

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

MAPEAMENTO GENÉTICO DE ALTA RESOLUÇÃO
DO *LOCUS* ASSOCIADO À BROTAÇÃO PRECOCE
EM MACIEIRA (*Malus x domestica* Borkh.)

Yohanna Evelyn Miotto
Eng. de Bioprocessos e Biotecnologia/Uergs

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Recursos Genéticos, Biotecnologia e Melhoramento
Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil
Janeiro de 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Miotto, Yohanna Evelyn
MAPEAMENTO GENÉTICO DE ALTA RESOLUÇÃO DO LOCUS
ASSOCIADO À BROTAÇÃO PRECOCE EM MACIEIRA (Malus x
domestica Borkh.) / Yohanna Evelyn Miotto. -- 2016.
68 f.

Orientadora: Carla Andrea Delatorre.

Coorientador: Luis Fernando Revers.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2016.

1. Dormência. 2. Macieira. 3. QTL. 4. Marcador
molecular. I. Delatorre, Carla Andrea, orient. II.
Revers, Luis Fernando, coorient. III. Título.

YOHANNA EVELYN MIOTTO
Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia - UERGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 26.01.2016
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 20.05.2020
Por

CARLA ANDRÉA DELATORRE
Orientadora - PPG Fitotecnia

CHRISTIAN BREDEMEIER
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

LUIS FERNANDO REVERS
Coorientador - EMBRAPA Uva e Vinho

LUIZ CARLOS FEDERIZZI
PPG Fitotecnia/UFRGS

ITAMAR CRISTIANO NAVA
PPG Fitotecnia/UFRGS

ANTONIO VARGAS DE OLIVEIRA FIGUEIRA
USP

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de
Agronomia

Dedico

Aos meus pais e meu irmão que
não mediram esforços para tornar
meus sonhos em realidade.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós Graduação em Fitotecnia pela oportunidade de realizar o mestrado.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos. E a Embrapa Uva e Vinho que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores Carla Andréa Delatorre e Luís Fernando Revers. Carla, agradeço a confiança, orientação, conhecimento, conselhos, preocupação e cuidado maternal. Luís, que acreditou no meu potencial para desenvolvimento deste trabalho, agradeço o apoio, conselhos, conhecimento repassado, amizade e confiança nos últimos cinco anos.

A pesquisadora Ana Beatriz Czermainski, pelas contribuições, ensinamentos, carinho e cuidado.

Ao pesquisador Diogo Denardi Porto, pela paciência, ensinamentos, empenho e disposição para explicações.

As Camilas, Lari e Thiago, pelas conversas, risadas e companhia nas avaliações de campo.

Aos professores do Departamento de Plantas de Lavoura, em especial ao professor Itamar Cristiano Nava pelo conhecimento passado e proveitosas discussões.

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

Aos colegas do Departamento de Plantas de Lavoura pela troca de conhecimento. Em especial Chico, Cristiano, Eduardo, Gabi, Gustavo, Itacir, Lais, Lili, Leo, Marcus, Matheus, Silmara e Tiago, por compartilhar as alegrias, conquistas e também o conhecimento.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular Vegetal, Dani, Jaiana, Julio, Patricia, Rafael, Roberta, Thiago e Vanessa pelo carinho e amizade. Em especial a Caru e ao Vitor pelo apoio e contribuições.

As minhas fiés escudeiras da pousada, Rafas, Candida, Giovana e em especial a Mari, por todos os sorrisos no final do dia.

A todos os meus amigos pela alegria e companhia, por todos os momentos que passamos juntos, difíceis ou felizes, Andri, Bruna, Carol, Came, Jordana, Jéssica, Rosália e Thaíses, muito obrigada. Em especial a Aniiiita, pelo incentivo, cuidado, e por ser meu porto em Porto Alegre.

Aos meus amores supremos, Edemir, Dilva e Edemir Jr. simplesmente obrigada!
E a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.
Muito obrigada!

MAPEAMENTO GENÉTICO DE ALTA RESOLUÇÃO DO *LOCUS* ASSOCIADO À BROTAÇÃO PRECOCE EM MACIEIRA (*Malus x domestica* Borkh.)¹

Autora: Yohanna Evelyn Miotto
Orientadora: Carla Andréa Delatorre
Coorientador: Luís Fernando Revers

RESUMO

A macieira (*Malus x domestica* Borkh.) assim como as demais frutíferas de clima temperado possui a capacidade de suspender seu crescimento em resposta a condições ambientais não favoráveis, levando a planta a um estado de dormência. Para que ocorra a superação deste processo, é necessário o acúmulo de horas de frio durante os meses de inverno. O objetivo do trabalho é aumentar o número de marcadores presentes no *locus* associado à brotação precoce em macieira e identificar potenciais marcadores moleculares para uso na seleção assistida de genótipos quanto à época de brotação. Os genótipos da população F₁ de estudo segregaram para a característica fenotípica data de brotação. O ressequenciamento dos genitores possibilitou a identificação de 182 novos SNPs localizados no *locus* associado à brotação vegetativa. Destes, 114 se mostraram polimórficos na população. Trinta e três foram agrupados com sucesso no mapa do genitor ‘M13/91’ e 34 no mapa do genitor ‘Fred Hough’ aumentando a densidade de marcadores presentes no *locus*. Um QTL majoritário foi identificado na extremidade do grupo de ligação 9. Nesta região foram mapeados seis marcadores genéticos explicando de 26,5 a 54,5% da variação fenotípica. Os marcadores demonstraram elevada associação com o fenótipo de brotação precoce. Nesta região, localiza-se o gene *FLC-like*, um dos reguladores principais do florescimento em plantas modelo. Estes resultados sustentam a hipótese de que a extremidade do grupo de ligação 9 possui fatores genéticos altamente herdáveis associados ao controle do requerimento de frio hibernal em macieira e os polimorfismos identificados podem ter potencial de uso em estratégias de melhoramento assistido.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (68 f.) Janeiro, 2016.

HIGH-DENSITY GENETIC MAP FOR APPLE BUDBREAK *LOCUS*¹

Author: Yohanna Evelyn Miotto
Adviser: Carla Andréa Delatorre
Co-Adviser: Luís Fernando Revers

ABSTRACT

Apple trees (*Malus x domestica* Borkh.) have the ability to suspend their growth in response to unfavorable environmental conditions, taking the plant to a dormant state. In order to overcome dormancy, prolonged exposure to chilling temperatures is necessary. This study aimed to increase the number of markers in the *locus* associated with time of budbreak date, to identify new molecular markers and haplotypes with potential use in marker assisted breeding and to characterize candidate genes linked to dormancy control in apple. The F₁ population showed segregation for budbreak time. De novo sequencing of the genitors allowed identification of 182 new SNPs located within the *locus* linked to vegetative budbreak. Of these, 114 were polymorphic in the population studied. Thirty-three markers were successfully integrated into the map of the ‘M13/91’ parent and 34 into the the map of the ‘Fred Hough’ parent, increasing the density of markers within the *locus*. One major QTL was identified at the end of the linkage group 9. Six markers were significantly associated with the major QTL for budbreak date, explaining 26.5 to 54.5% of the total phenotypic variation observed. The markers demonstrated high association with early budbreak phenotype. Inside this region, the *FLC-like* gene, a major regulator of flowering control in model plants *locus*, is localized. Our results support the existence of highly heritable genetic factors associated with the control of the chilling requirement on apple trees at the end of linkage group 9.

¹Master Dissertation in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (68 p.) January, 2016.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivo geral.....	4
1.2 Objetivos específicos.....	4
2 CAPÍTULO I.....	5
2.1 Cultivo da macieira.....	6
2.2 Dormência de gemas.....	7
2.3 Controle molecular da dormência e do florescimento.....	10
2.4 Melhoramento genético assistido por marcadores moleculares.....	12
2.5 Referências bibliográficas.....	16
3 CAPÍTULO II.....	20
3.1 Introdução.....	21
3.2 Material e métodos.....	24
3.3 Resultados e discussão.....	28
3.4 Material suplementar.....	46
3.5 Referências bibliográficas.....	52
4 CONCLUSÕES GERAIS.....	56
ANEXO A.....	57
ANEXO B.....	58
5 VITA.....	59

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO I	
1. Modelo de indução do florescimento. Adaptado de Horvath (2009).....	11
CAPÍTULO II	
2. Distribuição de frequências de brotação vegetativa dos indivíduos da população F1 originada do cruzamento entre ‘M13/91’ e ‘Fred Hough’ nas áreas experimentais de Bento Gonçalves e Vacaria em todos os anos de avaliação. Coluna da esquerda representa a área experimental de Bento Gonçalves. Coluna da direita representa a área experimental de Vacaria. O número de classes foi definido pela Regra de Sturges ($k=1+3,3\log [n]$)..	32
3. Mapa de ligação do grupo de ligação 9 para os parentais ‘M13/91’ e ‘Fred Hough’. Marcadores comuns para ambos os genitores são identificados pela cor vermelha e ligados por linhas vermelhas. A distância genética dos grupos de ligação é apresentada em ordem crescente de cima para baixo, à esquerda em cM. Marcadores KASP são designados pela sigla <i>drm_qtl_snrnt</i>	36
4. Posição do QTL identificado para tempo de BV no grupo de ligação 9 para os parentais ‘Fred Hough’ e ‘M13/91’ nos diferentes anos e locais. A) ‘Fred Hoguh’; B) ‘M13/91’ em Bento Gonçalves; C) ‘Fred Hoguh’; D) ‘M13/91’ em Vacaria.....	42
5. Distribuição da frequência da média dos anos da variável fenotípica BV da progênie resultante do cruzamento entre ‘M13/91’ e ‘Fred Hough’ com relação as classes alélicas dos marcadores moleculares na área experimental de Bento Gonçalves. A) TC_447971_LG9; B) TC_465054_LG9; C) CA_506758_LG9; D) <i>drm_qtl_snrnt113</i> ; E) <i>drm_qtl_snrnt137</i> e F) <i>drm_qtl_snrnt147</i>	44
6. Distribuição da frequência da média dos anos da variável fenotípica BV da progênie resultante do cruzamento entre ‘M13/91’ e ‘Fred Hough’ com relação as classes alélicas dos marcadores moleculares na área experimental de Vacaria. A) TC_447971_LG9; B) TC_465054_LG9; C) CA_506758_LG9; D) <i>drm_qtl_snrnt113</i> ; E) <i>drm_qtl_snrnt137</i> e F) <i>drm_qtl_snrnt147</i>	45

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO II	
1. Número de dias para brotação após a data zero (primeiro de junho) nos campos experimentais de Bento Gonçalves e Vacaria.....	30
2. QTL detectado para BV no grupo de ligação 9 para os genitores 'Fred Hough' e 'M13/91' da população F1 nas áreas experimentais de Bento Gonçalves e Vacaria em diferentes anos.....	39
3. Teste de χ^2 para hipótese de independência entre a média dos anos da variável fenológica BV da progênie resultante do cruzamento entre 'M13/91' e 'Fred Hough' com relação as classes alélicas dos marcadores moleculares na área experimental de Bento Gonçalves.....	44
4. Teste de χ^2 para hipótese de independência entre a média dos anos da variável fenológica BV da progênie resultante do cruzamento entre 'M13/91' e 'Fred Hough' com relação as classes alélicas dos marcadores moleculares na área experimental de Vacaria.....	45

1 INTRODUÇÃO

Espécies frutíferas de clima temperado apresentam uma grande importância econômica e sua produção está intimamente relacionada com o processo de dormência. Este processo é controlado por estímulos ambientais, principalmente baixas temperaturas e mudanças no fotoperíodo. A macieira é um exemplo de frutífera de clima temperado que necessita de estímulo do frio para a queda de folhas e indução da dormência. Para que um novo ciclo vegetativo e reprodutivo inicie, é necessário que as plantas sejam expostas a uma condição de frio intenso e regular para que ocorra a indução da brotação. Os mecanismos que controlam a entrada e a superação da dormência são altamente afinados e herdáveis. Assim, diferentes genótipos possuem diferentes exigências de frio hibernar. Estudos demonstram que a exigência está relacionada com a região de origem da espécie e que o requerimento de frio está sob um forte controle genético.

As alterações climáticas têm um grande impacto na produção comercial da macieira. Diversos modelos de previsões climáticas futuras reportam o aumento das temperaturas médias globais entre 1,0 e 2,5°C até 2050, resultando em invernos mais amenos. De maneira geral, o aumento das temperaturas nos meses de inverno prejudica a superação da dormência, ocasionando irregularidades na brotação/floração e, conseqüentemente, uma menor produção. As cultivares Fuji e Gala, que respondem por quase a totalidade da produção brasileira, requerem um elevado número de horas

de frio (temperaturas abaixo de 7,2°C) para a superação da dormência e a produção economicamente viável. A competitividade da produção é baseada em manejo tecnificado com emprego de agentes químicos de quebra de dormência como a cianamida hidrogenada. Esforços de diversos grupos de pesquisa brasileiros possibilitaram o desenvolvimento de cultivares comerciais com menor exigência de frio hibernal, como a cultivar Eva, desenvolvida em parceria pelo Instituto Agrônomo do Paraná e Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Outras cultivares, como Daiane (resistente à mancha de Glomerela), Imperatriz (dupla finalidade – polinizadora e produtora) e Monalisa (resistente à sarna da macieira e com baixo requerimento de frio) vêm sendo introduzidas, porém ainda representam menos de 5% da área plantada.

O desenvolvimento de cultivares melhor adaptadas às condições climáticas atuais e futuras do Sul do Brasil é a alternativa mais promissora para sustentar a pomicultura nesse ambiente em mudança. Portanto, compreender os mecanismos genéticos responsáveis por esta característica pode permitir o desenvolvimento de novas estratégias para atingir esse objetivo. Estas mudanças exigirão cultivares cada vez menos exigentes em horas de frio hibernal para que a cadeia produtiva brasileira de maçã permaneça competitiva.

O melhoramento de culturas que apresentam período de juvenilidade extenso é um processo dispendioso e demorado. O uso de ferramentas de biotecnologia associadas ao melhoramento clássico pode acelerar este processo, bem como reduzir a área necessária para avaliação. A identificação de marcadores moleculares via mapeamento genético, com potencial aplicação nos programas de melhoramento contribuem para acelerar o desenvolvimento de novas cultivares e manter a competitividade da produção. Estudos de mapeamento genético, além da identificação

de marcadores moleculares, possibilitam a definição de QTL (*Quantitative Trait Loci*) associados a genes que controlam a característica de interesse. A definição do *locus* genético associado ao caráter de interesse permite a identificação e caracterização dos possíveis genes atuantes. Portanto, compreender os mecanismos genéticos responsáveis pela saída da dormência permite refinar e aprimorar a seleção de genótipos melhor adaptados às condições de cultivo Sul-brasileiras.

Recentemente, um *locus* associado à época de brotação precoce em macieira foi identificado empregando exclusivamente marcadores SNP (*Single Nucleotide Polimorfism*) em uma população F₁. Dezesete grupos de ligação foram obtidos para cada genitor, cobrindo 1361 cM para o genitor ‘M13/91’ e 1066 cM para ‘Fred Hough’. A análise das datas de brotação vegetativa durante o ciclo 2011/2012 separou os genótipos em dois grupos, tardios e precoces. A correlação dos dados fenotípicos com dados genotípicos associou a extremidade do grupo de ligação 9 com a característica avaliada. Nesta região foram mapeados quatro marcadores genéticos, explicando de 32,3% a 73,4% da variação fenotípica observada. Um intervalo de confiança correspondente a este QTL já havia sido estabelecido no genoma da macieira como sendo os primeiros 4.039.768 pares de bases do cromossomo 9, contendo cerca de 983 modelos gênicos preditos.

O mapeamento em alta resolução desta região poderá identificar marcadores moleculares que delimitem este QTL com maior precisão, permitindo, desta forma, a possibilidade de desenvolver uma ferramenta de genotipagem específica para este *locus* com grande potencial de uso como ferramenta adicional na seleção de genótipos com menor requerimento de frio hibernal.

1.1 Objetivo geral

O objetivo do trabalho é identificar fatores genéticos e moleculares controladores da superação do processo de dormência, bem como associar um conjunto de marcadores moleculares à precocidade da brotação em macieira.

1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar fenotipicamente indivíduos de populações F₁ com relação à data de brotação vegetativa;

- Aumentar a densidade de marcadores dentro do intervalo de confiança do QTL definido por Tessele (2012);

- Definir um conjunto de marcadores moleculares para uso na seleção de genótipos de macieira com baixo requerimento de frio hibernal.

2 CAPÍTULO I

Base genética e molecular da dormência em frutíferas de clima temperado

2.1 Cultivo da macieira

A macieira é uma das frutíferas mais cultivadas mundialmente e, economicamente, é a quarta mais importante atrás apenas de citros, uva e banana (FAO, 2015). O Brasil encontra-se entre os dez maiores produtores mundiais de maçã (FAO, 2015). Em levantamentos realizados pela Associação Brasileira de Produtores de Maçãs (ABPM), verificou-se que na safra de 2013/2014 a área plantada era de cerca de 38.000 ha com uma produção estimada de 1,16 milhões de toneladas. A região sul do país responde pela maior parte da produção nacional, sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor, responsável por 50% da produção, seguido de Santa Catarina com 46% e Paraná com 4% (ABPM, 2015). A produção é concentrada em poucas cultivares, sendo que na safra 2009/2010, as cultivares Gala, Fuji e clones de seus mutantes somáticos responderam por 94,6% da produção de maçãs do país (Fioravanço *et al.*, 2010).

Pertencente à família Rosaceae, da tribo Maleae, a macieira é uma frutífera de clima temperado, que abrange cerca de 100 gêneros e mais de 2000 espécies. A Ásia central é considerada o centro de diversidade e dispersão deste gênero de frutífera lenhosa, decídua e temperada (Petri *et al.*, 2006; Folta e Gardiner, 2009). A espécie é caracterizada por ter plantas que apresentam porte pequeno a médio, caducifólia e ser muito adaptável a diferentes climas, crescendo desde os trópicos até altas latitudes. Todos os brotos têm origem nas gemas, que podem estar dispostas ao longo dos ramos longos (maiores que 20 cm) ou ramos curtos, brindilas (entre 5 e 20 cm) e esporões (até 5 cm). Quanto à posição, estes podem ser apicais na ponta dos ramos, ou laterais, na axila da folha. As flores se dispõem em inflorescências hermafroditas, com reprodução predominantemente alógama. A polinização cruzada realizada por insetos

é necessária devido à autoincompatibilidade. O fruto é um pomo variável em tamanho, coloração da epiderme, forma, textura e sabor da polpa (Petri *et al.*, 2006).

A frutificação e a produção estão associadas ao desenvolvimento adequado de gemas, que depende, entre outros fatores, de condições climáticas adequadas para superação da dormência (Petri *et al.*, 2006). Temperaturas baixas contínuas nos meses de inverno são indispensáveis para que a planta inicie um novo ciclo vegetativo na primavera, com brotação e floração normais (Horvath *et al.*, 2003; Lang *et al.*, 1987; Petri *et al.*, 2006). Além das temperaturas de inverno, as condições climáticas da primavera influenciam na produção. Geadas tardias e temperaturas baixas podem afetar negativamente o desenvolvimento dos frutos (Petri *et al.*, 2006).

A maioria das espécies de rosáceas apresenta de sete a nove cromossomos, enquanto que o cariótipo de indivíduos pertencentes as espécies da tribo Maleae apresenta 17 cromossomos haploides. Análises de mapeamento genômico indicaram forte colinearidade entre os cromossomos desta tribo, sugerindo que uma duplicação genômica recente resultou na transição de um conjunto de nove cromossomos ancestrais para os 17 cromossomos atualmente presentes (Velasco *et al.*, 2010). Recentemente, o genoma da cultivar ‘Golden Delicious’ foi publicado, sendo que os *contigs* (sequências de DNA construídas através da sobreposição de um conjunto de diferentes DNAs) gerados cobriram 603,9 do total estimado de 742,3 megabases do genoma da macieira, representando uma cobertura de 81,3% (Velasco *et al.*, 2010).

2.2 Dormência de gemas

Plantas perenes de clima temperado, tais como a macieira, distinguem-se de outras plantas por possuírem a capacidade de suspender seu crescimento em resposta a condições ambientais não favoráveis (Rohde e Bhalerao, 2007). Essa capacidade é

resultante de uma série de mecanismos de percepção de estímulos ambientais que inibem o crescimento e o desenvolvimento vegetativo, levando a planta a um estado de dormência (Arora *et al.*, 2003; Horvath *et al.*, 2003). Lang *et al.* (1987) descreveram três tipos de dormência em gemas: *i*) paradormência, a qual é regulada por fatores fisiológicos externos à estrutura da planta afetada; *ii*) endodormência, onde a inibição do crescimento da gema reside internamente à própria estrutura afetada, sendo induzida em resposta ao frio e/ou ao fotoperíodo; e *iii*) ecodormência, sendo o crescimento inibido por condições ambientais desfavoráveis como temperaturas extremas, deficiência de nutrientes e estresses hídricos. As gemas de uma planta podem estar simultaneamente sob diferentes estádios de dormência, em função disto, uma determinada gema pode estar sob a ação de um ou mais sinais ambientais que regulam a dormência (Faust *et al.*, 1997).

A entrada da dormência é caracterizada pela parada do crescimento, formação de gemas e senescência foliar. Uma vez que este processo se estabelece, para superá-lo é necessária a exposição a longos períodos de baixas temperaturas (temperaturas inferiores a 7,2°C). A exposição prolongada ao frio culmina com a entrada em ecodormência (Horvath *et al.*, 2003). Diferentemente da maioria das espécies perenes, algumas plantas da família Rosaceae, incluindo a macieira e a pereira, possuem a progressão da dormência controlada principalmente por baixas temperaturas (Heide e Prestrud, 2005). Os mecanismos que regulam a liberação da dormência são altamente hereditários e regulados, sendo assim considerados uma importante característica agrônômica (Labuschagné *et al.*, 2002; Fanet *et al.*, 2010). Genótipos que apresentam baixo requerimento de frio hibernal (RFH) são suscetíveis a danos causados por geadas tardias, enquanto que genótipos com alto RFH podem não acumular horas de frio suficientes para quebra de dormência, resultando em irregularidades na brotação (Petri,

2006; Fanet *et al.*, 2010). O RFH é considerado um caráter determinado geneticamente e provavelmente poligênico (Howe *et al.*, 2000).

Para o cálculo do somatório das horas de frio requeridas para superação da dormência em frutíferas utiliza-se a temperatura limite de 7,2°C (45°F; Chandler *et al.*, 1937), onde a exposição a cada temperatura igual ou abaixo desta por uma hora equivale a uma hora de frio hibernal. Após a exposição prolongada a temperaturas inferiores a 7,2°C a planta terá seu requerimento de frio hibernal satisfeito, e iniciará um novo ciclo vegetativo e reprodutivo (Horvath *et al.*, 2003; Rohde e Bhalerao, 2007).

O processo de dormência é bastante estudado em espécies de clima temperado. QTL foram mapeados para RFH, data de brotação e floração em diversas espécies incluindo damasco (Olukolu *et al.*, 2009; Campoy *et al.*, 2011), amêndoas (Sánchez-Pérez *et al.*, 2012), cereja (Dirlewanger *et al.*, 2012), pêssigo (Fan *et al.*, 2010; Romeu *et al.*, 2014; Zhebentyayeva *et al.*, 2014) e macieira (Van Dyk *et al.*, 2010; Celton *et al.*, 2011; Tessele, 2012). Em álamo, diversos genes relacionados com floração foram localizados dentro de QTL mapeados, como os genes *PHYTOCHROME B (PHYB)*, *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *CONSTANS (CO)* e *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* (Rohde *et al.*, 2011). Em uma população segregante F₂ de *Prunus*, Zhebentyayeva *et al.* (2014) definiram haplótipos de baixo e alto RFH, além de identificarem genes candidatos à regulação do RFH, entre estes genes, destacam-se dois, *DORMANCY ASSOCIATED MADS-box (DAM)*, *PpeDAM5* e *PpeDAM6*. Genes *DAM* estão relacionados à interrupção do crescimento vegetativo e à formação da gema terminal em pessegueiro (Bielenberg *et al.*, 2008).

2.3 Controle molecular da dormência e do florescimento

A percepção de variações na temperatura e no fotoperíodo possui importante papel na regulação da mudança da fase juvenil à fase reprodutiva, na progressão da dormência e da floração. Sendo assim, variações no comprimento do dia e mudanças de temperatura regulam rotas de transição floral (Penfield, 2008; Amasino e Michaelis, 2010; Kurokura *et al.*, 2013). Os mecanismos moleculares que controlam a saída da dormência e floração são objetos de intensa pesquisa, e estudos sugerem que este processo é determinado por diversos genes.

O promotor floral CO é regulado por genes que atuam na percepção do fotoperíodo, como *PHYTOCHROME A (PHYA)* e *CRYPTOCHROME 1 (CRY1)*. O acúmulo de CO em dias longos induz a transcrição do gene *FT* nas folhas. O mRNA e a proteína de FT são transportados até o broto apical, onde é induzida a formação de flores (Amasino e Michaelis, 2010; Kurokura *et al.*, 2013). No broto apical, a proteína FT induz a floração pela ativação de genes de identidade meristemática, como *APETALA1 (API)*, e genes de integração floral, como *SUPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)*. Sob influência de dias curtos, ácido giberélico (GA) é produzido nas folhas e transportado até o broto apical, induzindo a floração pela indução dos genes *SOC1* e *LFY* (Wilkie *et al.*, 2008; Horvath, 2009).

O gene *FLOWERING LOCUS C (FLC)* é um fator de transcrição MADS-box que atua como repressor floral em *Arabidopsis thaliana*, sendo induzido pelo gene *FRIGIDA (FRI)*. O produto do gene *FLC* reprime, em nível transcricional, genes-chave na promoção da floração, como *FT*, *FD* e *SOC1* (Wilkie *et al.*, 2008; Amasino e Michaelis, 2010; Kurokura *et al.*, 2013). O processo de vernalização é um dos responsáveis pela repressão do gene *FLC* (Amasino e Michaelis, 2010; Kurokura *et al.*, 2013). Vernalização é um processo onde a exposição prolongada ao frio torna as

2.4 Melhoramento genético assistido por marcadores moleculares

Um dos objetivos dos melhoristas de frutíferas de clima temperado é o desenvolvimento de cultivares melhor adaptadas aos locais de produção (Labuschagne *et al.*, 2002). O processo de desenvolvimento de uma nova cultivar de macieira é lento e laborioso, uma vez que esta apresenta elevada heterozigose e interações gênicas complexas. Devido a isto, faz-se necessário um elevado número de cruzamentos e populações segregantes compostas por um grande número de indivíduos (Janick *et al.*, 1996). Outro fator a ser considerado no melhoramento de macieira, é a fase juvenil da planta, um período que dura de quatro a dez anos, e que não permite durante este período a avaliação de características relacionadas com produção (Gardiner *et al.*, 2007). O período de juvenilidade aumenta o número de anos necessário para a avaliação das progênes, aumentando o espaço e uso de mão de obra para condução das populações. A análise de QTL permite explorar fatores genéticos envolvidos no controle de características de interesse agrônomico e mapear os *loci* correspondentes. A definição das regiões controladoras do caráter podem ser utilizadas no melhoramento assistido por marcadores, possibilitando uma redução no tempo e o número de indivíduos necessário para seleção e desenvolvimento de novas cultivares (Gardiner *et al.*, 2007; Troggio *et al.*, 2012).

O mapeamento de QTL em espécies perenes, como a macieira, requer estratégias que possibilitem o uso de gerações iniciais, preferencialmente F₁. Assim sendo, geralmente é realizado a partir de populações bi-parentais pelo método duplo pseudo-cruzamento teste (Grattapaglia e Sederoff, 1994; Troggio *et al.*, 2012). A progênie resultante do cruzamento entre genitores altamente heterozigotos é equivalente a de um cruzamento teste para cada *locus*. Um dos genitores é utilizado como testador para a confirmação da segregação da progênie, estabelecendo-se duas

análises, uma para cada genitor, gerando dois mapas que podem ser unidos posteriormente (Vieira *et al.*, 2006).

Uma vez identificada variação alélica de interesse, as características fenotípicas resultantes desta variação devem ser cuidadosamente avaliadas. A abordagem clássica para identificar um *locus* de característica poligênica consiste na caracterização fenotípica de um grande número de indivíduos de uma população segregante. Posteriormente, uma análise estatística é realizada para identificar regiões no genoma que estão envolvidas com a característica avaliada. A fenotipagem dos indivíduos segregantes para a característica de interesse é um fator de extrema importância e determina o sucesso da identificação de QTL (Schneider, 2005).

Os mapas genéticos, ou mapas de ligação, são representações gráficas da localização relativa de marcadores genéticos e/ou caracteres fenotípicos nos cromossomos de uma espécie, determinadas pela frequência de recombinação destes marcadores ou caracteres em uma população segregante. A localização de QTL nos grupos de ligação, caracterização e quantificação de seus efeitos, número de *loci* associados a determinado caráter e distribuição no genoma permite o estudo das suas heranças, ajudando no aperfeiçoamento dos métodos de seleção e melhoramento (Vieira *et al.*, 2006).

Marcadores moleculares são segmentos de DNA que permitem diferenciar dois ou mais genótipos e possuem segregação Mendeliana. Eles permitem identificar características de interesse agrônomo em gerações precoces, assim como a seleção simultânea de várias características, reduzindo custos de mão de obra e tempo para o lançamento de novas cultivares (Borém e Caixeta, 2009). Marcadores do tipo SNPs são baseados na detecção de polimorfismos decorrentes de alterações de bases únicas no genoma. São marcadores de natureza bi-alélica encontrados em regiões codificantes

e não codificantes (Vignal *et al.*, 2002). Velasco *et al.* (2010) ao sequenciar o genoma da macieira, identificaram cerca de 4,4 SNPs por quilobase de DNA nuclear.

No melhoramento genético de macieira, este tipo de ferramenta tem sido empregado para caracterização de germoplasma, estudos de diversidade genética, construção de mapas genéticos, mapeamento de QTL e seleção assistida (Gardiner *et al.*, 2007). Apenas uma pequena parte da variabilidade genética da macieira tem sido utilizada para o mapeamento de QTL. Sendo que, os identificados até o momento representam um pequeno subconjunto dos que potencialmente podem ser utilizados para seleção assistida por marcadores. As características mais visadas são as relacionadas à qualidade de fruto, resistência a doenças e arquitetura de plantas (Troggio *et al.* 2012).

Em macieira, a extremidade do grupo de ligação 9, foi descrita como associada ao controle de brotação e floração. Populações provenientes do cruzamento entre ‘Anna’ (baixo RFH) e ‘Golden Delicious’ (alto RFH) e ‘Anna’ e ‘Sharpe’ (alto RFH) foram utilizados para mapeamento e análise de QTL (van Dyk *et al.*, 2010). Os mapas construídos, a partir de indivíduos F₁, empregaram 320 marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*). A análise de QTL resultou na identificação de um único QTL, no grupo de ligação 9, explicando cerca de 40% da variação fenotípica relacionada à brotação e floração (van Dyk *et al.*, 2010). Celton e colaboradores (2011) construíram mapas utilizando populações segregantes resultantes do cruzamento entre ‘Starkrimson’ e ‘Granny Smith’ e entre ‘X3263’ e ‘Belrène’. A análise de QTL para brotação confirmou o intervalo do grupo de ligação 9 encontrado por van Dyk *et al.* (2010). A região de interesse foi definida como os primeiros 4.039.768 pb do cromossomo nove, contendo cerca de 983 genes preditos (Celton *et al.*, 2011). Análises dessa região revelaram um enriquecimento das classes envolvidas em

sinalização, morte celular programada, ciclo celular e regulação biológica (Celton *et al.*, 2011). Além dos genes relacionados com ciclo celular, a presença de um gene predito com grande similaridade ao gene *FLC* de *Arabidopsis thaliana* (Tessele, 2012), sendo este caracterizado como repressor floral, demonstra existir uma associação da extremidade do cromossomo nove com as características relacionadas à saída da dormência em macieira. Trabalhos envolvendo genótipos com constituições genéticas diferentes, bem como em condições climáticas distintas, compartilharam a mesma região genômica como sendo a responsável pelo controle de grande parte da superação da dormência (Falavigna *et al.*, 2015). A sobreposição de intervalos de QTL em diferentes progênies fortemente sugere um mecanismo genético comum de regulação da dormência em macieira.

O sequenciamento do genoma da cultivar ‘Golden Delicious’ (Velasco *et al.*, 2010) possibilita o desenvolvimento *in silico* de novos marcadores moleculares específicos para regiões de interesse. Aliado às tecnologias de sequenciamento de nova geração, permite o desenvolvimento de mapas genéticos de alta resolução, que auxiliam na dissecação e identificação precisa dos efeitos genéticos de QTL (Zalapa *et al.*, 2012).

2.5 Referências bibliográficas

- ABPM - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MAÇÃ. [Dados obtidos da página]. Fraiburgo, [2015]. Disponível em: <http://www.abpm.org.br/>. Acesso em: 15 dez. 2015.
- AMASINO, R. M.; MICHAELS, S. D. The timing of flowering. **Plant Physiology**, Rockville, v. 154, p. 516-520, 2010.
- ARORA, R.; ROWLAND, L. J.; TANINO, K. Induction and release of bud dormancy in woody perennials: a science comes of age. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 38, n. 5, p. 911-921, 2003.
- BIELENBERG, D. G. *et al.* Sequencing and annotation of the evergrowing *locus* in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 4, n. 3, p. 495–507, 2008.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 374 p.
- CAMPOY, J. A. *et al.* Inheritance of flowering time in apricot (*Prunus armeniaca* L.) and analysis of linked quantitative trait *loci* (QTLs) using simple sequence repeat markers. **Plant Molecular Biology Report**, New York, v. 29, n. 2, p. 404–410, 2011.
- 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. **The New Phytologist**, Oxford, v. 192, n. 2, p. 378–392, 2011.
- CHANDLER, W. H. *et al.* **Chilling requirements for opening of buds on deciduous orchard trees and some other plants in California**. Berkeley: University of California, 1937. (Bulletin, 611).
- DIRLEWANGER, E. *et al.* Comparison of the genetic determinism of two key phenological traits, flowering and maturity dates, in three *Prunus* species: peach, apricot and sweet cherry. **Heredity**, London, v. 109, p. 280–292, 2012.
- FALAVIGNA, V. S. *et al.* Recent advances in genetics and molecular control of bud dormancy in pipfruits. In: ANDERSON, J. V. (ed.). **Advances in plant dormancy**. Cham: Springer, 2015. p. 107-122.
- FAN, S. *et al.* Mapping quantitative trait *loci* associated with chilling requirement, heat requirement and bloom bate in peach (*Prunus persica*). **The New Phytologist**, Oxford, v. 185, n. 4, p. 917-930, 2010.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. [Dados obtidos da página]. Rome, [2015]. Disponível em: <http://www.fao.org/home/en/>. Acesso em: 15 dez. 2015.

FAUST, M. *et al.* Bud dormancy in perennial fruit trees: physiological basis for dormancy induction, maintenance, and release. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 32, n. 4, p. 623-629, 1997.

FIORAVANÇO, C. *et al.* **Cultura da macieira no Rio Grande do Sul**: análise situacional e descrição varietal. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. (Documentos, 71).

FOLTA, K. M.; GARDINER, S. E. **Genetics and genomics of rosaceae**. New York: Springer, 2009.

GARDINER, S. E. *et al.* Apple. In: KOLE, C. (ed.). **Fruits and nuts**. Berlin: Springer, 2007. v. 4, p. 1-62. (Genome mapping and molecular breeding in plants, v. 4).

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, Baltimore, v. 137, n. 4, p. 1121–1137, 1994.

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**, Victoria, v. 25, p. 109–114, 2005.

HORVATH, D. P. Common mechanisms regulate flowering and dormancy. **Plant Science**, New York, v. 177, n. 6, p. 523-531, 2009.

HORVATH, D. P. *et al.* Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 8, n. 11, p. 534-540, 2003.

HOWE, G. T. Quantitative genetics of bud phenology, frost damage, and winter survival in a F₂ family of hybrid poplars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, p. 632-642, 2000.

JANICK, J. *et al.* Apples. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (ed.). **Fruit breeding**. New York: John Wiley, 1996. v. 1, p. 1-77.

KUROKURA, T. *et al.* The regulation of seasonal flowering in the Rosaceae. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 14, p. 4131-4141, 2013.

LABUSCHAGNÉ, I. F. *et al.* Genetic variation in chilling requirement in apple progeny. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, VA, v. 127, n. 4, p. 663-672, 2002.

LANG, G. A. Dormancy: a new universal terminology. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 22, n. 5, p. 817-820, 1987.

LONGHI, S. *et al.* Validation of a functional molecular marker suitable for marker-assisted breeding for fruit texture in apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 32, n. 4, p. 841-852, 2013.

- OLUKOLU, B. A. *et al.* Genetic linkage mapping for molecular dissection of chilling requirement and bud break in apricot (*Prunus armeniaca* L.). **Genome**, Ottawa, v. 52, n. 10, p. 819–828, 2009.
- PENFIELD, S. Temperature perception and signal transduction in plants. **The New Phytologist**, Oxford, v. 179, n. 3, p. 615-628, 2008.
- PETRI, J. L. *et al.* Dormência e indução à brotação em macieira. *In: A CULTURA da macieira*. Florianópolis: EPAGRI, 2006. p. 261-297.
- PORTO, D. D. *et al.* Transcription profiling of the chilling requirement for bud break in apples: a putative role for *FLC*-like genes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 9, p. 2659-2672, 2015.
- ROETZER, T. Phenology in central Europe – differences and trends of spring phenophases in urban and rural areas. **International Journal of Biometeorology**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p. 60-66, 2000.
- ROHDE, A.; BHALERAJ, R. P. Plant dormancy in the perennial context. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 12, n. 5, p. 217-223, 2007.
- ROHDE, A. *et al.* Bud set in poplar – genetic dissection of a complex trait in natural and hybrid populations. **The New Phytologist**, Oxford, v. 189, n. 1, p. 106–121, 2011.
- ROMEU, J. F. *et al.* Quantitative trait loci affecting reproductive phenology in peach. **BMC Plant Biology**, London, v. 14, [art.] 52, p. [1-16], 2014.
- SÁNCHEZ-PÉREZ, R.; DICENTA, F.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, P. Inheritance of chilling and heat requirements for flowering in almond and QTL analysis. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 8, n. 2, p. 379–389, 2012.
- SCHNEIDER, K. Mapping populations and principles of genetic mapping. *In: MEKSEM, K.; KAHL, G. (ed.). The Handbook of plant genome mapping: genetic and physical mapping*. Weinheim: Wiley, 2005. p. 3-22.
- TESSELE, C. **Mapeamento genético em populações de maçã (*Malus x domestica* Borkh.) segregando para caracteres agronômicos associados à exigência de frio hibernal**. 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- TROGGIO, M. *et al.* Apple, from genome to breeding. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 8, n. 3, p. 509–529, 2012.
- 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**, Heidelberg, v. 6, n. 3, p.489–502, 2010.

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

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

VIGNAL, A. *et al.* A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, London, v. 34, n. 3, p. 275-305, 2002.

WILKIE, J. D.; SEDGLEY, M.; OLESEN, T. Regulation of floral initiation in horticultural trees. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 12, p. 3215–3228, 2008.

ZALAPA, J. E. *et al.* Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) *loci* in the plant sciences. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 99, n. 2, p. 193-208, 2012.

ZHEBENTYAYEVA, T. N. *et al.* Dissection of chilling and bloom date QTLs in peach using a whole genome sequencing of sibling trees from an F₂ mapping population. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 10, n. 1, p. 35-51, 2014.

3 CAPÍTULO II

Mapeamento genético de alta resolução do *locus* associado à brotação precoce em macieira (*Malus x domestica* Borkh.)

3.1 Introdução

A macieira é uma das frutíferas mais cultivadas mundialmente, sendo que o Brasil se encontra entre os vinte maiores produtores mundiais (FAO, 2015). A produção na safra 2013/2014, segundo a Associação Brasileira dos Produtores de Maçã (2015) foi de 1,16 milhões de toneladas, com uma área cultivada de 38.000 ha. Assim como as demais frutíferas de clima temperado, a macieira possui a capacidade de interromper seu crescimento em resposta a condições desfavoráveis. Essa interrupção é um mecanismo adaptativo que permite a planta proteger os meristemas de condições climáticas desfavoráveis (Horvath *et al.*, 2003; Rohde e Bhalerao, 2007). A entrada em dormência é caracterizada pela parada do crescimento, formação de gemas e senescência foliar em resposta ao estímulo das baixas temperaturas (Heide e Prestrud, 2005). Uma vez que este processo se estabelece, para superá-lo é necessária a exposição a longos períodos de baixas temperaturas (temperaturas inferiores a 7,2°C; Horvath *et al.*, 2003). A não ocorrência adequada de frio no período do inverno resulta em brotação e florescimento irregulares, resultando em desenvolvimento vegetativo e reprodutivo deficientes (Heide e Prestrud, 2005). O requerimento de frio hibernal (RFH) é uma importante característica agrônômica, geneticamente controlada e altamente herdável (Labuschagne *et al.*, 2002; Campoy *et al.*, 2011).

Entre as frutíferas de clima temperado, a macieira é considerada uma das mais exigentes em RFH. De maneira geral, as principais cultivares produzidas no Brasil requerem cerca de 800 horas de frio (HF) para superação da dormência (Petri, 2006; Fioravanço *et al.*, 2010). As mudanças climáticas ocasionadas pelo aquecimento global tendem a contribuir para um cenário de aumento das temperaturas médias mundiais. Projeta-se um aumento na temperatura da região sul entre 0 e 2,5°C até 2050,

resultando em uma diminuição das HF acumuladas (Campoy *et al.*, 2011). O aumento das temperaturas nos meses de inverno prejudica a superação da dormência, podendo comprometer a produtividade das culturas de clima temperado futuramente (Petri, 2006; Botelho *et al.*, 2006, Campoy *et al.*, 2011). Estas mudanças sinalizam a necessidade crescente do desenvolvimento de cultivares menos exigentes em RFH, possibilitando a manutenção da competitividade da produção brasileira. Portanto, compreender os mecanismos genéticos responsáveis por este fenótipo pode permitir o desenvolvimento de novas estratégias para atingir esse objetivo.

Recentemente, um *locus* associado à época de brotação precoce em macieira foi identificado empregando exclusivamente marcadores do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) em uma população F₁ de macieira (Tessele, 2012). Segura *et al.* (2007) usando plântulas resultantes do cruzamento entre ‘Starkrimson’ e ‘Granny Smith’ identificou dois QTL (*Quantitative trait loci*) para tempo de brotação. Ainda, um estudo com duas populações com um genitor comum, ‘Anna’ e ‘Golden Delicious’ e ‘Anna’ e ‘Sharpe’, identificou um QTL de grande efeito para tempo de brotação no grupo de ligação 9 (van Dyk *et al.*, 2010). Em um estudo similar, Celton *et al.* (2011) utilizando indivíduos resultantes do cruzamento entre ‘Starkrimson’ e ‘Granny Smith’ e ‘X3263’ e ‘Belrène’ confirmaram o QTL de grande efeito encontrado por van Dyk *et al.* (2010). A região do QTL foi definida no genoma da macieira como os primeiros 4 milhões de pares de base (pb) no cromossomo 9 (Celton *et al.*, 2011, Tessele, 2012).

Mapas genéticos de ligação de alta densidade são ferramentas essenciais para a realização de estudos genéticos. Eles possibilitam a delimitação precisa do intervalo do QTL, facilitando a definição de marcadores para uso na seleção assistida e a identificação dos genes ali presentes (Zalapa *et al.*, 2012). Em macieira, trabalhos envolvendo mapeamento de alta resolução já foram realizados para diversas

características de interesse, incluindo hábito colunar (Moriya *et al.*, 2012; Morimoto e Banno, 2015), qualidade do fruto (Xu *et al.*, 2011; Cappellin *et al.*, 2015) e resistência a doenças (Galli *et al.*, 2010; Parravicini *et al.*, 2011; Cova *et al.*, 2015). Ainda não existem relatos na literatura de trabalhos que envolvam mapeamento de alta resolução para melhor delimitação do *locus* associado à brotação. Assim, o mapeamento em alta resolução desta região poderá identificar marcadores moleculares que delimitem este QTL com maior precisão, possibilitando o desenvolvimento de uma ferramenta de genotipagem específica para este *locus* com grande potencial de uso em seleção assistida por marcadores (SAM).

Adaptação climática é um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético de macieira. Entretanto, o longo período de juvenilidade, bem como, a auto-incompatibilidade representam um inconveniente para o desenvolvimento de novas cultivares. O desenvolvimento de novos materiais requer um longo período de seleção, uma vez que características relacionadas com produtividade e requerimento de frio, só podem ser avaliadas na fase adulta (Janick *et al.*, 1996; Gardiner *et al.*, 2007). Marcadores moleculares baseados em mapas genéticos apresentam um grande potencial de uso rotineiro nos programas de melhoramento. A utilização destes permite reduzir o número de genótipos a serem mantidos a campo até a idade adulta. Possibilitando que as avaliações sejam realizadas antes dos materiais irem a campo, reduzindo os custos e o tempo necessário para o desenvolvimento de novas variedades nos programas de melhoramento (Maliepaard *et al.*, 1998). O desenvolvimento contínuo de novas ferramentas de genotipagem em alta densidade permitem avanços na identificação de marcadores moleculares. Após a validação, estes apresentam um grande potencial de implementação na rotina dos programas de melhoramento, facilitando o planejamento de cruzamentos bem como a

seleção de características fenotípicas de interesse (Janick *et al.*, 1996; Gardiner *et al.*, 2007).

O objetivo principal deste trabalho foi aumentar o número de marcadores moleculares presentes no intervalo de confiança definido por Tessele (2012) no grupo de ligação 9 e definir um conjunto de marcadores possíveis de serem utilizados em estratégias de SAM. Para isso, identificou-se os polimorfismos presentes nesta região por meio do ressequenciamento dos parentais. Os 182 SNP identificados foram utilizados para construção de novos mapas genéticos para os genitores e prospecção de QTL. A análise de QTL associou seis marcadores como os principais responsáveis pela explicação do tempo de brotação. Baseado nas frequências fenotípicas associadas aos marcadores, estes foram definidos como altamente associados a brotação precoce com grande potencial de uso em estratégias de SAM.

3.2 Material e métodos

Material vegetal

Para a avaliação de caracteres associados ao requerimento de frio foi utilizada uma população F₁, originada do cruzamento entre ‘M13/91’ (M13, baixo RFH) e ‘Fred Hough’ (FH, médio RFH) desenvolvida pelo programa de melhoramento da Epagri - Estação Experimental de Caçador. Duas réplicas da população referida foram plantadas em novembro de 2010 sobre porta enxerto M9, em áreas experimentais da Embrapa Uva e Vinho localizadas no município de Bento Gonçalves (Rio Grande do Sul, Brasil; 29° 09’S, 51° 31’O) e no município de Vacaria (Rio Grande do Sul, Brasil; 28° 33’S, 50° 57’O). As áreas experimentais estabeleceram-se com 161 indivíduos em Bento Gonçalves e 127 indivíduos em Vacaria. O manejo do solo e das plantas seguiu

as recomendações para a cultura, exceto a aplicação de agentes de quebra de dormência, que não foi realizada.

Avaliação fenotípica

A avaliação fenotípica foi realizada durante as estações de crescimento de 2011, 2012, 2013 e 2014 na área experimental em Bento Gonçalves e durante as estações de crescimento de 2011, 2012 e 2014 na área experimental em Vacaria de acordo com a escala de Fleckinger (EPPO, 1964). Foi avaliado a data de brotação vegetativa (BV) obtida através da anotação do dia, no qual o genótipo apresentava uma gema com ponta verde. As avaliações foram realizadas planta a planta, três vezes por semana a partir de primeiro de julho, definido como a data zero. A cultivar ‘Fuji’ foi utilizada como testemunha para as avaliações fenotípicas, uma vez que os genitores não estavam presentes nas áreas experimentais.

O número de horas com temperatura $\leq 7,2^{\circ}\text{C}$ nos anos de avaliação foram mensurados pelas estações meteorológicas presentes na unidade da Embrapa Uva e Vinho de Bento Gonçalves e Vacaria.

Análise genotípica

Visando aumentar o número de marcadores moleculares presentes no intervalo de confiança do QTL associado à brotação precoce em macieira definido por Tessele (2012), a estratégia de genotipagem KASP[®] (*Kompetitive Allele Specific PCR*) foi empregada. A avaliação da genotipagem por KASP é baseada na detecção da transferência de energia por ressonância da fluorescência que emite um comprimento de onda específico para cada alelo analisado, permitindo a discriminação alélica de SNPs e indels (inserções e/ou deleções) conhecidos.

Os SNPs presentes na região de interesse foram obtidos através do ressequenciamento completo dos parentais M13 e FH (Alencar *et al.*, 2011). Dos mais de 80.000 SNPs identificados (Alencar *et al.*, 2011), foram selecionados para a genotipagem os que estavam dentro do intervalo de confiança definido por Tessele (2012), totalizando 182 SNPs. A genotipagem foi realizada por meio da contratação de serviço oferecido pela empresa LGC Genomics (Teddington, Middlesex, UK) para 190 indivíduos resultantes do cruzamento entre M13 e FH. Para a genotipagem discos foliares de 10 mm foram coletados a campo durante a estação de crescimento de 2014 na área experimental de Bento Gonçalves, liofilizados e enviados para a empresa em placas de 2 mL com 96 poços seladas. Foram selecionados para a construção dos mapas os SNPs que apresentaram heterozigose para ambos os parentais e heterozigose para um dos parentais. Os que apresentaram homozigose para ambos os genitores foram descartados.

Mapeamento genético

Para a validação dos novos marcadores desenvolvidos a partir do ressequenciamento dos parentais foram gerados novos mapas genéticos de ligação para a população. Para tanto, foi utilizada a totalidade dos marcadores obtidos por Tessele (2012) a partir da genotipagem com o chip RosBREED_Apple_10k, acrescentando-se a estes, os novos 182 marcadores KASP. O chip RosBREED_Apple_10k é composto exclusivamente por marcadores SNPs presentes em região codificante. Os marcadores genotipados com o chip foram reavaliados por meio do software GenomeStudio (Illumina, Inc.) visando melhor aproveitamento do total de mais de nove mil marcas genotipadas para a população.

O mapa consenso foi construído utilizando a estratégia de duplo-pseudo cruzamento teste (Grattapaglia e Sederoff, 1994) utilizando o software JoinMap^{®4} (Van Ooijen, 2006). Para verificar a segregação mendeliana 1:1 (*lm, llenn, np*) ou 1:2:1 (*hh, hk, kk*) de cada *locus*, foi aplicado o teste de ajustamento de segregação (teste de aderência qui-quadrado; χ^2 $P < 0.05$). Marcadores que apresentavam distorção na segregação foram removidos da análise. Os mapas foram construídos separadamente para cada um dos parentais por meio da função de regressão de irmãos completos. Os grupos de ligação foram determinados com valores de escores de LOD mínimo de 8,0. As distâncias em centiMorgans (cM) foram obtidas pela função de Kosambi (1994). O melhor agrupamento foi considerado o segundo de três tentativas de ordenamento geradas. Os GL foram numerados de acordo com Maliepaard *et al.* (1998) e a localização dos marcadores confirmada no mapa consenso da macieira (<http://www.rosaceae.org>). A representação gráfica, bem como, o alinhamento dos cromossomos homólogos foi gerada pelo software MapChart 2.2 (Voorrips, 2002).

Análise de QTL para o grupo de ligação 9

Os conjuntos de dados fenológicos de brotação vegetativa para os 161 indivíduos de Bento Gonçalves e dos 127 indivíduos de Vacaria foram utilizados para análise de QTL no grupo de ligação 9. A busca por regiões genômicas potenciais foi realizada utilizando o software MapQTL^{®6} (Van Ooijen, 2009). Dados fenotípicos de anos e locais diferentes foram analisados separadamente. As regiões com possíveis QTL foram identificadas utilizando-se inicialmente mapeamento por intervalo simples. Posteriormente, os marcadores com maiores escores de LOD foram selecionadas como co-fatores para mapeamento de QTL por múltiplo QTL restrito (rMQM – *restricted Multiple-QTL Model Building*). Os QTL foram declarados

significativos quando o LOD máximo, obtido após o mapeamento por rMQM, ultrapassou o LOD *threshold* do grupo de ligação (calculados com taxa de erro de 0,05 para mais de 1000 permutações relativas pelo teste de permutação). A significância dos QTL identificados foi adicionalmente avaliada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Associação de marcadores com frequências fenotípicas

A significância da associação entre os marcadores e as frequências fenotípicas foi determinada pelo teste de hipótese de independência (χ^2) com base na média das datas dos quatro ciclos de avaliação. Os valores foram declarados significativos quando o valor χ^2 calculado foi maior que o valor de χ^2 tabelado.

3.3 Resultados e discussão

Análise fenotípica

Os indivíduos apresentaram elevada variabilidade para data de brotação vegetativa (Figura 1). Em Bento Gonçalves, os indivíduos apresentaram desempenho distinto entre os anos de avaliação, sendo que apenas no ano de 2014 pode ser visualizada uma distribuição de frequências próximas da normal para a brotação vegetativa. Os dias após a data zero necessários para a brotação variaram de 17 a 122 entre os anos, sendo o ano de 2011 o mais tardio em relação aos demais, enquanto que o ano de 2014 mostrou-se mais precoce (Tabela 1). O menor intervalo de brotação foi observado em 2013, sendo este de 80 dias. Foi observada uma antecipação da brotação vegetativa, uma vez que 88% (2011), 77% (2012), 64% (2013) e 60% (2014) dos indivíduos brotaram antes da testemunha, cultivar Fuji.

As HF acumuladas na área experimental em Bento Gonçalves foram superiores ao requerimento do genitor M13 em todos os anos e, em nenhum deles foi superior ao genitor FH (Tabela suplementar 1). Em 2011, os indivíduos apresentaram um padrão de brotação bi-modal, com maior incidência de abertura de gemas entre 45-56 dias e 69-80 dias após a data zero. No primeiro período já haviam sido contabilizadas 399 HF, no segundo período já haviam sido contabilizadas 432 HF. Em ambos os períodos a necessidade de frio do genitor M13 já havia sido superada. No ano de 2012, a maior incidência de superação da dormência ocorreu entre 32-55 dias após a data zero. Neste período tinham sido acumuladas pouco mais de 309 HF. No ano de 2013, o período de maior emergência de gemas foi após 45-57 dias, quando já haviam sido acumuladas cerca de 417 HF. Em 2014, o período de brotação foi mais longo, entre 50-82 dias após a data zero, sendo que neste período as plantas acumularam cerca de 305 HF. O alongamento do intervalo de abertura de gemas possivelmente está relacionado à baixa incidência de frio observada.

Em Vacaria, os anos de 2012 e 2014 apresentaram distribuição de frequências próxima da distribuição normal para brotação vegetativa (Figura 1). O número de dias necessários para brotação variou de 19 em 2014 a 97 em 2011, sendo o ano de 2011 o que apresentou menor intervalo de brotação, 49 dias (Tabela 1). Assim como na área experimental em Bento Gonçalves, os indivíduos presentes em Vacaria apresentaram uma antecipação da brotação em 85% (2011), 82% (2012) e 83% (2014).

Na área experimental de Vacaria as HF acumuladas foram superiores ao genitor M13 em todos os anos de avaliação e ao genitor FH nos anos de 2011 e 2012 (Tabela suplementar 1). Em 2011, os indivíduos apresentaram um padrão de brotação bi-modal, com maior incidência de abertura de gemas entre 55-61 dias e 76-82 dias após a data zero. No primeiro período já haviam sido contabilizadas 671 HF, valor superior

ao requerimento de ambos os genitores. No ciclo de 2012, a maior incidência de superação da dormência ocorreu entre 61-78 dias após a data zero. Neste período tinham sido acumuladas pouco mais de 587 HF, superior ao requerimento de ambos os genitores. Em 2014, o período de brotação foi mais longo, entre 47-88 dias após a data zero, sendo que neste período as plantas acumularam cerca de 472 HF, superior apenas ao requerimento de frio do genitor de baixo requerimento.

TABELA 1. Número de dias para brotação após a data zero (primeiro de junho) nos campos experimentais de Bento Gonçalves e Vacaria.

Bento Gonçalves					
Ano	Individuo mais precoce	Individuo mais tardio	Ciclo	Testemunha ^a	% precoce
2011	33	122	89	98	88,46
2012	32	120	88	67	77,01
2013	25	105	80	60	64,59
2014	17	100	83	64	60,24
Vacaria					
Ano	Individuo mais precoce	Individuo mais tardio	Ciclo	Testemunha ^a	% precoce
2011	48	97	49	81	85,08
2012	34	96	62	73	82,45
2014	19	86	67	77	83,65

^a cultivar Fuji

Os indivíduos apresentaram uma inconstância no intervalo de brotação entre os anos avaliados, mas um padrão semelhante entre os locais. A inconstância observada pode estar associada com estresse por déficit hídrico, doenças, reservas disponíveis, idade e condições climáticas. Diferenças no intervalo de brotação entre anos para progênies F₁ já foram reportadas em outros trabalhos (Labuschagné *et al.*, 2002; van Dyk *et al.*, 2009). Uma vez que a superação da endodormência é reflexo das HF e calor acumulados no período, em anos de baixa incidência de frio, como nos anos de 2012 e 2014, é esperado um atraso na data de brotação. Baseado nos intervalos de maior incidência de abertura de gemas pode ser observado que o cruzamento originou

diversos indivíduos com um requerimento de frio inferior ao genitor de menor requerimento. A antecipação da data de brotação evidencia um efeito genético altamente herdável para esta característica, possivelmente sendo controlada por um gene dominante (Labuschagné *et al.*, 2002). Neste estudo, as estimativas de herdabilidade na média dos indivíduos da característica tempo de brotação demonstraram ser altamente herdáveis, apresentando valores de 0,96 em Bento Gonçalves e 0,94 em Vacaria. As estimativas de herdabilidade são consideradas específicas para a população e o ambiente em que se avalia, uma vez que sofrem grande influência do ambiente (Souza *et al.*, 1998). No entanto, os valores encontrados são semelhantes aos observados por van Dyk *et al.* (2010) e Celton *et al.* (2011) em macieira e por Fan *et al.* (2010) em pessegueiro. Apesar das diferenças de genótipo e ambiente em que as plantas foram cultivadas, a semelhança dos valores sugere que a data de brotação é uma característica que sofre forte influência genética.

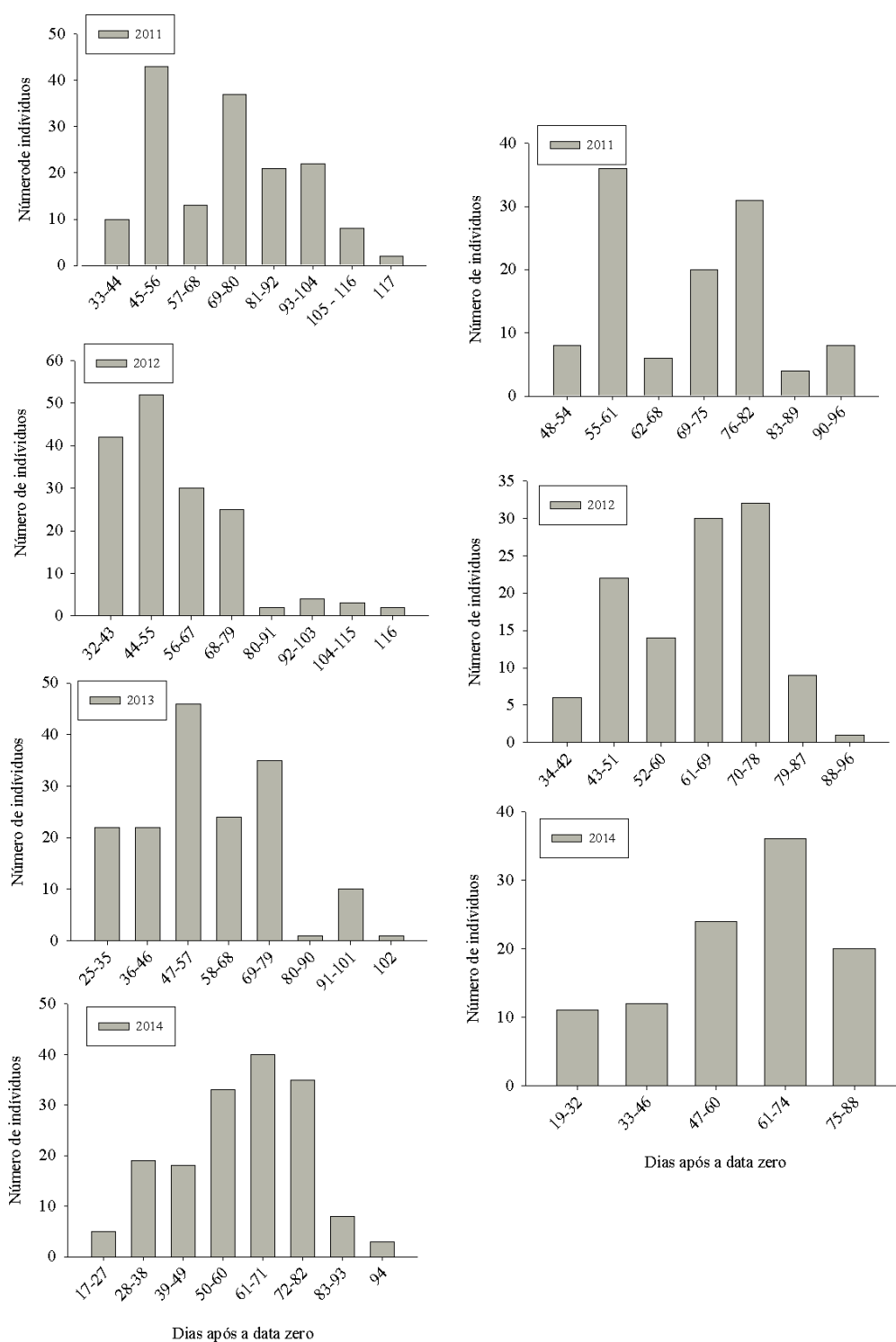


FIGURA 2. Distribuição de freqüências de brotação vegetativa dos indivíduos da população F_1 originada do cruzamento entre 'M13/91' e 'Fred Hough' nas áreas experimentais de Bento Gonçalves e Vacaria em todos os anos de avaliação. Coluna da esquerda representa a área experimental de Bento Gonçalves. Coluna da direita representa a área experimental de Vacaria. O número de classes foi definido pela Regra de Sturges ($k=1+3,3\log [n]$).

Mapeamento de alta resolução

O ressequenciamento dos genitores possibilitou a identificação de 182 novos marcadores SNPs na região de interesse. Destes, 114 apresentaram amplificação polimórfica. Oitenta e dois foram polimórficos para ambos os genitores (*hh*, *hk*, *kk*), 30 apenas para o genitor M13 (*lm*, *ll*) e 2 apenas para o genitor FH (*nn*, *np*). Os 114 marcadores que apresentaram amplificação polimórfica foram utilizados para aumentar a densidade de marcadores presentes no *locus* associado a BV por meio de mapeamento, utilizando a estratégia de duplo-pseudo cruzamento teste (Grattapaglia e Sederoff, 1994).

A estratégia de genotipagem utilizada permitiu adensar com sucesso a região de interesse. Os novos marcadores foram agrupados no grupo de ligação 9 do novo mapa consenso aumentando a presença de marcadores nesta região. No mapa gerado para o genitor M13, 28,5% dos marcadores polimórficos (*hh*, *hk*, *kk* e *nn*, *np*) foram incluídos, possibilitando a inserção de 33 novos marcadores na região de interesse (Figura 2). O mapa genético para o genitor FH utilizou 40,2% dos marcadores polimórficos (*hh*, *hk*, *kk* e *lm*, *ll*), agrupando 34 novos marcadores na região de interesse quando comparado com Tessele (2012; Anexo A). Observam-se diferenças na localização dos marcadores entre os parentais. No parental M13, os marcadores KASP foram agrupados na região entre 9,6 e 16 cM, enquanto que no mapa gerado para o parental FH estes agruparam-se entre 0 e 6,5 cM, sugerindo que existem diferenças de recombinação entre os parentais nessa região. A diferença na localização dos marcadores pode estar relacionada com rearranjos genéticos na extremidade do cromossomo 9 durante a evolução dos genitores.

O pequeno número de marcadores agrupados, 28,5% e 40,2%, possivelmente é resultado do tamanho da população de mapeamento, bem como da frequência de

recombinação desta região. No geral, as extremidades dos cromossomos apresentam uma menor taxa de recombinação quando comparados a outras regiões do cromossomo. Trabalhos de mapeamento de alta resolução em macieira apresentam tamanhos muito distintos de populações, variando de 100 até mais de 1500 indivíduos (Galliet *et al.*, 2010; Parravicini *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011; Antanaviculture *et al.*, 2012; Moriya *et al.*, 2012; Cappellin *et al.*, 2015; Cova *et al.*, 2015, Morimoto e Banno, 2015). Moriya *et al.* (2012) descrevem que o tamanho ideal de uma população para mapeamento de alta resolução é difícil de ser definido, uma vez que fatores como a frequência de recombinação da região e o grau de parentesco dos parentais afeta a eficiência do mapeamento.

Os mapas consenso gerados utilizando os marcadores provenientes da genotipagem com o chip RosBREED_Apple_10k mais os marcadores KASP apresentaram 17 grupos de ligação para ambos os genitores, em acordo ao descrito por Maliepaard *et al.* (1998) e correspondente ao número de cromossomos haploides de macieira (Velasco *et al.*, 2010). No total, 818 e 824 marcadores foram agrupados para o genitor M13 e para o genitor FH, respectivamente. Revelando uma boa saturação de marcadores em todos os grupos de ligação, com média de 44 e 47 marcadores por grupo de ligação (Figura suplementar 1; Tabela suplementar 2). A cobertura total foi de 1289.87cM para o genitor M13 e 1012.27cM para o genitor FH. Mapas utilizando marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*) e SNP para diferentes cruzamentos de macieira (van Dyk *et al.*, 2010; Celton *et al.*, 2011; Antanaviculture *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Clark *et al.*, 2014) e plantas aparentadas como a pereira (Yamamoto *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015) apresentaram cobertura semelhante.

A reavaliação dos marcadores genotipados pelo chip RosBREED_Apple_10k possibilitou aumentar o número de marcadores agrupados nos 17 grupos de ligação do

mapa consenso. Passando de 719 (Anexo B) marcadores para 818 no parental M13 e de 711 para 824 no parental FH. O número médio de marcadores distribuídos nos 17 grupos de ligação passou de 43 e 42 para 44 e 47, respectivamente. O maior adensamento de marcadores permitiu diminuição nas distâncias médias entre *loci*, passando de 2,0 para 1,3 no parental M13 e de 1,7 para 0,7 no parental FH. O emprego de marcadores do tipo KASP para genotipagem apresenta vantagens em relação a outras metodologias. Por ser baseada em fluorescência, a genotipagem com KASP possibilita sua utilização de forma prática e rápida em estratégias como SAM, diminuindo os custos e o tempo necessário para o desenvolvimento de novas cultivares.

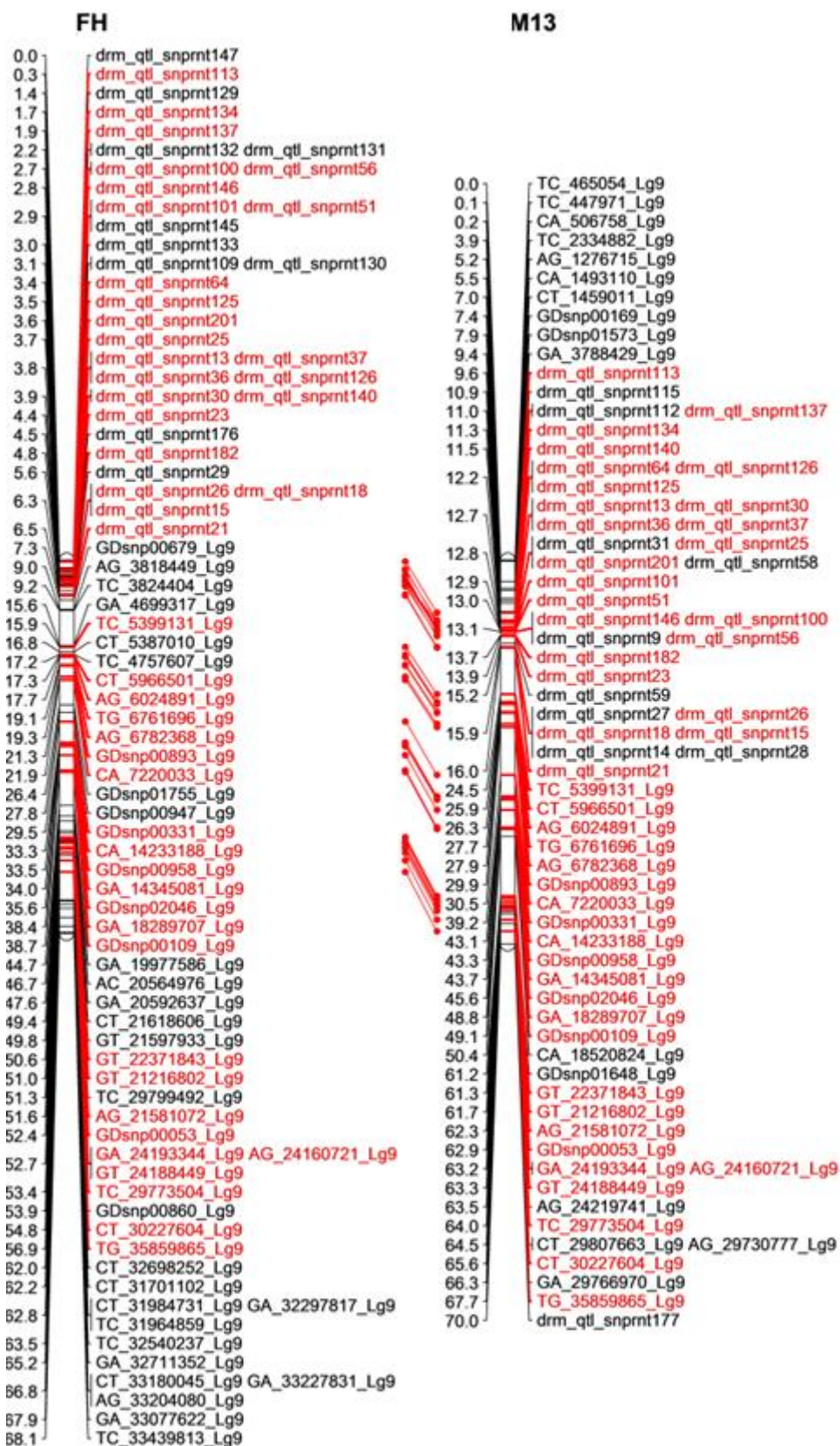


FIGURA 3. Mapa de ligação do grupo de ligação 9 para os parentais 'M13/91' e 'Fred Hough'. Marcadores comuns para ambos os genitores são identificados pela cor vermelha e ligados por linhas vermelhas. A distância genética dos grupos de ligação é apresentada em ordem crescente de cima para baixo, à esquerda em cM. Marcadores KASP são designados pela sigla *drm_qtl_snprnt*.

Detecção de QTL para tempo de BV

O mapa genético construído para cada parental permitiu a detecção de um QTL de grande efeito para a característica tempo de BV. A detecção do QTL foi realizada separadamente para cada genitor e para cada local utilizando os dados fenotípicos de todos os anos e também a média destes. Um QTL foi definido como significativo quando o LOD do marcador ultrapassou o valor do LOD do grupo de ligação definido após 1000 permutações ($p=0,05$). Em todos os anos o valor limite definido pelo grupo de ligação foi ultrapassado. Adicionalmente, os marcadores foram validados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Um QTL de grande efeito para tempo de BV foi detectado em todos os anos (Tabela 2), localizado na extremidade do grupo de ligação 9 (Figura 3) e explicou de 29,2 a 54,5% da variação fenotípica em Bento Gonçalves e 26,5 a 45,8% em Vacaria nos diferentes anos. Quatro marcadores (TC_447971_Lg9, CA_506758_Lg9, *drm_qtl_snprnt113* e *drm_qtl_snprnt137*) excederam o limite do grupo de ligação em todos os anos nos dois locais para o genitor M13. Para o genitor FH, apenas dois marcadores (*drm_qtl_snprnt113* e *drm_qtl_snprnt147*) excederam os limites impostos para validação. No total, seis marcadores (TC_465054_Lg9, TC_447971_Lg9, CA_506758_Lg9, *drm_qtl_snprnt113*, *drm_qtl_snprnt137* e *drm_qtl_snprnt147*) foram definidos como responsáveis pela explicação do fenótipo de BV.

O QTL identificado se localiza na região determinada por van Dyk *et al.* (2010), Celton *et al.* (2011) e Tessele (2012) na extremidade do grupo de ligação 9. A colocalização do QTL em genótipos, condições climáticas e anos distintos confirma a importância desta região no controle do tempo de brotação em macieira. Embora esta região tenha explicado cerca de 50% da variação fenotípica observada para tempo de brotação neste estudo, QTL de menor efeito podem não estar sendo identificados

devido ao pequeno tamanho da população avaliada e a quantificação indireta do RFH. O tempo de brotação medido em dias pode ser considerado uma medida indireta da RFH de cada genótipo. Para determinar com precisão a RFH de cada indivíduo, seriam necessários pequenos pomares para cada um deles, dos quais seriam retiradas amostras representativas de estacas para testes em condições controladas durante a progressão da dormência. O aumento na precisão da quantificação do RFH pela implementação de pequenos pomares, não compensaria o custo de implementação e manutenção destes. Sendo assim, a melhor maneira de contornar o problema é baseando-se na estimativa indireta da necessidade de frio por meio dos dias necessário para brotação. Alternativamente, uma estratégia baseada em identificação de eQTL também poderia ser utilizada (Druka *et al.*, 2010). Em combinação com a análise clássica de QTL, análises de correlações podem identificar genes candidatos diretamente, bem como permitir a modelagem de rotas de regulação e, potencialmente, promover melhor entendimento das bases da variação fenotípica.

O requerimento de frio em rosáceas tem um controle genético complexo o que dificulta a identificação dos principais genes controladores deste processo. Em espécies como pêssigo (Fan *et al.*, 2010; Zhebenthayeva *et al.*, 2014), damasco (Olukolu *et al.*, 2009) e amêndoa (Sánchez-Pérez *et al.*, 2012) também foram identificados QTL majoritários para tempo de brotação. Estudos de mapeamento abordando o controle genético da brotação em pêssigo identificaram dois QTL principais, explicando mais de 30% da variação fenotípica. Além disso, em um estudo de mapeamento de alta resolução, os genes *DORMANCY ASSOCIATED MADS-box* (*DAM*) são definidos como os principais responsáveis pelos efeitos do QTL posicionado no grupo de ligação 1 (Zhebentyayeva *et al.*, 2014).

O posicionamento dos marcadores no genoma possibilita a prospecção dos genes ali presentes. A posição dos marcadores associados ao tempo de BV foi estabelecida fisicamente no genoma da macieira (Tabela suplementar 3). A região definida é de cerca de 3Mb entre os marcadores TC_465054_Lg9 e *drm_qtl_snprnt147*, iniciando em 469.641 até 3.549.187 pb. Dentro desta região foram identificados dois genes com associação conhecida ao processo de dormência (Porto *et al.*, 2015). Em estudos de microarranjos envolvendo bibliotecas em diferentes profundidades e estágios de dormência, Porto *et al.* (2015) identificaram dois genes relacionados a saída da dormência em macieira, *FLOWERING LOCUS C-like* e *PACLOBUTRAZOL RESISTANCE1-like*. Ambos estão dentro do intervalo definido pelos seis marcadores acima citados. A expressão diferencial apresentada por estes genes bem como a sua proximidade aos principais marcadores associados a tempo de BV reforçam a importância desta região no controle da saída da dormência em macieira. Em macieira, genes *DAM* também foram relacionados como processo de dormência. Entretanto, nenhum dos genes *DAM* conhecidos (Porto *et al.*, artigo submetido) está localizado na região do QTL. Estes resultados reforçam a existência de QTL de menor efeito não detectados neste estudo, que por sua vez representam vias alternativas de controle da superação da dormência em macieira.

TABELA 2. QTL detectado para BV no grupo de ligação 9 para os genitores ‘Fred Hough’ e ‘M13/91’ da população F₁ nas áreas experimentais de Bento Gonçalves e Vacaria em diferentes anos.

Bento Gonçalves						
‘Fred Hough’						
Ano	Posição(cM)	Marcador	LOD ^a	% explicação	Kruskal-Wallis	
					K*(df)	P ^b
2011	0.341	drm_qtl_snprnt113	16.33 (5.1)	39	29.25	**
	0	drm_qtl_snprnt147	15.49 (5.1)	37.4	28.3	**
	1.85	drm_qtl_snprnt137	11.8 (5.1)	30.1	19.82	**
2012	0.341	drm_qtl_snprnt113	12.65 (5.5)	31.7	30.44	**
	0	drm_qtl_snprnt147	12.54 (5.5)	31.4	31.72	**
	1.85	drm_qtl_snprnt137	7.71 (5.5)	20.7	24.35	**
2013	0.341	drm_qtl_snprnt113	11.96 (5.5)	30.6	23.03	**
	0	drm_qtl_snprnt147	11.5(5.5)	29.6	22.82	**
	1.85	drm_qtl_snprnt137	8.51 (5.5)	22.9	18.12	**
2014	0.341	drm_qtl_snprnt113	14.93 (4.6)	36.6	30.61	**
	0	drm_qtl_snprnt147	14.43 (4.6)	35.6	30.2	**
	1.85	drm_qtl_snprnt137	10.28 (4.6)	26.9	19.53	**
Média	0.341	drm_qtl_snprnt113	20.91 (5.2)	46.7	37.43	**
	0	drm_qtl_snprnt147	20.16 (5.2)	45.5	37.18	**
	1.85	drm_qtl_snprnt137	13.88 (5.2)	34.2	28.18	**
‘M13/91’						
Ano	Posição(cM)	Marcador	LOD ^a	% explicação	Kruskal-Wallis	
					K*(df)	P ^b
2011	0	TC_465054_Lg9	20.31 (5.5)	46	59.07	**
	0.06	TC_447971_Lg9	17.47 (5.5)	41.1	59.66	**
	0.2	CA_506758_Lg9	17.24 (5.5)	40.7	65.13	**
	9.61	drm_qtl_snprnt113	16.01 (5.5)	38.4	29.25	**
	10.96	drm_qtl_snprnt137	12.34 (5.5)	31.2	19.82	**
2012	0	TC_465054_Lg9	11.49 (6.3)	29.2	46.78	**
	0.06	TC_447971_Lg9	9.55 (6.3)	25	45.68	**
	0.2	CA_506758_Lg9	10.1 (6.3)	26.2	50.16	**
	9.61	drm_qtl_snprnt113	11.84 (6.3)	30	30.44	**
	10.96	drm_qtl_snprnt137	9.09 (6.3)	23.9	24.35	**
2013	0	TC_465054_Lg9	15.96 (5.2)	38.5	66.33	**
	0.06	TC_447971_Lg9	15.02 (5.2)	36.8	63.79	**
	0.2	CA_506758_Lg9	14.56 (5.2)	35.9	70.3	**
	9.61	drm_qtl_snprnt113	11.48 (5.2)	29.5	23.03	**
	10.96	drm_qtl_snprnt137	10.18 (5.2)	26.7	18.12	**
2014	0	TC_465054_Lg9	19.95 (4.8)	45.6	66.23	**
	0.06	TC_447971_Lg9	17.54 (4.8)	41.4	64.55	**
	0.2	CA_506758_Lg9	17.16 (4.8)	40.7	70.87	**
	9.61	drm_qtl_snprnt113	14.75 (4.8)	36.2	30.61	**
	10.96	drm_qtl_snprnt137	11.44 (4.8)	29.4	19.53	**
Média	0	TC_465054_Lg9	26.16 (4.5)	54.5	80.06	**
	0.06	TC_447971_Lg9	22.39 (4.5)	49	77.72	**
	0.2	CA_506758_Lg9	21.85 (4.5)	48.2	85.13	**
	9.61	drm_qtl_snprnt113	20.3 (4.5)	45.7	37.43	**
	10.96	drm_qtl_snprnt137	15.98 (4.5)	38.2	28.1	**

^alimite grupo de ligação; ^bP_(0,001)

continuação TABELA 3. QTL detectado para BV no grupo de ligação 9 para os genitores ‘Fred Hough’ e ‘M13/91’ da população F₁ nas áreas experimentais de Bento Gonçalves e Vacaria em diferentes anos.

Vacaria						
‘Fred Hough’						
Ano	Posição (cM)	Marcador	LOD^a	% explicação	Kruskal-Wallis	
					K*(df)	P^b
2011	0.341	drm_qtl_snprnt113	7.29 (5.1)	26.5	11.93	**
	0	drm_qtl_snprnt147	6.44 (5.1)	23.8	11.47	**
2012	0.341	drm_qtl_snprnt113	9.1 (6.5)	32.6	12.95	**
	0	drm_qtl_snprnt147	8.3 (6.5)	30.3	14.16	**
2014	0.341	drm_qtl_snprnt113	9.18 (5.6)	35.6	14.53	**
	0	drm_qtl_snprnt147	8.66 (5.6)	34	13.89	**
Média	0.341	drm_qtl_snprnt113	10.11 (5.0)	34.3	16.31	**
	0	drm_qtl_snprnt147	9.19 (5.0)	31.7	14.54	**
‘M13/91’						
Ano	Posição (cM)	Marcador	LOD^a	% explicação	Kruskal-Wallis	
					K*(df)	P^b
2011	0.06	TC_447971_Lg9	8.31 (5.0)	29.6	35.84	**
	0.2	CA_506758_Lg9	8.92 (5.0)	31.4	32.56	**
	9.61	drm_qtl_snprnt113	6.34 (5.0)	24.6	11.93	**
	10.96	drm_qtl_snprnt137	6.23 (5.0)	23.1	10.9	**
2012	0.06	TC_447971_Lg9	8.35 (4.1)	30.4	37.49	**
	0.2	CA_506758_Lg9	8.37 (4.1)	30.5	33.92	**
	9.61	drm_qtl_snprnt113	8.89 (4.1)	32	14.16	**
	10.96	drm_qtl_snprnt137	8.05 (4.1)	29.5	10.89	**
2014	0.06	TC_447971_Lg9	12.77 (5.0)	45.8	43.21	**
	0.2	CA_506758_Lg9	13.72 (5.0)	48.2	43.21	**
	9.61	drm_qtl_snprnt113	9.25 (5.0)	35.8	14.53	**
	10.96	drm_qtl_snprnt137	8.33 (5.0)	32.9	9.35	**
Média	0.06	TC_447971_Lg9	11.65 (5.2)	38.3	45.54	**
	0.2	CA_506758_Lg9	12.36 (5.2)	40.1	41.61	**
	9.61	drm_qtl_snprnt113	9.95 (5.2)	33.8	16.31	**
	10.96	drm_qtl_snprnt137	9.08 (5.2)	31.4	12.24	**

^alimite grupo de ligação; ^bP_(0,001)

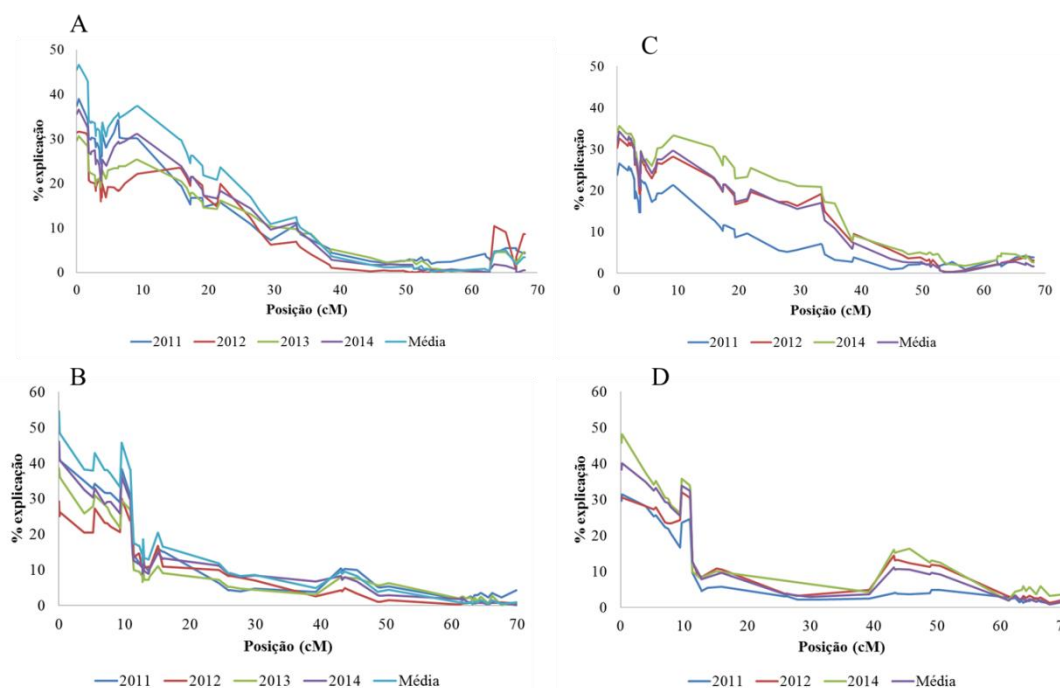


FIGURA 4. Posição do QTL identificado para tempo de BV no grupo de ligação 9 para os parentais 'Fred Hough' e 'M13/91' nos diferentes anos e locais. A) 'Fred Hoguh'; B) 'M13/91' em Bento Gonçalves; C) 'Fred Hoguh'; D) 'M13/91' em Vacaria.

Marcadores associados à baixo requerimento de frio hibernal

Os seis marcadores definidos como responsáveis pela explicação de parte da variação fenotípica para o caráter tempo de BV (TC_465054_Lg9, TC_447971_Lg9, CA_506758_Lg9, drm_qtl_snprnt113, drm_qtl_snprnt137 e drm_qtl_snprnt147) foram testados para a associação com o fenótipo. Todos eles apresentaram segregação para data de brotação em ambas as áreas experimentais (Tabela 3).

Alelos dos marcadores TC_447971_LG9, TC_465054_LG9 e CA_506758_LG9 (heterozigotos para o genitor M13) mostraram clara distribuição fenotípica, com valor de χ^2 calculado de 51,22 em Bento Gonçalves e 65, 67, 89 e 65 em Vacaria (Tabela 3). A separação dos indivíduos em dois grupos distintos, precoces e tardios, evidencia a associação entre os alelos e a precocidade da brotação nessa população (Figura 4). Indivíduos precoces apresentaram em sua maioria o alelo 'GA' em estado heterozigoto (*lm*), herdado do pai M13 de baixo requerimento de frio,

enquanto que indivíduos tardios apresentaram o alelo 'A' em homozigose (*ll*), herdados de ambos genitores.

Os marcadores *drm_qtl_snprnt113*, *drm_qtl_snprnt137* e *drm_qtl_snprnt147* apresentaram valores de χ^2 calculado significativo em ambas as áreas experimentais (Tabela 4). Para o marcador *drm_qtl_snprnt113*, o alelo homozigoto 'GG', para o genitor M13, foi o que apresentou alta associação com o fenótipo de precocidade. Para os marcadores *drm_qtl_snprnt137* e *drm_qtl_snprnt147*, o alelo homozigoto 'AA', para o parental FH, apresentou associação com uma antecipação na data de brotação na área experimental de Bento Gonçalves. Na área experimental de Vacaria não foi possível associar a precocidade com algum dos alelos (Figura 5).

Assim, a clara associação dos marcadores testados com os alelos de precocidade evidencia um grande potencial de uso destes marcadores na seleção assistida de genótipos com menor requerimento de frio. Baseado nestas análises, pode ser definido um conjunto de marcadores moleculares que representam um haplótipo, composto pelos marcadores *TC_465054_Lg9*, *TC_447971_Lg9*, *CA_506758_Lg9*, *drm_qtl_snprnt113*, *drm_qtl_snprnt137* e *drm_qtl_snprnt147*, com a presença dos SNPs A G A G A A. A validação da associação destes marcadores em materiais não aparentados possibilita o uso em estratégias de seleção de indivíduos com menor requerimento de frio para superação da dormência.

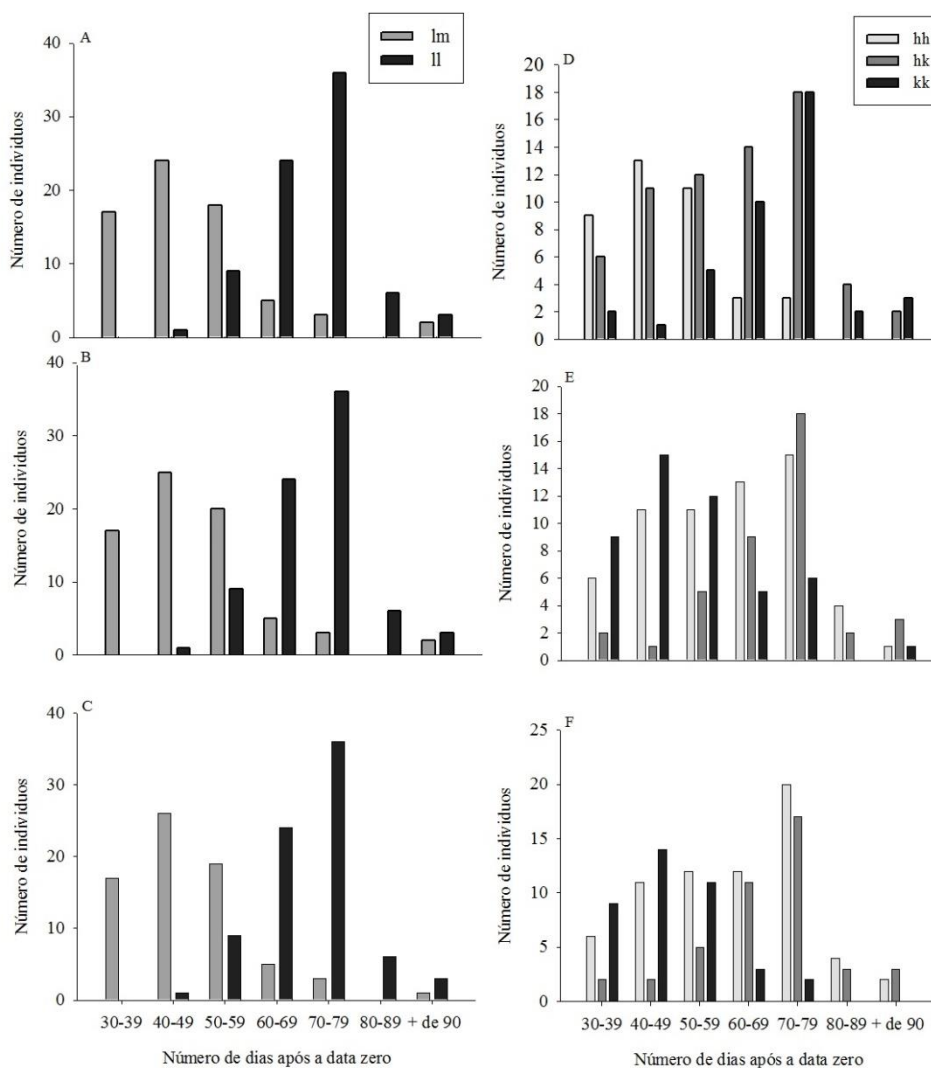


FIGURA 5. Distribuição da frequência da média dos anos da variável fenotípica BV da progênie resultante do cruzamento entre ‘M13/91’ e ‘Fred Hough’ com relação as classes alélicas dos marcadores moleculares na área experimental de Bento Gonçalves. A) TC_447971_LG9; B) TC_465054_LG9; C) CA_506758_LG9; D) drm_qtl_snprnt113; E) drm_qtl_snprnt137 e F)drm_qtl_snprnt 147.

TABELA 4. Teste de χ^2 para hipótese de independência entre a média dos anos da variável fenológica BV da progênie resultante do cruzamento entre ‘M13/91’ e ‘Fred Hough’ com relação as classes alélicas dos marcadores moleculares na área experimental de Bento Gonçalves.

Bento Gonçalves			
Marcador	Classificação alelos	Teste de χ^2	Probabilidade
TC_447971_LG9	GA (<i>lm, ll</i>)	51,22	> 0,001
TC_465054_LG9	AG (<i>lm, ll</i>)	51,23	> 0,001
CA_506758_LG9	AC (<i>lm, ll</i>)	51,24	> 0,001
drm_qtl_snprnt113	GA (<i>hh, hk, kk</i>)	30,56	> 0,001
drm_qtl_snprnt137	GA (<i>hh, hk, kk</i>)	23,62	> 0,001
drm_qtl_snprnt147	CA (<i>hh, hk, kk</i>)	28,23	> 0,001

lm, ll - $P_{0,001}$: 10,82; *hh, hk, kk* - $P_{0,001}$: 13,81

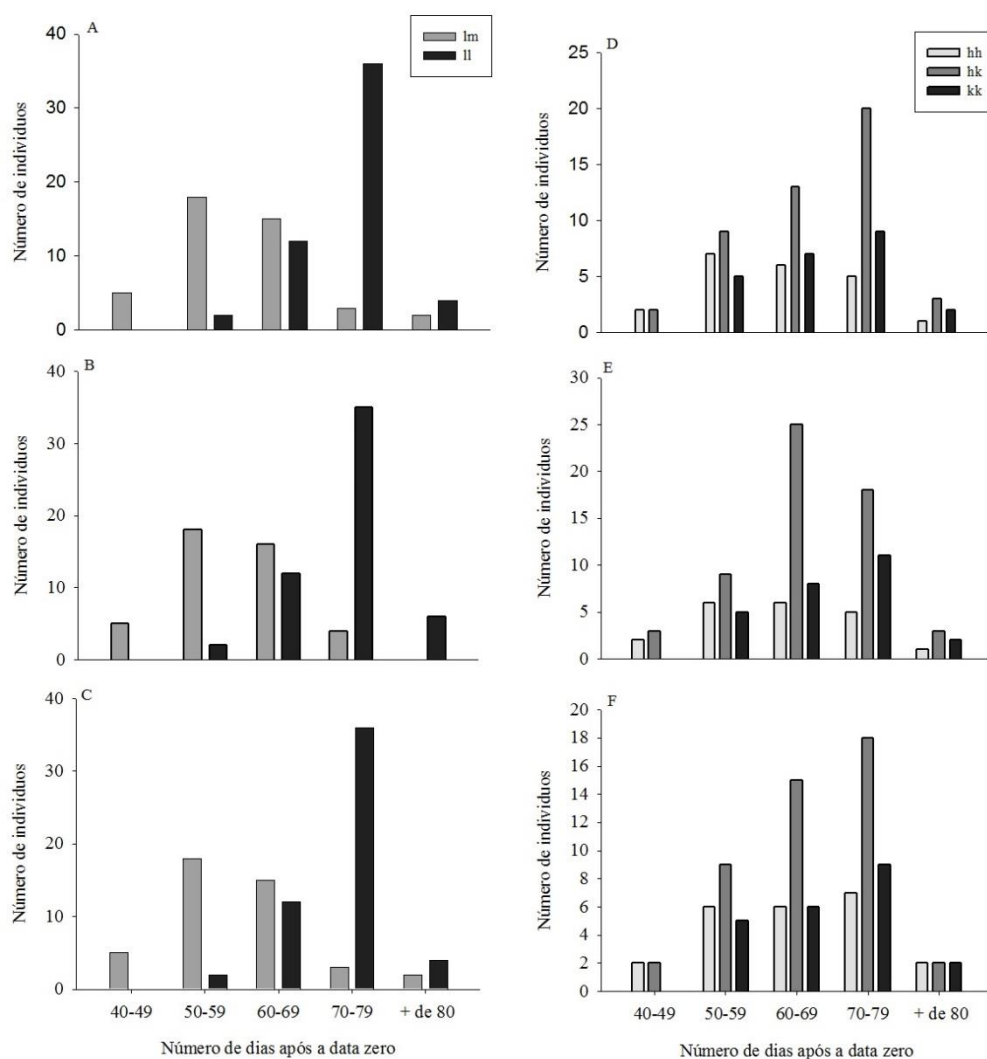


FIGURA 6. Distribuição da frequência da média dos anos da variável fenotípica BV da progênie resultante do cruzamento entre ‘M13/91’ e ‘Fred Hough’ com relação as classes alélicas dos marcadores moleculares na área experimental de Vacaria. A) TC_447971_LG9; B) TC_465054_LG9; C) CA_506758_LG9; D) drm_qtl_snprrnt113; E) drm_qtl_snprrnt137 e F) drm_qtl_snprrnt147.

TABELA 5. Teste de χ^2 para hipótese de independência entre a média dos anos da variável fenológica BV da progênie resultante do cruzamento entre ‘M13/91’ e ‘Fred Hough’ com relação as classes alélicas dos marcadores moleculares na área experimental de Vacaria.

Vacaria			
Marcador	Classificação alelos	Teste de χ^2	
TC_447971_LG9	GA (<i>lm</i> , <i>ll</i>)	65,00	> 0,001
TC_465054_LG9	AG (<i>lm</i> , <i>ll</i>)	67,89	> 0,001
CA_506758_LG9	AC (<i>lm</i> , <i>ll</i>)	65,00	> 0,001
drm_qtl_snprrnt113	GA (<i>hh</i> , <i>hk</i> , <i>kk</i>)	58,69	> 0,001
drm_qtl_snprrnt137	GA (<i>hh</i> , <i>hk</i> , <i>kk</i>)	58,69	> 0,001
drm_qtl_snprrnt147	CA (<i>hh</i> , <i>hk</i> , <i>kk</i>)	58,98	> 0,001

lm, ll - $P_{0,001}$: 10,82; *hh, hk, kk* - $P_{0,001}$: 13,81

No presente estudo, o ressequenciamento do *locus* relacionado a tempo de BV nos parentais possibilitou a identificação de 182 novos SNP. Utilizando-se os SNP identificados foi possível aumentar a saturação do intervalo do QTL para brotação no grupo de ligação 9. A análise de QTL em diferentes anos e locais reforçou a importância da extremidade do grupo de ligação 9 no controle do tempo de brotação em macieira. A associação dos marcadores com as frequências fenotípicas possibilitou a definição de seis marcadores com grande potencial de uso como ferramenta auxiliar em SAM.

3.4 Material suplementar

TABELA SUPLEMENTAR 1. Número de horas com temperatura $\leq 7,2^{\circ}\text{C}$ nas áreas experimentais de Bento Gonçalves e Vacaria para os anos de avaliação.

Bento Gonçalves									
Ano	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Acumulado
2011	0	108	159	132	33	1	0	0	433
2012	22	84	161	42	24	0	0	0	333
2013	40	16	170	191	47	1	0	0	456
2014	40	96	88	81	0	1	0	0	306
Vacaria									
Ano	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Acumulado
2011	91	238	170	172	94	16	15	6	802
2012	91	119	243	57	77	3	0	0	590
2014	82	97	139	139	15	12	0	0	484

TABELA SUPLEMENTAR 2. Características dos mapas genéticos para os genitores M13 e FH construídos com marcadores RosBREED_Apple_10k e KASP utilizando a estratégia do duplo-pseudocruzamento teste.

Grupo de ligação	Número de marcadores		Distância total (cM)		Distância média (cM)		Gaps > 10 cM	
	M13	FH	M13	FH	M13	FH	M13	FH
1	28	63	72,65	67,44	2,7	0,5	2	0
2	78	74	88,48	70,38	1,1	0,5	1	0
3	63	91	90,83	70,83	1	0,4	0	0
4	34	32	58,37	43,25	1,3	0,8	0	0
5	67	29	92,73	98,05	0,4	2,1	1	3
6	43	41	78,26	65,52	1,9	0,7	0	0
7	21	31	85,71	46,05	4,3	0,9	3	0
8	57	29	63,57	61,96	0,4	1	1	2
9	74	85	69,97	68,07	0,3	0,3	1	0
10	56	53	103,76	49,24	0,9	0,6	1	0
11	61	16	86,20	27,52	1,4	0,8	0	1
12	63	64	69,67	57,26	0,7	0,5	0	0
13	44	19	85,1	46,42	1	2,2	1	0
14	31	51	67,88	62,87	1	0,9	3	0
15	33	47	83,48	60,52	1,2	0,4	4	1
16	42	67	61,19	58,92	0,5	0,4	2	0
17	10	32	32,41	57,97	2,4	0,3	1	2
Total	818	824	1289,87	1012,27				
Média	44	47	78,09	60,52	1,32	0,7		

cM: centiMorgan

TABELA SUPLEMENTAR 3. Posição dos marcadores no genoma da macieira.

Marcador	Posição (kb)
TC_465054_Lg9	chr9:469641..470658
TC_447971_Lg9	chr9:450583..452037
CA_506758_Lg9	chr9:509406..510227
drm_qtl_snprnt113	chr9:2797194..2803901
drm_qtl_snprnt137	chr9:3005937..3047902
drm_qtl_snprnt147	chr9:3536124..3549187

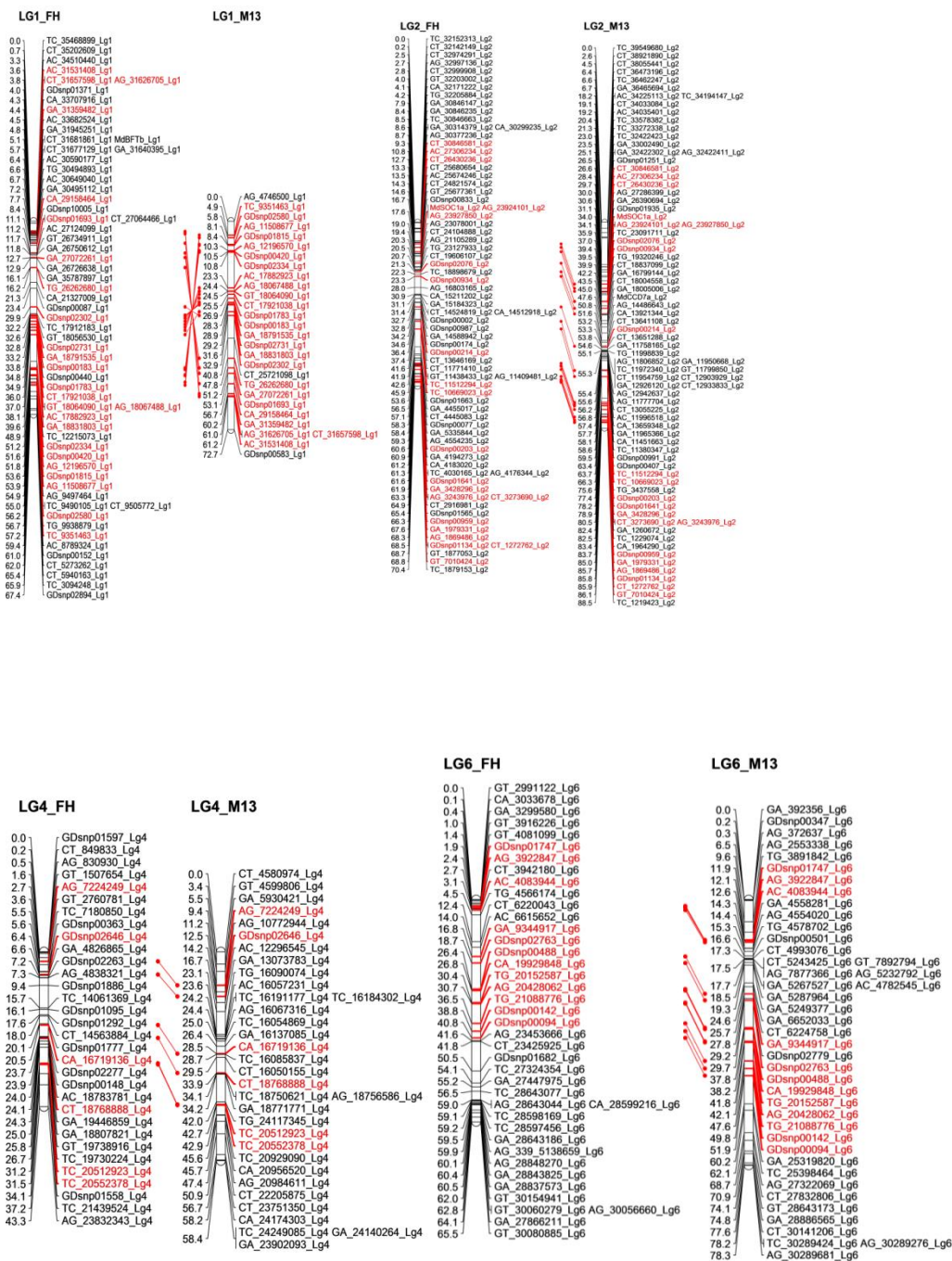
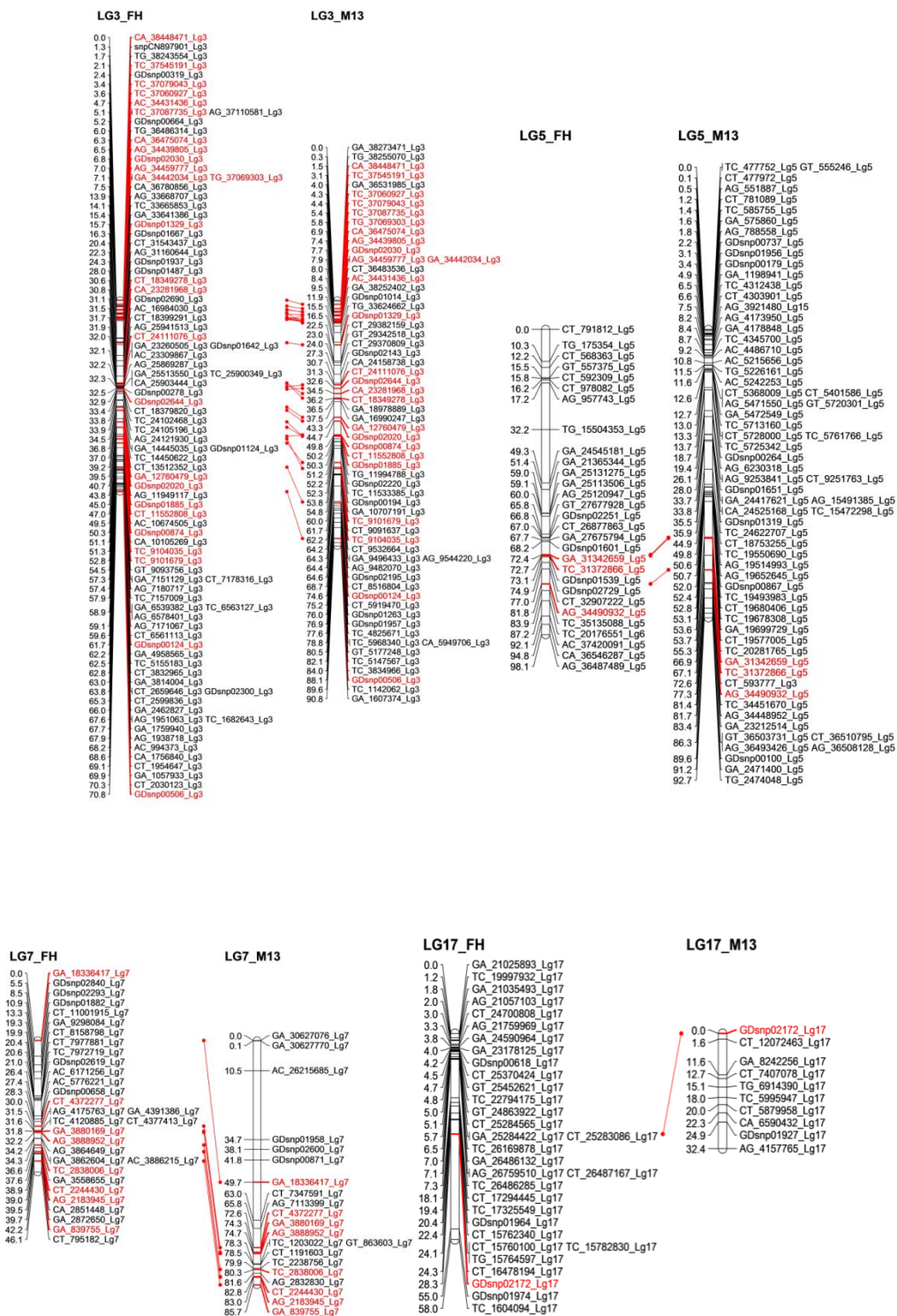
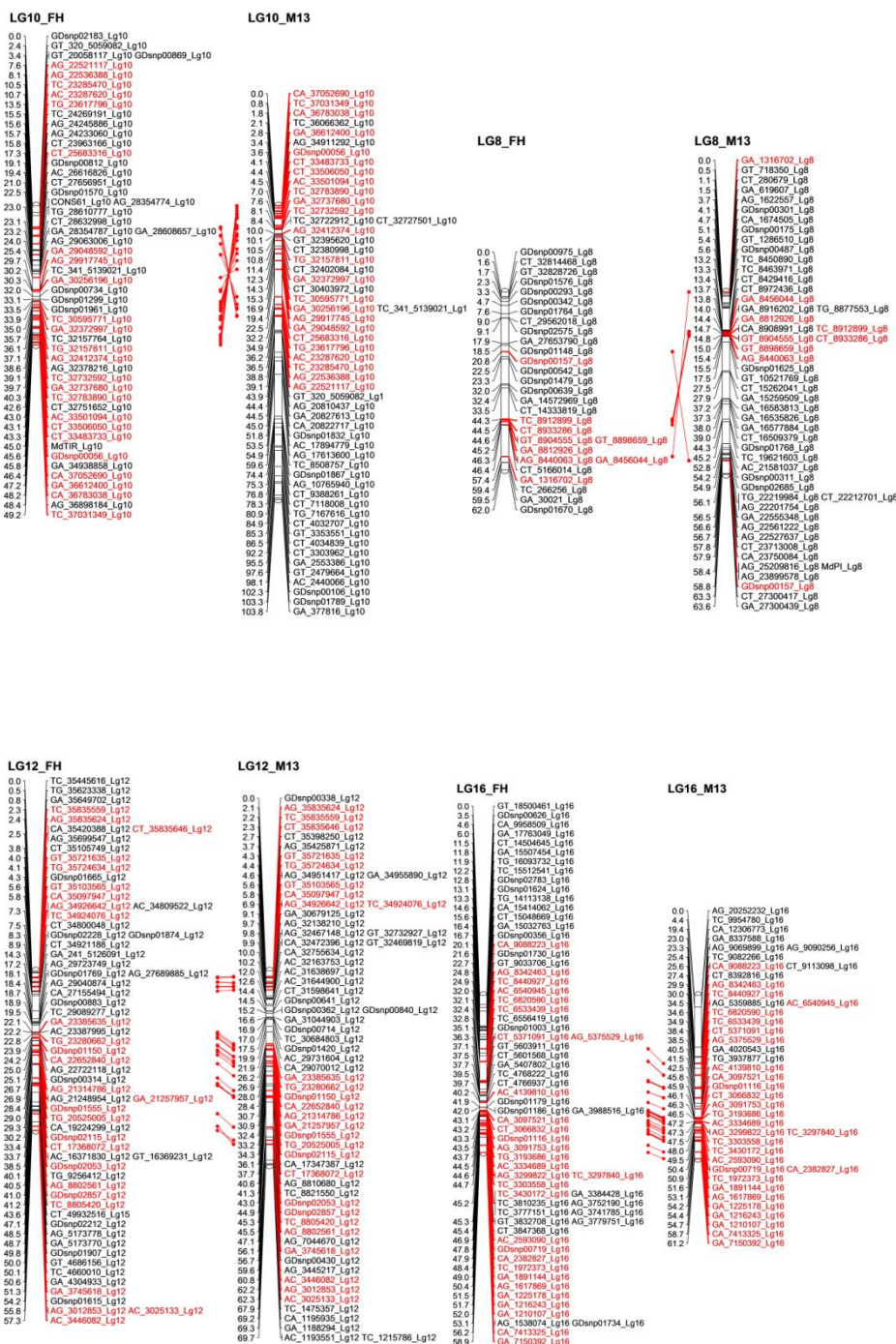


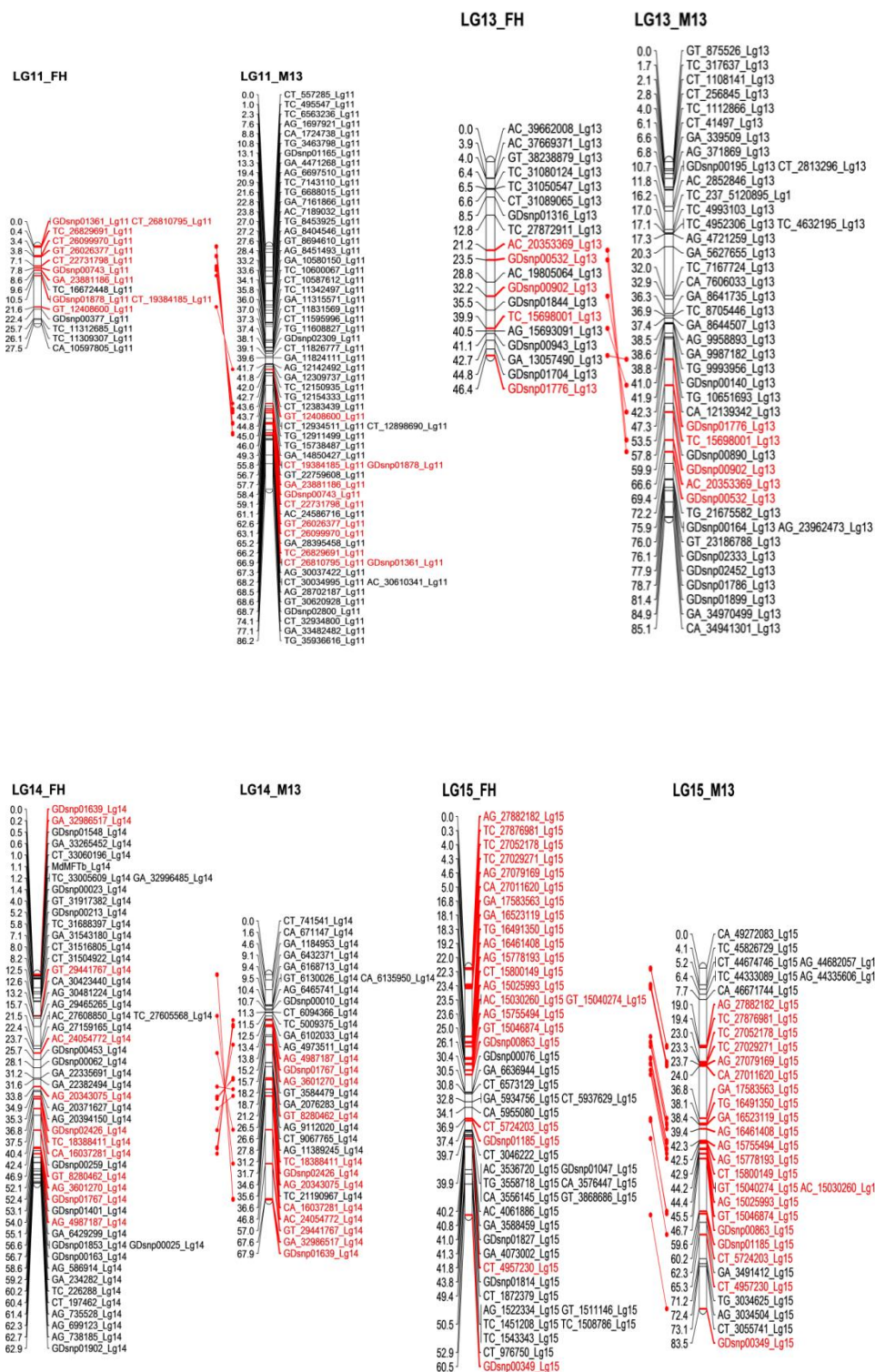
FIGURA SUPLEMENTAR 1. Mapa de ligação da macieira para os parentais M13 e FH. Grupos homólogos estão indicados pelo alinhamento de marcadores comuns entre os mapas dos genitores identificados pela cor vermelha e ligados por linhas vermelhas. O comprimento dos grupos de ligação é apresentado em ordem crescente de cima para baixo, à esquerda em cM.



continuação FIGURA SUPLEMENTAR 1. Mapa de ligação da macieira para os parentais M13 e FH. Grupos homólogos estão indicados pelo alinhamento de marcadores comuns entre os mapas dos genitores identificados pela cor vermelha e ligados por linhas vermelhas. O comprimento dos grupos de ligação é apresentado em ordem crescente de cima para baixo, à esquerda em cM.



continuação FIGURA SUPLEMENTAR 1. Mapa de ligação da macieira para os parentais M13 e FH. Grupos homólogos estão indicados pelo alinhamento de marcadores comuns entre os mapas dos genitores identificados pela cor vermelha e ligados por linhas vermelhas. O comprimento dos grupos de ligação é apresentado em ordem crescente de cima para baixo, à esquerda em cM.



continuação FIGURA SUPLEMENTAR 1. Mapa de ligação da macieira para os parentais M13 e FH. Grupos homólogos estão indicados pelo alinhamento de marcadores comuns entre os mapas dos genitores identificados pela cor vermelha e ligados por linhas vermelhas. O comprimento dos grupos de ligação é apresentado em ordem crescente de cima para baixo, à esquerda em cM.

3.5 Referências bibliográficas

- ABPM - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MAÇÃ. [Dados obtidos da página]. Fraiburgo, [2015]. Disponível em: <http://www.abpm.org.br/>. Acesso em: 15 dez. 2015.
- ALENCAR, S. *et al.* SNP discovery in apple cultivars using next generation sequencing. **BMC Proceedings**, London, v. 5, p. 42-43, 2011. Supl. 7.
- ANTANAVICIUTE, L. *et al.* Development of a dense SNP-based linkage map of an apple rootstock progeny using the Malus Infinium whole genome genotyping array. **BMC Genomics**, London, v. 13, [art.] 203, p. [1-10], 2012.
- BOTELHO, R. V.; AYUB, R. A.; MÜLLER, M. M. L. Somatória de horas de frio e de unidades de frio em diferentes regiões do estado do Paraná. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 7, n. 1/2, p. 89-96, 2006.
- CAMPOY, J. A.; RUIZ, D.; EGEEA, J. Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: a review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 130, n. 2, p. 357-372, 2011.
- CAPPELLIN, L. *et al.* QTL analysis coupled with PTR-ToF-MS and candidate gene-based association mapping validate the role of Md-AAT1 as a major gene in the control of flavor in apple fruit. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 33, n. 2, p. 239-252, 2015.
- 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. **The New Phytologist**, Oxford, v. 192, n. 2, p. 378–392, 2011.
- CHEN, H. *et al.* Construction of a high-density simple sequence repeat consensus genetic map for pear (*Pyrus* spp.). **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 33, n. 2, p. 316–325, 2015.
- CLARK, M. D. *et al.* A consensus ‘Honeycrisp’ apple (*Malus × domestica*) genetic linkage map from three full-sib progeny populations. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 10, n. 3, p. 627-639, 2014.
- COVA, V. *et al.* High-resolution genetic and physical map of the *Rvi1* (*Vg*) apple scab resistance locus. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 35, [art.] 16, p. [1-13], 2015.
- EPPO - EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. EPPO crop growth stage keys - apple and pear. **EPPO Bulletin**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 291-294, 1984.
- DRUKA, A. *et al.* Expression quantitative trait loci analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 10-27, 2010.

FAN, S. *et al.* Mapping quantitative trait *loci* associated with chilling requirement, heat requirement and bloom date in peach (*Prunus persica*). **The New Phytologist**, Oxford, v. 185, n. 4, p. 917-930, 2010.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. [Dados obtidos da página]. Rome, [2015]. Disponível em: <http://www.fao.org/home/en/>. Acesso em: 15 dez. 2015.

FIORAVANÇO, C. *et al.* **Cultura da macieira no Rio Grande do Sul**: análise situacional e descrição varietal. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. (Documentos, 71).

GALLI, P. G. *et al.* High-resolution genetic map of the Rvi15 (*Vr2*) apple scab resistance *locus*. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 26, n. 4, p. 561-572, 2010.

GARDINER, S. E. *et al.* Apple. In: KOLE, C. (ed.). **Fruits and nuts**. Berlin: Springer, 2007. v. 4, p. 1-62. (Genome mapping and molecular breeding in plants, v. 4).

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, Baltimore, v. 137. n. 4, p. 1121–1137, 1994.

JANICK, J. *et al.* Apples. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (ed.). **Fruit breeding**. New York: John Wiley, 1996. v. 1, p. 1-77.

HORVATH, D. P. *et al.* Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 8, n. 11, p. 534-540, 2003

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**, Victoria, v. 25, p. 109–114, 2005.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. **Annals of Eugenics**, Chichester, v. 12, n. 1, p. 172-175, 1994.

LABUSCHAGNÉ, I. F. *et al.* Genetic variation in chilling requirement in apple progeny. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, VA, v. 127, n. 4, p. 663-672, 2002.

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**, Paris, v. 56, p. 259-263, 1999.

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, n. 1/2, p. 60-73, 1998.

- MORIMOTO, T.; BANO, K. Genetic and physical mapping of *Co*, a gene controlling the columnar trait of apple. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 11, [art.] 807, p. [1-11], 2015.
- MORIYA, S. *et al.* Fine mapping of *Co*, a gene controlling columnar growth habit located on apple (*Malus x domestica* Borkh.) linkage group 10. **Plant Breeding**, Oxford, v. 131, n. 5, p. 641-647, 2012.
- OLUKOLU, B. *et al.* Genetic linkage mapping for molecular dissection of chilling requirement and budbreak in apricot (*Prunus armeniaca* L.). **Genome**, Ottawa, v. 52, n. 10, p. 819–828, 2009.
- PARRAVICINI, G. *et al.* Identification of serine/threonine kinase and nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes in the fire blight resistance quantitative trait locus of apple cultivar ‘Evereste’. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 493-505, 2011.
- PETRI, J. L. *et al.* Dormência e indução à brotação em macieira. *In: A CULTURA da macieira*. Florianópolis: EPAGRI, 2006. p. 261-297.
- PORTO, D. D. *et al.* Transcription profiling of the chilling requirement for bud break in apples: a putative role for *FLC*-like genes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 9, p. 2659-2672, 2015.
- ROHDE, A.; BHALERAU, R. P. Plant dormancy in the perennial context. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 12, n. 5, p. 217-223, 2007.
- SÁNCHEZ-PÉREZ, R.; DICENTA, F.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, P. Inheritance of chilling and heat requirements for flowering in almond and QTL analysis. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 8, n. 2, p. 379–389, 2012.
- SEGURA, V. *et al.* Wide range QTL analysis for complex architectural traits in a 1-year-old apple progeny. **Genome**, Ottawa, v. 50, n. 2, p. 159–171, 2007.
- SOUZA, V. A. B.; BYRNE, D. H.; TAYLOR, J. F. Heritability, genetic and phenotypic correlations, and predicted selection response of quantitative traits in peach: II. An analysis of several fruit traits. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, VA, v. 123, n. 4, p. 604-611, 1998.
- TESSELE, C. **Mapeamento genético em populações de maçã (*Malus x domestica* Borkh.) segregando para caracteres agrônômicos associados à exigência de frio hibernal**. 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- 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**, Heidelberg, v. 6, n. 3, p. 489–502, 2010.

VAN OOIJEN, J. W. *et al.* **Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species.** [2015]. Disponível em: <https://www.kyazma.nl/index.php/MapQTL/>. Acesso em: 15 dez. 2015.

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

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

VOORIPS, R. E. **MapChart version 2.0:** windows software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. Wageningen: Plant Research International, 2002.

XU, K. A.; WANG, A.; BROWN, S. Genetic characterization of the Ma locus with pH and titratable acidity in apple. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 30, n. 2, p. 899-912, 2011.

YAMAMOTO, T. *et al.* Identification of QTLs controlling harvest time and fruit skin color in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). **Breeding Science**, [Tokyo], v. 64, n. 4, p. 351-361, 2014.

ZALAPA, J. E. *et al.* Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 99, n. 2, p. 193-208, 2012.

ZHANG, Q. *et al.* Identification, characterization, and utilization of genome-wide simple sequence repeats to identify a QTL for acidity in apple. **BMC Genomics**, London, v. 13, [art.] 537, p. [1-12], 2012.

ZHEBENTYAYEVA, T. N. *et al.* Dissection of chilling requirement and bloom date QTLs in peach using a whole genome sequencing of sibling trees from an F2 mapping population. **Tree Genetic Genomes**, Heidelberg, v. 10, n. 1, p. 35-51, 2014.

4 CONCLUSÕES GERAIS

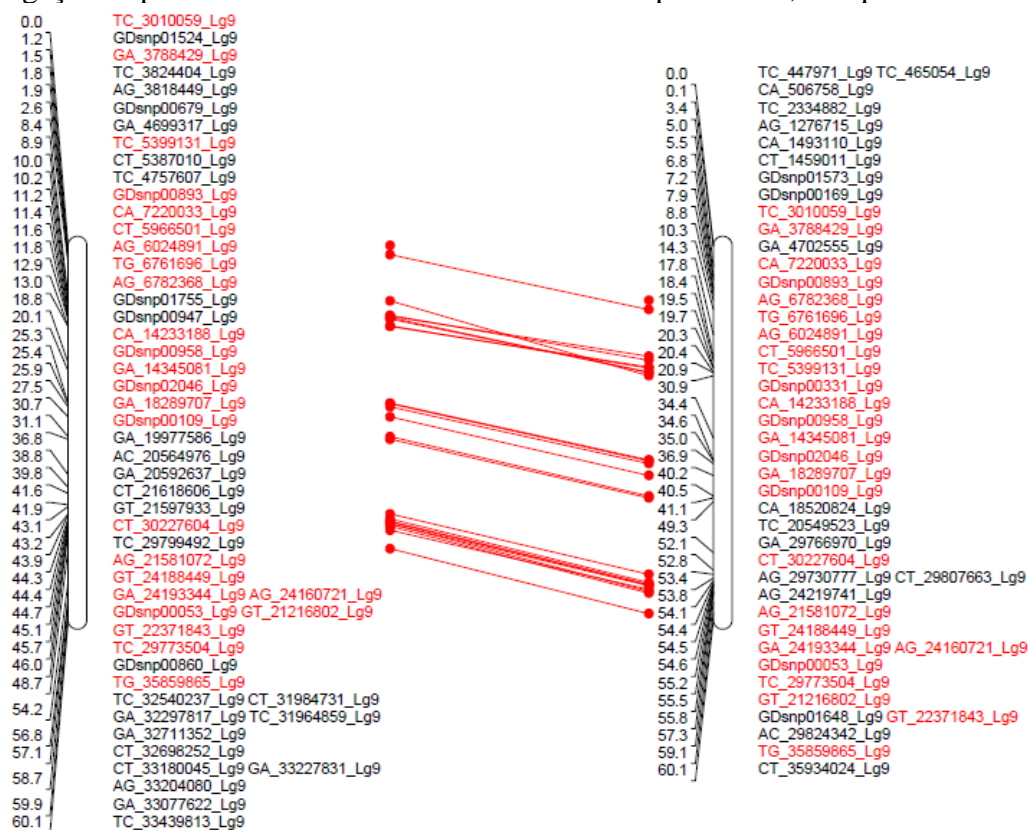
A estratégia utilizada para identificação e validação de novos SNPs possibilitou a incorporação destes no intervalo de confiança do QTL no grupo de ligação 9. Os mapas gerados após a saturação do *locus* apresentaram os 17 grupos de ligação e boa distribuição de marcadores, permitindo a prospecção de QTL. A extremidade do grupo de ligação 9 se manteve altamente explicativa para data de brotação em macieira. Nela está presente um gene predito com grande similaridade ao *Flowering Locus C*, de *Arabidopsis thaliana*. Reforçando a importância desta região no controle genético do requerimento de frio em macieira.

Métodos de biologia molecular como seleção assistida por marcadores moleculares podem contribuir significativamente para a seleção de genótipos melhor adaptados às regiões de cultivo sul brasileiras. Para tanto, é interessante validar os seis marcadores definidos neste trabalho em genótipos não aparentados, uma vez que todos apresentaram uma clara separação dos indivíduos em precoces e tardios. Se validados, estes podem ser utilizados como ferramenta auxiliar nos programas de melhoramento, tanto na seleção de genitores para cruzamentos direcionados, como na seleção de indivíduos com menor requerimento de frio hibernal.

5 ANEXOS

ANEXO A

Mapa de ligação para o grupo de ligação 9 de macieira definido por Tessele (2012). Marcadores comuns entre os mapas dos genitores são identificados pela cor vermelha e ligados por linhas vermelhas. O comprimento dos grupos de ligação é apresentado em ordem crescente de cima para baixo, à esquerda em cM.



ANEXO B

Características dos mapas genéticos de macieira definidos por Tessele (2012) para os genitores 'M13/91' e 'Fred Hough'.

Características	M13	FH
Número de marcadores mapeados	729	711
Média de marcadores/grupo de ligação	43	42
Comprimento total (cM)	1361	1066
Distância média mapeada entre <i>loci</i> (cM)	2,0	1,7

5 VITA

Yohanna Evelyn Miotto é filha de Dilva Terezinha Batistuz Miotto e Edemir Miotto. Nasceu em Chopinzinho, PR, em 25 de fevereiro de 1992. cursou o primeiro grau no Colégio Estadual Tancredo Neves em São João, PR, e o segundo grau no Colégio Mater Dei em Pato Branco, PR. Ingressou no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (Uergs) no ano de 2009. Durante a graduação atuou como bolsista de iniciação científica no Laboratório de Genética Molecular Vegetal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa em Uva e Vinho (Embrapa/CNPUV). Formou-se engenheira em 2014. No mesmo ano, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre - RS, ênfase em Melhoramento e Biotecnologia Vegetal.