. In: TROMP, J.; WEBESTER, A. D.; WERTHEIM, S. J. **Fundamentals of temperature zone tree fruit production**. Leiden: Backhuys Publishers, 2005. p. 216-239.

YAMANISHI, O. K.; NAKAJIMA, Y.; HASEGAWA, K. Effect trunk strangulations in late Season on return, fruit quality and yield of pummelo trees grown in a plastic House. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v. 64, n.1, p. 31- 40, 1995.

ZHU, Y.; BARRITT, B. H. Md-ACS1 and Md-ACO1 genotyping of apple (*Malus x domestica* Borkh.) breeding parents and suitability for marker-assisted selection. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 1, n. 4, p. 555-562, 2008.

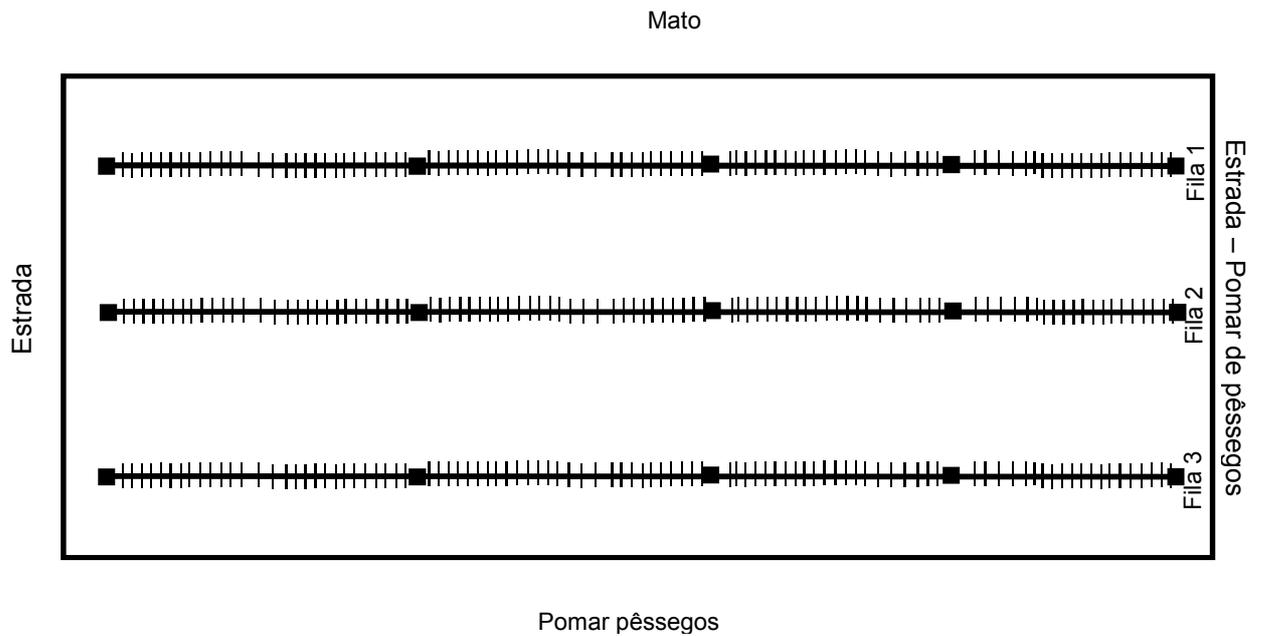
## 7 APÊNDICES

### APÊNDICE 1. Croqui com a posição da população no pomar de Bento Gonçalves – RS.

#### Pomar de Bento Gonçalves

Distância entre plantas: 0,70 m  
Comprimento total da fila: 70 m  
Comprimento entre postes: 10m  
Altura do primeiro fio: 0,70 m  
Altura do segundo fio: 1,40 m

Legenda:  
■ Poste  
— Indivíduo

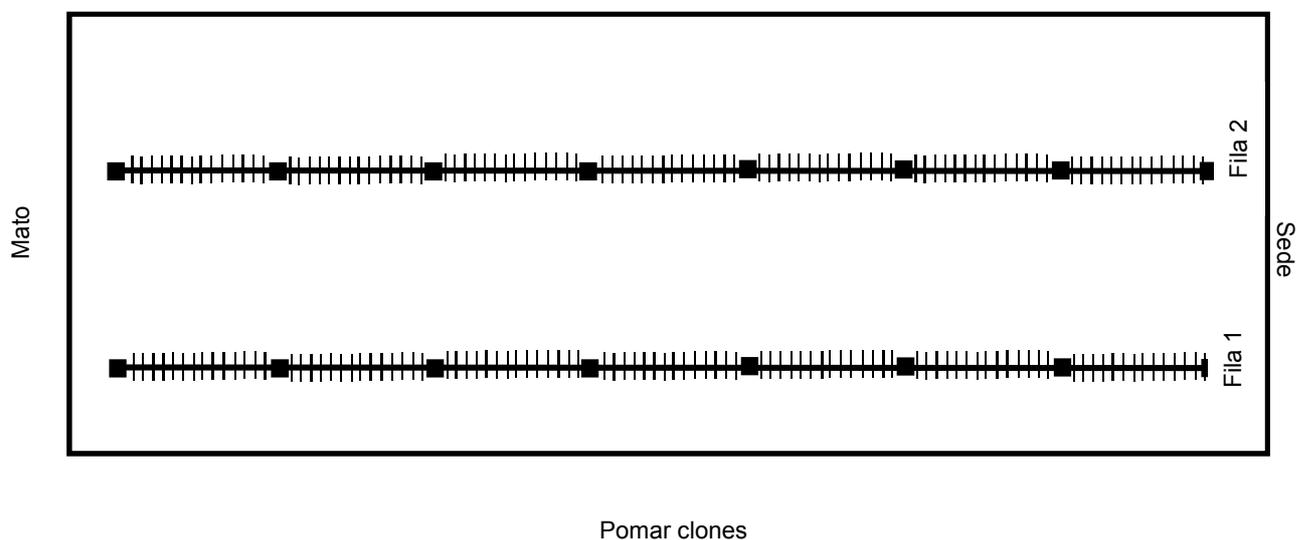


Continuação APÊNDICE 1. Croqui com a posição da população no pomar de Vacaria – RS.

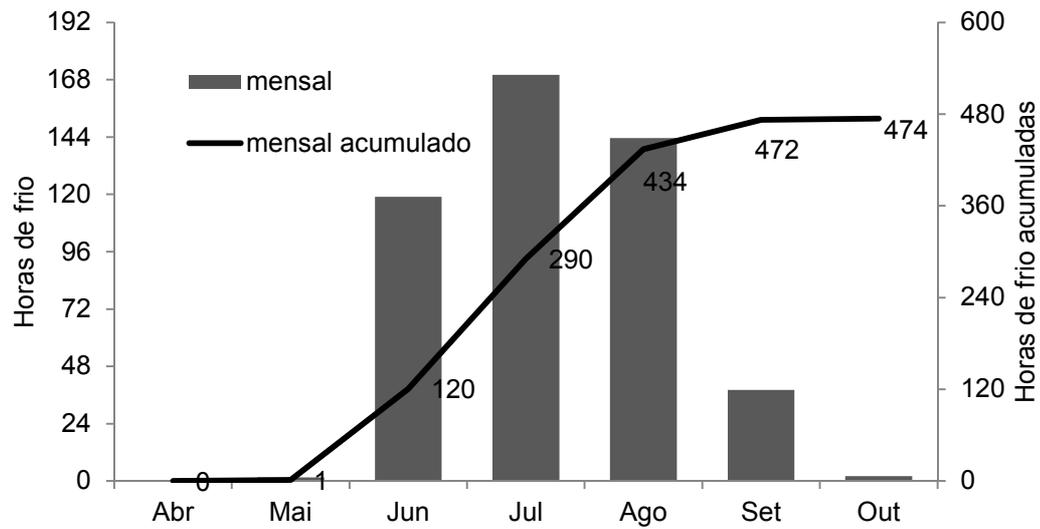
**Pomar de Vacaria**

Distância entre plantas: 0,70 m  
Comprimento total da fila: 70 m  
Comprimento entre postes: 10m  
Altura do primeiro fio: 0,70 m  
Altura do segundo fio: 1,40 m

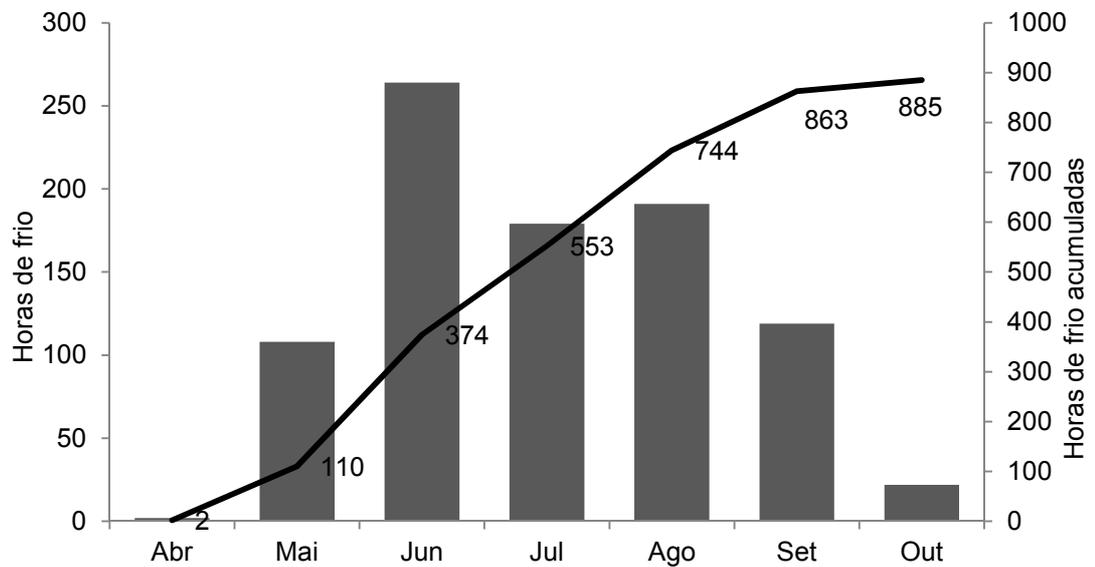
Legenda:  
■ Poste  
— Indivíduo



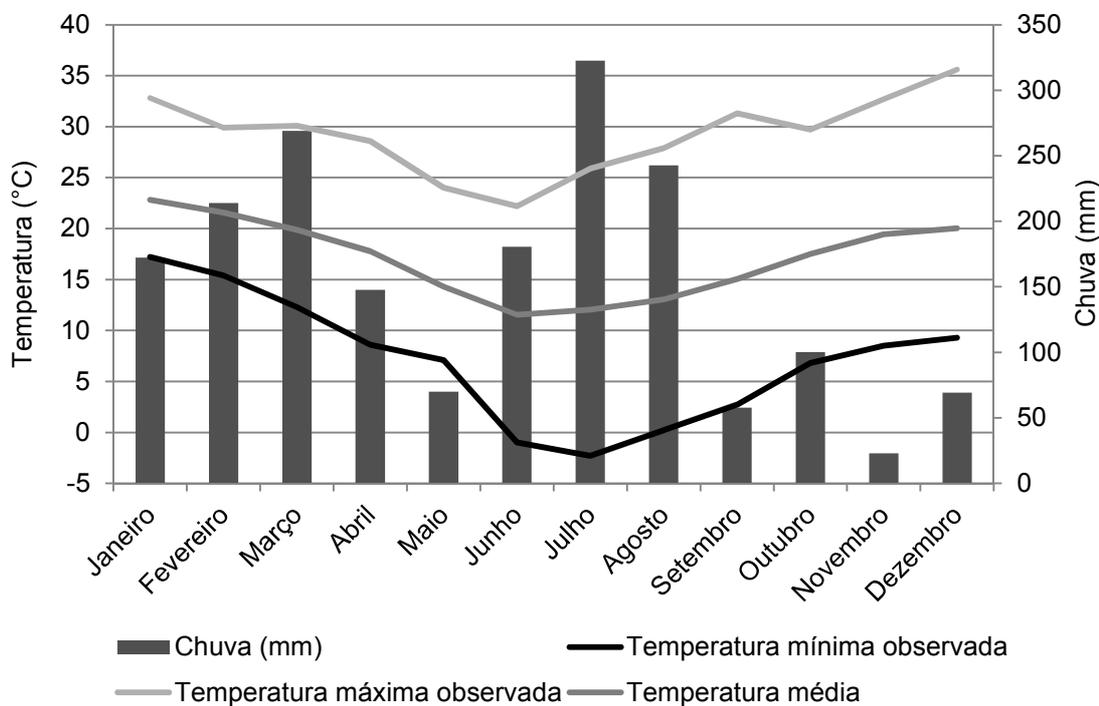
APÊNDICE 2. Número de horas com temperatura  $\leq 7,2^{\circ}\text{C}$  no pomar da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves-RS, para o Ano 2011.



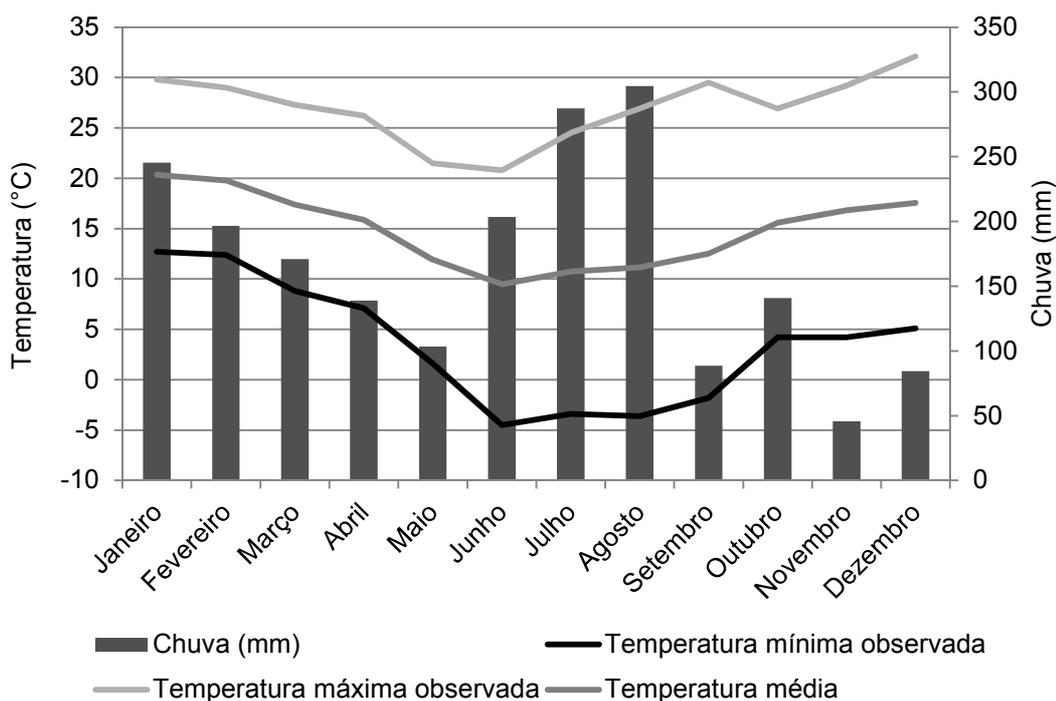
Número de horas com temperatura  $\leq 7,2^{\circ}\text{C}$  no pomar da Embrapa Uva e Vinho, Vacaria-RS, para o Ano 2011.



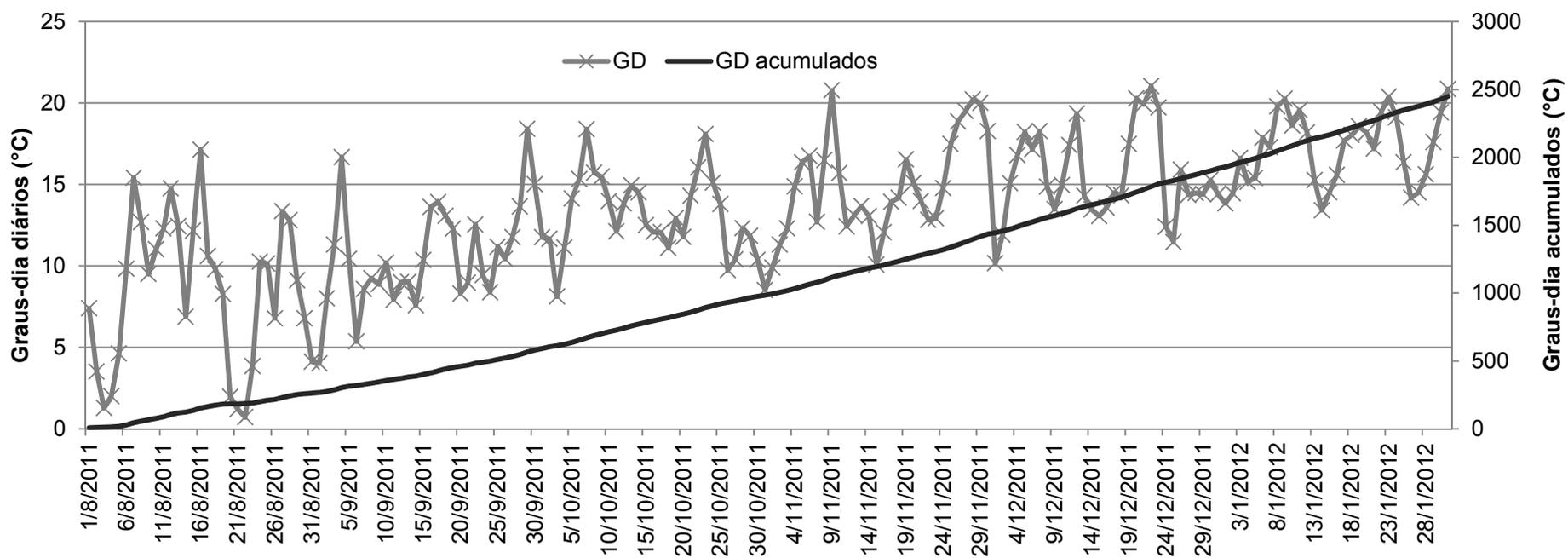
APÊNDICE 3. Temperatura mínima e máxima observadas, média mensal (°C) e precipitação pluviométrica - total mensal em mm, em Bento Gonçalves, RS, em 2011. Fonte dos dados brutos: INMET.



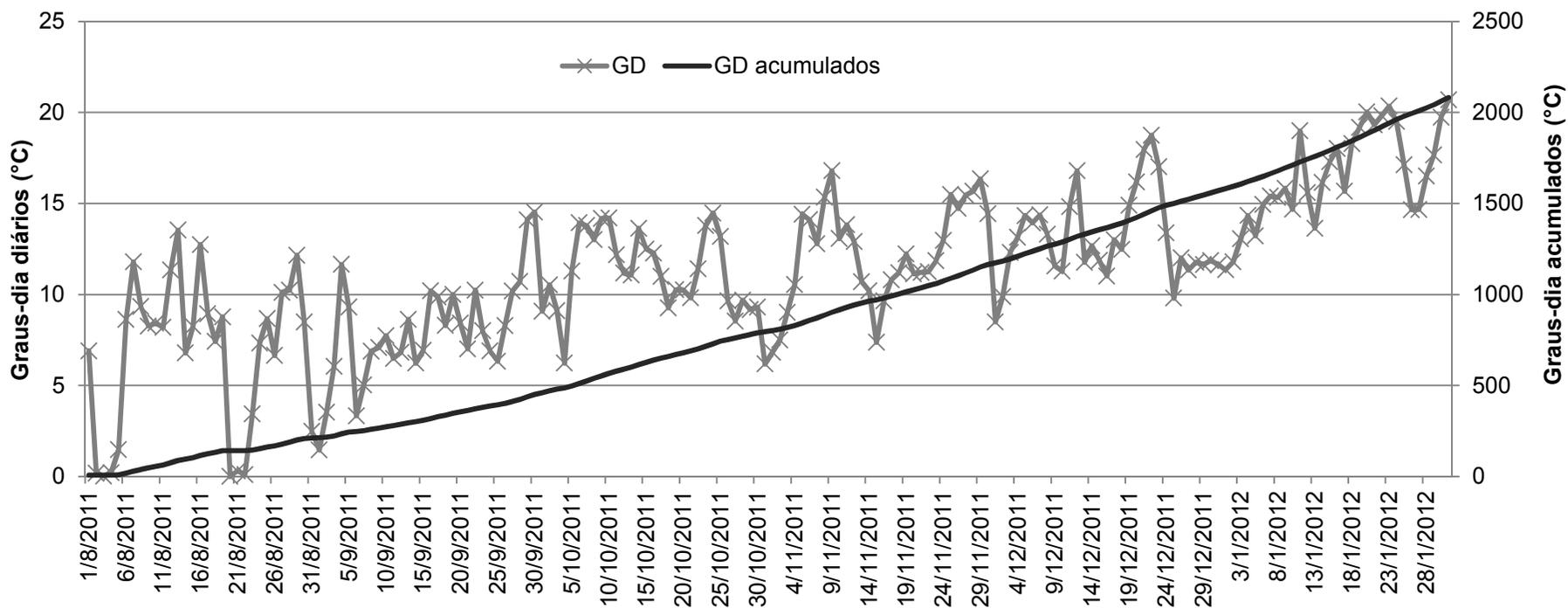
Temperatura mínima e máxima observadas e média mensal (°C) e precipitação pluviométrica - total mensal em mm, em Vacaria, RS, em 2011. Fonte dos dados brutos: INMET.



APÊNDICE 4. Graus-dia diário e acumulado de 01/08/11 a 31/01/12. Em Bento Gonçalves-RS, em 2011/ 2012.



continuação APÊNDICE 4. Graus-dia diário e acumulado de 01/08/11 a 31/01/12. Em Vacaria-RS, em 2011/ 2012.



APÊNDICE 5. Período para queda de folhas 10%, 50% e 100% dos genótipos do pomar de Bento Gonçalves de 17/05/2011 a 16/11/2011. A data zero é dia 17/05/2011.

