

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

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFO-FISIOLÓGICA DA
INCOMPATIBILIDADE ALÉLICA ENTRE CULTIVARES DE MACIEIRA

CELSO LOPES DE ALBUQUERQUE JUNIOR

FLORIANÓPOLIS, SC
2005

CELSO LOPES DE ALBUQUERQUE JUNIOR

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFO-FISIOLÓGICA DA
INCOMPATIBILIDADE ALÉLICA ENTRE CULTIVARES DE MACIEIRA

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Santa Catarina, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em
Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Adriana C. M.
Dantas.

FLORIANÓPOLIS-SC, 2005

CELSO LOPES DE ALBUQUERQUE JUNIOR

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFO-FISIOLÓGICA DA
INCOMPATIBILIDADE ALÉLICA ENTRE CULTIVARES DE MACIEIRA

Dissertação julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais e aprovada em sua forma final pelo programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 21 de dezembro de 2005.

Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari
FIT/CCA/UFSC

Prof. Dr. Flávio Zanette
FIT/CCA/UFSC

Dr. Pedro Anísio Camilo
Epagri/SC

Dr. Aparecido Lima da Silva
FIT/CCA/UFSC

Ao Pai Celestial.

Aos meus familiares.

À minha adorável esposa.

AGRADECIMENTOS

Ao PAI CELESTIAL, que sempre esteve comigo, dando força e coragem para prosseguir, mostrando que o amor e a humildade superam qualquer barreira.

A todos os professores, funcionários e técnicos, que de alguma forma colaboram para a excelência do programa de pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Ao professor Rubens Onofre Nodari, pela orientação, pela amizade, pela paciência e confiança durante esse período.

À Dra. Adriana Dantas pela paciência e dedicação.

A todos os funcionários da Estação Experimental de Caçador, em especial ao pesquisador Frederico Denardi, pelo grande incentivo e ajuda na realização dos trabalhos, e pela grande amizade construída ao longo dos anos.

Aos colegas e amigos do curso, em especial aos do laboratório: Maguida, Natasha, Sarah, Karine, Cris, Sandra, Luísa e Volmir.

Aos professores e alunos do curso de Agronomia da Unisul, pelo apoio e carinho a mim dedicado.

A todos os meus amigos, principalmente ao: Tiano, Alex, Rafael, Urba, Anderson, Jefinho, Juninho, Xande, Luciano, Gean e o bispo Violin, por mostrarem que a amizade é uma parte da felicidade.

À minha afilhada Letícia, pelo amor e carinho, e principalmente por sua alegria de criança.

Aos meus pais, Celso e Zilda, pelo amor e compreensão durante todos os anos de minha vida.

Aos meus amados irmãos Cleyton e Cleber, que são os meus tesouros e o meu grande orgulho.

À minha amada esposa Márcia, pela paciência, amor, e compreensão durante esses anos delicados.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

“O que adquire entendimento ama a sua alma; o que cultiva a inteligência achará o bem” (Provérbios. 19:8).

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFO-FISIOLÓGICA DA
INCOMPATIBILIDADE ALÉLICA ENTRE CULTIVARES DE MACIEIRA

Autor: Celso Lopes de Albuquerque Junior

Orientador: Dr. Rubens Onofre Nodari

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar os alelos-S, de incompatibilidade gametofítica, de cultivares de macieira criadas em Santa Catarina, visando dar suporte na escolha de combinações de parentais nos programas de melhoramento genético e estabelecer combinações 'produtoras/polinizadoras' de forma adequada na formação de pomares. Na caracterização molecular foram testados 16 iniciadores específicos de alelos-S. Paralelamente, foram avaliados o número de grãos de pólen por antera, a taxa de germinação *in vitro*, a compatibilidade 'pólen/estigma' em cruzamentos através da observação do desenvolvimento do tubo polínico no pistilo da flor, e o número de frutos formados – frutificação efetiva - em cruzamentos com diferentes níveis de incompatibilidade, envolvendo até 14 cultivares. A análise molecular, comparativamente às cultivares referências, mostrou que as cultivares Daiane, Imperatriz e Princesa apresentam os mesmos alelos de incompatibilidade, S3 e S5; enquanto que Lisgala apresenta os alelos S2 e S5; Suprema, S1 e S9, Catarina, S1 e S19, Joaquina e Fred Hough, S5 e S19; Baronesa, S3 e S9 e Duquesa, S2 e S3. Nas cultivares Primícia e Condessa foram encontrados apenas um dos alelos-S, S24 e S2, respectivamente, permanecendo o segundo alelo ainda desconhecido. A validação da identificação foi obtida com teste de progênie. Assim, a proporção observada de alelos S em duas populações segregantes não apresentou desvio significativo da proporção esperada. No ensaio de viabilidade de pólen, os resultados obtidos mostraram que todas as cultivares estudadas produzem pólen com boa capacidade germinativa. A taxa média de germinação foi maior que 60% em todas as cultivares. Mesmo havendo grande número de parentais em comum entre as cultivares estudadas, na grande maioria das polinizações cruzadas, o tubo polínico cresceu até o ovário. Já na auto-polinização (cv. Condessa), o tubo polínico não se desenvolveu, não atingindo o ovário, confirmando a existência da auto-incompatibilidade gametofítica nesta variedade. O cruzamento entre as cultivares Baronesa X Fred Hough resultou em frutificação efetiva de 95,4%, confirmando a existência de total compatibilidade gametofítica entre ambas; por outro lado, na autopolinização da cv. Fred Hough e no cruzamento entre as cultivares Imperatriz e Daiane, não houve formação de frutos, demonstrando também a presença de incompatibilidade gametofítica nestas três cultivares. Os resultados da análise molecular dos alelos S podem ser considerados robustos, não só pela inferência a partir das cultivares referências, mas também pelas análises de herdabilidade e frutificação efetiva feitas nas progênies.

Palavras chave: *Malus x domestica*, polinização, melhoramento genético

MOLECULAR AND MORFO-PHYSIOLOGIC CHARACTERIZATION OF THE
ALLELIC INCOMPATIBILITY OF APPLE CULTIVARS

Author: Celso Lopes de Albuquerque Junior

Supervisor: Dr. Rubens Onofre Nodari

ABSTRACT: The research purpose of this study was to identify and to characterize the S alleles of the gametophytic incompatibility among apple cultivars developed in Santa Catarina, seeking to give support in the choice of combinations of parental in the apple breeding programs and on the adequate choice of 'scion/pollinator cultivars' to production orchards. For the molecular characterization, 16 specific alleles-S primers were tested. It was also evaluated the amount of pollen grains by counting the grains of pollen per anther, the rate of pollen germination *in vitro*, the compatibility of the crosses by measuring the development of the pollen tubes in the pistil and the number of fruits formed – fruit set - among crosses with different incompatibility levels, involving, at most 14 cultivars. The molecular analysis, comparatively to the reference cultivars, showed that the cultivars Daiane, Imperatriz and Princesa showed the same incompatibility alleles S3 and S5, while Lisgala presented the alleles S2 and S5; Suprema, S1 and S9; Catarina, S1 and S19; Joaquina and Fred Hough, S5 and S19; 'Baronesa', S3 and S9; 'Duquesa', S2 and S3; and for Primícia and Condessa it was detected just one of the alleles-S, being S24 and S2, respectively, remaining to be identified the second allele. To validate the allele identification it was performed a progeny test. Therefore, the observed proportion of S alleles in two segregating progenies did not significantly deviate from the expected ones. In terms of pollen viability, the results obtained showed that all studied cultivars produced pollen with good germination capacity. The medium germination rate was larger than 60% in all 12 tested cultivars. Even though the existence of strong parentage among the studied cultivars, on most of the crosses made, the pollen tubes grew down until the ovary. However, in the self-pollinated cv. Condessa, the pollen tubes did not grow at all, confirming the existence of the self-incompatibility in that apple cultivar. The crosses among the cultivars Baronesa and Fred Hough resulted on fruit-set of 95.4%. By self-pollination of cv. Fred Hough or crossing 'Imperatriz with Daiane' the obtained progeny did not set any fruit, showing the presence of gametophytic incompatibility as well in these cultivars. Overall, the results obtained towards molecular analysis can be taken as robust, since they were not only inferred from comparison to reference cultivars, but also based on progeny tests and fruit set performance.

Key words: *Malus x domestica*, pollination, breeding

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama de uma flor de macieira cortada longitudinalmente para mostrar as suas partes (Macdaniels & Heinicke, 1929)	12
Figura 2	Sistema de auto-imcompatibilidade gametofítica em macieira	16
Figura 3	Separação de produtos amplificados para cada alelos-S em macieira	25
Figura 4	Quantificação de DNA feita em gel de agarose (0,8%), corado com Brometo de etídio (0,02%), tendo como padrão de λ DNA.	34
Figura 5	Separação de produtos amplificados (alelo-S) em macieira.....	35
Figura 6	Representação genealógica da cultivar de macieira Daiane, com os alelos-S dos pais.	37
Figura 7	Representação genealógica da cultivar de macieira Baronesa, com os alelos-S dos pais.....	38

Figura 8	Freqüência dos alelos-S nas cultivares e seleções objeto deste estudo. CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.....	41
Figura 9	Figura 9 Germinação de grãos de pólen em meio de cultura, mostrando o desenvolvimento do tubo polínico. CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.....	48
Figura 10	A- Superfície estigmática da cultivar Imperatriz, com pólen da cultivar Suprema (Cruzamento 100% compatível). B - Superfície estigmática da cultivar Imperatriz, com pólen da cultivar Daiane (Cruzamento 100% incompatível). C- Estilete aberto (cruzamento dirigido da cultivar Imperatriz com a cultivar Suprema - Cruzamento 100% compatível). D- Estilete aberto (cruzamento dirigido da cultivar Imperatriz com a cultivar Daiane - Cruzamento 100% incompatível). CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.....	53
Figura 11	(A) estágio ideal para cruzamentos (balão), (B) duas flores já emasculadas e uma sendo emasculada com o auxílio da tesoura, (C) frasco de vidro com pólen e flores à serem polinizadas e (D) polinização realizada com a ponta do dedo indicador	56
Figura 12	(A) flor recém ensacada após a polinização, (B) planta com diversas flores polinizadas e ensacadas, (C) flores amareladas (incompatibilidade gametofítica) e (D) frutos oriundos de um cruzamento compatível.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição das cultivares de macieira desenvolvidas pela Epagri e suas principais características.....	09
Tabela 2	Lista de cultivares criadas e seleções obtidas pelo programa de melhoramento genético da Epagri-SC com seus respectivos genitores, e das cultivares referências de alelos-S.....	20
Tabela 3	Seqüência de nucleotídeos e condições de PCR para iniciadores específicos alelo-S.....	24
Tabela 4	Código no GeneBank, origem do cDNA clonado e cultivares referência para alelos-S em macieira.....	26
Tabela 5	Cruzamentos para o estudo de desenvolvimento de tubo polínico, realizados na Epagri/ Estação Experimental de Caçador, SC.....	30
Tabela 6	Classes para avaliação do comprimento do tubo polínico crescido no estilete de flores de macieira. Epagri/EECD – CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.....	32

Tabela 7	Cruzamentos para o estudo da frutificação efetiva (<i>fruit set</i>). Epagri/Estação Experimental de Caçador, SC, 2005.....	33
Tabela 8	Cultivares e Seleções estudadas com seus respectivos alelos-S encontrados. CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.....	36
Tabela 9	Segregação para alelos-S no cruzamento entre as seleções M46-94 e M13-91. CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.....	42
Tabela 10	Segregação para alelos-S no cruzamento entre as cultivares Imperatriz X Catarina. CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.....	43
Tabela 11	Número de anteras por flor em diferentes cultivares de macieira. CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.....	44
Tabela 12	Número médio de grãos de pólen por antera, número médio de anteras por flor e número de grãos de pólen por flor. CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.....	45
Tabela 13	Porcentagem de germinação <i>in vitro</i> do pólen de 9 cultivares de macieira desenvolvidas no Sul do Brasil. CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.....	47
Tabela 14	Distribuição das cultivares produtoras e respectivas polinizadoras no grupo objeto deste estudo para o Sul do Brasil. Epagri/EECD, Florianópolis, 2005.....	48
Tabela 15	Porcentagem média de tubos polínicos que atingiram o	

ovário e o óvulo cento e vinte horas após a polinização à campo de flores de macieira em estágio de balão rosado.

CCA/UFSC, Florianópolis, 2005..... 50

Tabela 16

Frutificação efetiva obtidos durante o ciclo de 2005/06 nas cultivares de macieira Baronesa, Daiane, Imperatriz e Fred Hough, polinizadas com cultivares de diferentes níveis de incompatibilidade gametofítica. Epagri/EECD, Florianópolis, 2005..... 55

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
1. INTRODUÇÃO	01
2. JUSTIFICATIVA	04
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	06
3.1 Melhoramento genético da macieira	06
3.2 Polinização na macieira	11
3.3 Incompatibilidade na macieira	13
4. OBJETIVOS.....	18
4.1 Geral	18
4.2 Específicos	18
5. MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1 Material vegetal	19
5.2 Coleta das amostras	20

5.3	Extração de DNA	21
5.4	Reação com marcadores alelos-S.....	22
5.5	Segregação dos alelos-S	27
5.6	Número de anteras e grãos de pólen	27
5.7	Germinação de pólen <i>in vitro</i>	28
5.8	Desenvolvimento do tubo polínico	29
5.9	Frutificação efetiva	32
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6.1	Quantificação do DNA	34
6.2	Reação com marcadores específicos de alelo-S	35
6.3	Segregação dos alelos-S	41
6.4	Número de anteras e grãos de pólen	43
6.5	Germinação de pólen <i>in vitro</i>	46
6.6	Desenvolvimento do tubo polínico	49
6.7	Frutificação efetiva	54
7	CONCLUSÕES.....	58
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

A cultura da macieira é destaque na economia de Santa Catarina, pois o Estado vem mantendo-se como maior produtor brasileiro há vários anos (Icepa, 2004). Devido a esta grande importância sócio-econômica que a macieira representa para este Estado, iniciou-se em 1973 um programa de melhoramento genético, no âmbito da Epagri (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina), que tem como objetivo principal desenvolver e avaliar cultivares adaptáveis e resistentes às principais doenças e pragas existentes no Estado de Santa Catarina (Denardi & Hough, 1987).

Cerca de 90% da produção mundial de maçã provém do hemisfério norte, ficando o hemisfério sul responsável por apenas 10% dessa produção (Cogo, 1996). O sistema produtivo da maçã no Brasil envolveu 1.523 produtores no Estado de Santa Catarina, 698 no Rio Grande do Sul e 32 no Paraná, totalizando 2.253 produtores na safra 2002/03. Este setor gera diretamente em torno de 46.000 empregos permanentes. A área cultivada em 2003 foi de 31.516 hectares com produção ultrapassando as 989.961 toneladas, sendo que 90% desta foi oriunda das cultivares Gala, Fuji e suas mutações (ABPM, 2004).

As cultivares de macieira necessitam de polinização cruzada, pois esta espécie apresenta mecanismo de auto-incompatibilidade (*SI*), o qual é um sistema muito difundido para prevenir a auto-fertilização, que é controlada por um único loco denominado *S* (Lundqvist, 1964; de Nettancourt, 2001). Esta incompatibilidade é geneticamente controlada, sendo do tipo gametofítica, ocorrendo sempre que o pólen e o estigma apresentam o mesmo alelo-*S*. Quando os alelos são idênticos, a velocidade de crescimento do tubo polínico é lenta, ou até mesmo nula, retardando a sua penetração até o ovário. Assim, ao atingi-lo, dificilmente ocorrerá à fecundação, pois o óvulo em geral já não está mais receptivo (Frankel et al., 1977).

A polinização cruzada depende da co-existência de cultivares compatíveis, de insetos vetores para a transferência do pólen entre estas, durante o florescimento e das condições climáticas. Uma baixa eficiência de polinização contribui para uma baixa produtividade, que pode continuar ocorrendo nos anos subseqüentes em pomares comerciais (Goldway et al., 1999). Desta forma, a identificação desta incompatibilidade entre cultivares comerciais pode auxiliar na seleção de cultivares polinizadoras compatíveis e ser um dos fatores determinantes para o sucesso da produção.

Métodos convencionais, como testes de polinização para determinar a incompatibilidade existente entre cultivares, vem sendo utilizados há muito tempo (Kobel et al., 1939). Isoenzimas e de Glicoproteínas -*S* são também freqüentemente utilizadas para esta finalidade; entretanto, dependem de metodologias demoradas e os resultados quase sempre são de difícil interpretação (Sakurai et al., 2000). Janssens et al. (1995) e Sakurai et al. (1997) desenvolveram marcadores moleculares específicos baseados em

seqüências de nucleotídeos de cDNAs de alelos-*S*, os quais desde então têm sido utilizados na identificação da série alélica *S* em diversas cultivares e espécies de macieiras.

A proposta deste trabalho foi realizar a caracterização molecular de alelos-*S* em cultivares de macieiras de grande importância nacional, acompanhada da avaliação a campo da frutificação efetiva de quatro cruzamentos, da caracterização germinativa de grãos de pólen e do desenvolvimento do tubo polínico *in vivo* de doze cultivares.

2. JUSTIFICATIVA

A informação genética obtida sobre a incompatibilidade alélica em genótipos de macieira pode ser utilizada no planejamento de estratégias de melhoramento, com hibridações controladas e também no desenho de pomares que garanta uma adequada polinização com o uso de cultivares compatíveis.

O desenvolvimento de marcadores que detectem os alelos *S* possibilitou avançar no conhecimento sobre o sistema auto-incompatibilidade genética em macieira, além de confirmar o 'pedigree' de muitas cultivares. Do ponto de vista prático, a análise via PCR pode agrupar as cultivares de cruzamento sexual em incompatíveis (quando alelos-*S* não diferem), em compatível (ambos os alelos-*S* diferem) e semi-incompatível (um alelo-*S* é comum) (Van Nerun et al., 2001).

O conhecimento do genótipo-*S* em cultivares de macieira tem sido utilizado na seleção de parentais compatíveis em vários programas de melhoramento genético de outros países. Além disso, esta identificação pode permitir ao melhorista o uso de um grande número de alelos-*S* nas cultivares a serem selecionadas, o que garantiria uma ampla segregação nas progênies, e conseqüentemente, um bom fluxo gênico entre as cultivares (Sakurai et al., 1997).

Dados sobre a viabilidade e o desenvolvimento fisiológico de grãos de pólen também são fundamentais para os estudos da biologia reprodutiva e do melhoramento genético desta espécie, pois podem proporcionar maior sucesso nos cruzamentos (Modlibowska, 1956; Okuse, 1994; Grauslund, 1996; Milutinovic et al., 1996; Nunes et al., 2001, Dantas et al., 2005).

A caracterização molecular e morfofisiológica permite um melhor entendimento dos mecanismos de incompatibilidade existentes nas cultivares utilizadas no programa de melhoramento genético, bem como subsídios para o plantio e manejo de pomares para produção de maçãs.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MELHORAMENTO GENÉTICO DA MACIEIRA

O número exato de espécies do gênero *Malus* não é conhecido; entretanto, estima-se que variam de 25 a 122 (Ponomarenko, 1986). A distinção de espécies primárias a partir de híbridos interespecíficos é dificultada devido a falta de exatidão nas análises genéticas, bioquímicas e morfológicas. A mesma incerteza aplica-se também para o centro de origem da *Malus*, embora aceita-se que a macieira é originária da Ásia ocidental, região do Cáucaso e China ocidental (Watkins, 1995). A maioria das cultivares de macieira é diplóide ($2n=34$), mas vários estudos têm sugerido que seus genomas seriam complexos poliplóides (Zhang et al., 1988). A origem do número básico haplóide de espécies do gênero *Malus* e outras Pomoideae, $x=17$, tem sido atribuída a hibridação ancestral entre dois tipos selvagens remotos, Prunoideae ($x=8$) e Spiraeoideae ($x=9$) (Challice e Westwood, 1973). Se isto de fato ocorreu, a macieira pode ser considerada uma espécie aloploplóide.

Malus x domestica Borkh. é um híbrido interespecífico (Korban, 1986), formado com contribuição genômica de *Malus sylvestris* Mill., *Malus prunifolia*

Borkh. e *Malus baccata* Borkh., que estariam envolvidas, em diferentes graus, no desenvolvimento da grande parte das variedades de macieiras atualmente cultivadas (Challice, 1981).

Watkins (1995) obteve evidências de que *Malus sieversii* é a espécie que mais tem contribuído para a formação de *Malus domestica*, e que espécies como *Malus prunifolia* e *Malus asiática* têm contribuído com a característica resistência a inverno rigoroso (*hardiness winter*) para algumas cultivares. Resistência à doenças por outro lado, teria sido derivada de *Malus zumi* e *Malus floribunda*. Contudo, *Malus mandshurica* é provavelmente a melhor fonte de resistência à doenças do gênero *Malus* (Watkins, 1995). Entretanto, nos últimos anos, várias outras espécies de *Malus* têm sido utilizadas como doadoras de genes para novas variedades de macieiras cultivadas via cruzamentos sexuais interespecíficos, controlados ou ao acaso (Way et al., 1990).

As espécies de macieira são altamente heterozigotas, sendo a heterose o mecanismo para se estabilizarem ou se desenvolverem evolutivamente, residindo na fecundação cruzada os principais eventos que conduzem a isso. Segundo Brown (1975), praticamente todas as cultivares de macieira são auto-incompatíveis em alto grau. Algumas delas são completamente auto-incompatíveis, e aquelas que parecem ser auto-compatíveis produzem maior quantidade de frutos com maior número de sementes quando polinizadas por uma cultivar compatível, mostrando que, mesmo em tais casos, existe algum grau de auto incompatibilidade.

Apesar de enorme variabilidade genética nas espécies do gênero *Malus*, o melhoramento tem sido realizado somente com um limitado “pool” gênico.

Desta maneira, um grande número de cultivares comerciais foram derivados principalmente a partir de cruzamentos nos quais um dos genitores foi “Golden Delicious” e/ou “Cox’s Orange Pippin” (Noiton & Shelbourne, 1992).

O desenvolvimento de novas cultivares requer pelo menos 12 anos. No melhoramento convencional seleciona-se as plantas resultantes de uma combinação genética, via de regra obtida por hibridação dirigida. O período de pré-seleção pode demorar até dois anos e a seleção dos genótipos recombinantes de interesse (seleções) mais quatro anos. A partir de então, o processo de avaliação em coleções leva, pelo menos, seis anos. Com o uso de marcadores moleculares e outras técnicas como ‘ferramentas’ auxiliares, pode-se dinamizar a avaliação de algumas características específicas, facilitando com isso o futuro processo de avaliação das progênies.

As populações segregantes a serem testadas, devem mostrar suficiente variabilidade genética para proporcionar a seleção de genótipos a campo que satisfaçam a demanda do mercado futuro (Shelbourne et al., 1986). Estas populações melhoradas devem incluir genótipos que apresentam boa adaptabilidade edafoclimática e boas características de frutificação (IPGRI, 1982).

A produção brasileira está baseada praticamente em duas cultivares, Gala e Fuji, cujos plantios estão localizados e são restritos a área de maior frio hibernal, devido a suas exigências climáticas. A cultivar Fuji tem como principais limitações a fraca coloração da epiderme e quando cultivada em altitudes inferiores a 1.200 m apresenta desuniformidade de tamanho e formato dos frutos. A cultivar Gala não consegue expressar todas as suas características em locais que apresentem frio hibernal insuficiente (< 1200 m).

As opções de cultivares para atender as condições climáticas locais e, ao mesmo tempo, as exigências do mercado brasileiro ainda são muito limitadas (Denardi & Camilo, 1997). Outro fator importante é que a maioria das cultivares polinizadoras ainda usadas tem frutos de sabor ácido, impróprio para o mercado brasileiro e possui epiderme verde, que é pouco apreciada, como é o caso das cultivares Willie Sharp e Granny Smith.

Devido à falta de adaptabilidade climática das cultivares, associado aos problemas com pragas e doenças, em 1973 a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina (EMPASC), hoje Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), iniciou um programa de melhoramento genético da macieira (Hauagge & Bruckner, 2002). Atualmente, o programa de melhoramento genético da macieira na Epagri/Estação Experimental de Caçador e Epagri/Estação Experimental de São Joaquim trabalham objetivando a criação de novas variedades imunes ou resistentes as principais doenças como a sarna (*Venturia inaequalis*) e à mancha foliar de Gala (*Colletotrichum gloeosporioides*) podridão amarga (*Glomerella cingulata*). O programa de Caçador também tem por objetivo desenvolver cultivares com menos necessidade de frio, adaptadas às condições edafoclimáticas das regiões produtoras do Estado de Santa Catarina. A Epagri já lançou várias cultivares de macieira provenientes do programa de melhoramento genético, dentre elas: Primícia (Denardi et al., 1986), Princesa (Denardi et al., 1986), Fred Hough (Denardi & Camilo, 1994), Catarina (Boneti et al., 1996), Baronesa (Denardi & Camilo, 1997), Lisgala (Denardi et al., 1997), Fuji Suprema (Petri et al., 1997), Condessa (Denardi & Camilo, 1998c), Daiane (Denardi & Camilo, 1998a), Duquesa (Denardi &

Camilo,1998b) e Imperatriz (Denardi & Camilo,2000) e Joaquina (Pereira et al., 2003), cujas características estão explicitadas na Tabela 1.

TABELA 1. Descrição das das cultivares de macieira desenvolvidas pela Epagri e suas principais características.

Descrição	Primícia	Princesa	Fred Hough	Imperatriz	Fuji-Suprema	Joaquina
Origem	E.U.A	E.U.A	E.U.A	BRASIL	BRASIL	E.U.A
Genitores	D1R101T117 x D1R103T245	NJ56 x Anna	NJ – 76 x Coop – 14	Gala x Mollie's Delicious	Mutação da Fuji	NJ-76 x Coop-14
Porte da copa	Vigoroso	Semi-vigoroso	Semi-anão	Vigoroso	Vigoroso	Semi-vigoroso
Habito vegetativo	Aberto	Semi-aberto	Fechado	Semi-aberto	Semi-aberto	Semi-aberto
Exigência em frio	Média (>500 horas)	Baixa (<450 horas)	Média (>500 horas)	Média (>500 horas)	Alta (>800 horas)	Alta (>800 horas)
Período de floração	03/10 a 15/10	25/08 a 20/09	20/09 a 10/10	23/09 a 20/10	25/09 a 15/10	09/09 a 30/09
Início de maturação	15/01 a 15/02	15/01 a 30/01	20/02 a 15/02	05/02 a 20/02	28/03 a 15/04	19/02 a 01/03
Cor epiderme	Vermelho intenso	Vermelho rajado	Vermelho estriado	Vermelho estriado	Vermelho-sólido	Vermelho
Formato do fruto	Arredondado	Arredondado cônico	Arredondado cônico	Oblongo-cônico	Arredondado	Achatado-globoso
Peso médio (g)	160	150	135	150	125	200
Cor da polpa	Branco-creme	Branco-creme	Amarelo-creme	Amarelo-creme	Amarelo-creme	Amarelo-creme
Sarna	Imune	Suscetível	Imune	Suscetível	Suscetível	Resistente
Oídio	Tolerante	Suscetível	Suscetível	Tolerante	Tolerante	Tolerante
Podridão amarga	Tolerante	Suscetível	Suscetível	Tolerante	Suscetível	Suscetível
Fonte	Denardi et al., 1986.	Denardi et al., 1986.	Denardi & Camilo, 1994.	Denardi & Camilo, 2000.	Petri et al., 1997.	Pereira et al., 2003.

(continuação...)

Descrição	Baronesa	Lisgala	Catarina	Condessa	Duquesa	Daiane
Origem	BRASIL	BRASIL	BRASIL	BRASIL	E.U.A	BRASIL
Genitores	Princesa x Fuji	Mutação da Gala	Fuji x PWR37T133	Gala x M-41	Anna x D1R100T147	Gala x Princesa
Porte da copa	Semi-vigoroso	Semi-vigoroso	Semi-vigoroso	Semi-anão	Vigoroso	Semi-vigoroso
Habito vegetativo	Semi-aberto	Semi-aberto	Semi-aberto	Aberto	Fechado	Fechado
Exigência em frio	Média (>500 horas)	Alta (>800 horas)	Média (>500 horas)	Baixa (< 500 horas)	Baixa (< 500 horas)	Média (>500 horas)
Período de floração	20/09 a 10/10	28/09 a 25/10	22/09 a 09/10	05/09 a 25/09	05/09 a 25/09	10/10 a 30/10
Início de maturação	28/03 a 115/04	28/01 a 15/02	19/03 a 02/04	05/01 a 15/01	20/01 a 05/02	05/03 a 25/03
Cor epiderme	Vermelho opaca	Vermelho sólido	Vermelho-rajado	Vermelho com estrias	Vermelho-escarlate	Vermelho-estriado
Formato do fruto	Arredondado	Arredondado cônico	Arredondado cônico	Arredondado oblongo	Arredondado oblongo	Cônico
Peso médio (g)	130	120	180	120	120	125
Cor da polpa	Branco-creme	Branco-creme	Amarelo-esbranquiçado	Branco-creme	Branco-creme	Amarelo-creme
Sarna	Tolerante	Suscetível	Resistente	Tolerante	Resistente	Resistente
Oídio	Tolerante	Tolerante	Suscetível	Tolerante	Tolerante	Resistente
Podridão amarga	suscetível	Suscetível	Suscetível	Suscetível	Suscetível	Resistente
Fonte	Denardi & Camilo, 1997a.	Denardi et al., 1997.	Boneti et al., 1996	Denardi & Camilo, 1998c.	Denardi & Camilo, 1998b.	Denardi & Camilo, 1998a.

3.2 POLINIZAÇÃO NA MACIEIRA

Polinização é o evento chave na reprodução de plantas, agindo no estímulo ao crescimento e desenvolvimento do ovário (Dong et al., 1998). É a transferência do grão de pólen da antera para o estigma. Segundo Jensen (1973), o grão de pólen que cai sobre o estigma de uma flor em poucas horas germina. Crescendo vários milímetros por hora, este tubo prossegue através dos tecidos do estigma e estilete, até atingir o óvulo, caracterizando então a fecundação. A flor de macieira, de acordo com a descrição de Brown (1975), é periantada, completa, constituída por cálice com cinco sépalas, corola com cinco pétalas, aproximadamente vinte estames e pistilo dividido em cinco estiletos. O ovário é ínfero e possui cinco carpelos, cada um contendo dois óvulos.

Dados sobre a viabilidade e o desenvolvimento fisiológico de grãos de pólen são fundamentais para os estudos da biologia reprodutiva e do melhoramento genético da macieira, pois asseguram maior sucesso nos cruzamentos. Knowlton (1935) observou grande variação na produção de pólen por antera entre cultivares. O autor verificou também que a produção de pólen de uma cultivar varia de um ano para outro e de uma planta para outra no mesmo ano.

Petri (1976) constatou que o número de grãos de pólen por antera, de diversas cultivares de macieira, na região produtora de Fraiburgo - Estado de Santa Catarina, manteve-se entre dois e três mil. Estes valores foram considerados muitos baixos em comparação com os obtidos nos Estados Unidos e Japão, que oscilam entre cinco e dez mil grãos de pólen por antera.

A avaliação das plantas polinizadoras envolve polinizações manuais, controladas a campo, combinadas com análises laboratoriais, para determinar a qualidade dos grãos de pólen (Souza e Raseira, 1998). Várias pesquisas têm sido conduzidas visando estabelecer e/ou padronizar meios de cultura e condições ambientais para avaliar a viabilidade de pólen em diversas espécies, tais como *Prunus avium* (Askin et al., 1990), *Malus domestica* (Okuse, 1994; Stösser et al., 1997), *Pyrus* spp. (Li et al., 1991; Souza e Raseira, 1998) e *Vitis* spp. (Sharma e Bist, 1991).

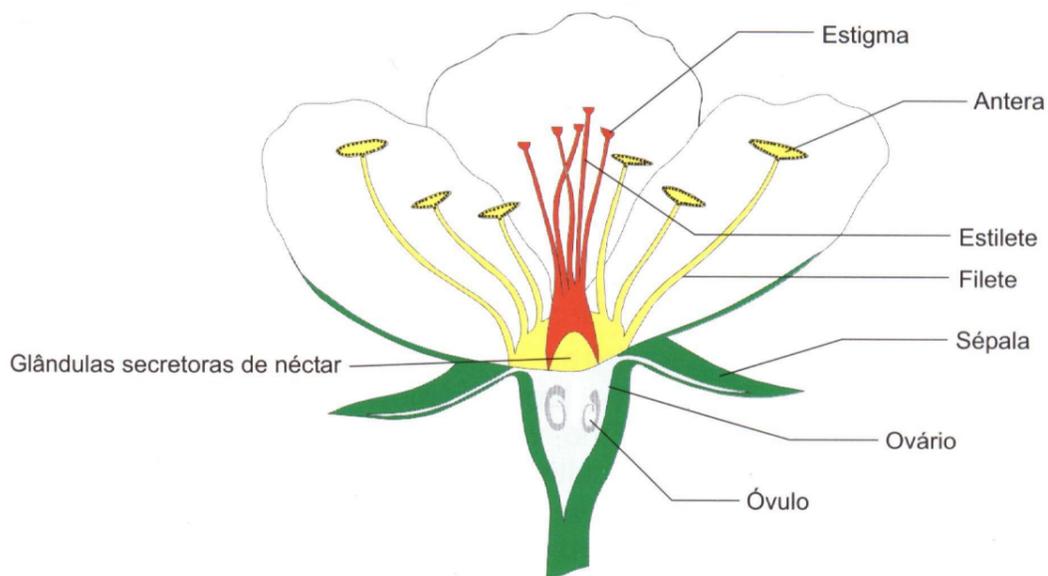


FIGURA 1: Diagrama de uma flor de macieira cortada longitudinalmente para mostrar os seus componentes (Macdaniels & Heinicke, 1929).

3.3 INCOMPATIBILIDADE NA MACIEIRA

A auto-incompatibilidade (*Self Incompatibility - SI*) é uma característica herdável, onde a flor rejeita seu próprio pólen (Hugard, 1978). O tipo mais comum é a incompatibilidade gametofítica SI, presente na família Rosaceae, na qual a macieira (*Malus X. domestica*) se encontra classificada botanicamente (Cortal et al., 1999). Neste sistema, o tubo polínico expressa um dos alelos *S*, quando em contato com o pistilo. Ao expressar um alelo idêntico a um dos alelos do pistilo, o desenvolvimento do tubo polínico é paralisado, ocasionando a não fecundação do óvulo (Batlle et al., 1995; Broothaerts et al., 1995). Modlibowska, em 1945, já havia percebido que quanto maior o grau de parentesco entre cultivares, maior era o grau de incompatibilidade. Além da incompatibilidade de natureza genética multialélica para o gene *S* (Spiegel-Roy e Alston, 1982), as relações de compatibilidade em macieira estão sujeitas a influências ambientais.

Segundo Richards (1997), o sistema de incompatibilidade teve pouca atenção no início, pois como a maior parte das espécies vegetais apresenta flores hermafroditas, considerava-se a autofertilização uma decorrência natural da constituição morfológica. De Nettancourt (1977) relata que a primeira publicação sobre o assunto foi a de Kolreuter, em 1764, descrevendo a auto-incompatibilidade – AI em *Verbascum phoeniceum*. Richards (1997) relata que Darwin, também chamado o pai dos estudos sistemáticos da reprodução em plantas, descreveu a ocorrência de auto-incompatibilidade em algumas espécies e, apesar de desconhecer os princípios da genética, verificou que a AI favorecia a alogamia. Com a redescoberta dos trabalhos de Mendel, no início

do século XX, houve um estímulo muito grande ao desenvolvimento de trabalhos com a AI e sua relação com a genética, sendo que na década de 20 surgiram os primeiros trabalhos sobre a herança multialélica da AI gametofítica (Richards, 1997). Então, o fenômeno passou a ser abordado de múltiplas formas. Atualmente grande importância está sendo dada ao estudo desse mecanismo, em virtude da relevância em estudos de polinização para composição varietal dos pomares e para fins de melhoramento genético de plantas.

A frutificação efetiva pode estar associada a fatores genéticos de incompatibilidade entre cruzamentos ou associada a fatores ambientais, como variações climáticas, com alternância de frio e calor após a polinização que afetam o crescimento e a penetração do tubo polínico, como já verificado anteriormente por William e Maier (1977) e Soltész et al., (1997). Petri e Pascoal (1981) e Schramm (1985) também verificaram que cruzamentos com baixa frutificação também estavam associados a fatores climáticos, como baixas temperaturas após a floração, carência em número de horas de frio no período de dormência ou deficiência de caráter fisiológico.

A macieira apresenta um sistema de auto-incompatibilidade gametofítica (*Gametophytic Self Incompatibility - GSI*) que é controlada por um único loco multi-alélico, denominado de loco-*S*. O crescimento do tubo polínico é inibido quando o alelo-*S* presente no pólen é similar a um dos dois alelos-*S* expressados no pistilo; estes por sua vez codificam várias glicoproteínas com atividade *S*-RNases. Inicialmente marcadores isoenzimáticos e glicoproteínas-*S* foram utilizados para os estudos de incompatibilidade genética. Essas técnicas permitiram a identificação de grupos de alelos-*S* (Batle et al., 1995;

Manganaris e Alston, 1987; Sassa et al., 1994). Entretanto, esses trabalhos eram bastante demorados e não forneceram resultados muito claros.

Janssen et al. (1995) desenvolveram um método de genotipagem de alelos-*S*, utilizando a amplificação via reação de polimerase em cadeia (PCR) seguida de digestão por enzima de restrição. Este método é baseado na utilização de iniciadores específicos de alelos-*S*, os quais foram previamente seqüenciados. As primeiras seqüências de nucleotídeos de cDNAs de alelos-*S* foram inicialmente seqüenciados por Brothhaerts et al. (1995) e apresentam a terminologia de *S1*, *S2*, *S3*, *S5*, *S7* e *S9*. Posteriormente, várias outras seqüências de alelos foram descobertas, tais como *S4*, *S24*, *S26*, *S27*, *Sd* (Kato et al., 1997; Sassa et al., 1996; Verdoodt et al. 1998, Kitahara et al., 2000, Matsumoto e Kitahara et al., 1999).

Recentemente, Brothhaerts (2003) propôs uma re-numeração dos alelos *S*, pois a nomenclatura (numeração) até então existente, contemplava o mesmo alelo-*S* à várias nomenclaturas. Van Nerum et al. (2001) mostraram que o alelo *S22* (atribuído à cultivar Alkmene), o alelo *S23* (cv. Delbard Jubile) e o alelo *S25* (cv. Merlijn) são idênticos e também correspondem ao previamente identificado alelo *S27b* (Verdoodt et al. 1998). Nesse mesmo trabalho foi relatado que o alelo *S25* encontrado na cv. Telamon era correspondente ao alelo seqüenciado *S10*. O mesmo estudo também mostrou que o alelo "japonês" *Sg* (clonado por Matsumoto et al., 1999) correspondeu ao alelo *S20* de Boskovic e Tobutt (1999).

Os iniciadores específicos têm sido utilizados desde então, para discriminar fenótipos-*S* em cultivares de macieira, e designar o alelo-*S* presente como ferramenta para seleção de polinizadoras compatíveis. A partir de então,

genes do loco S presentes no pistilo têm sido clonados a partir de diversas cultivares.

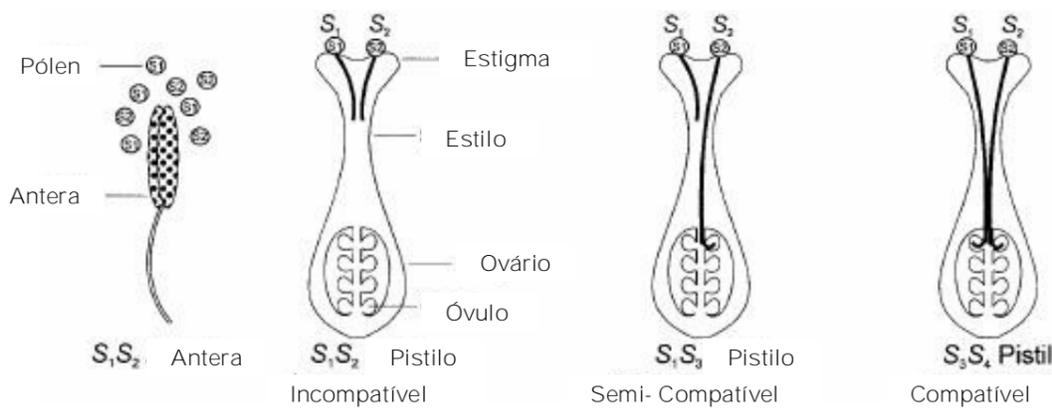


FIGURA 2 : Sistema de auto-incompatibilidade gametofítica em macieira (SILVA & GORING, 2001).

O fenótipo do pólen é determinado pelo seu próprio genoma haplóide. Assim, o crescimento do tubo polínico é inibido quando o alelo-S do pólen é igual a um dos alelos-S expresso no pistilo. Pode-se observar na Figura 2, que no pistilo da esquerda (A), o grão de pólen da antera S₁ ou S₂ é auto-incompatível com o pistilo S₁S₂. No pistilo do centro (B) apenas um dos alelos S do pólen (S₁ ou S₂) é igual ao do pistilo (S₁S₃). Neste caso, a metade dos grãos de pólen é compatível. Já, no pistilo da direita (C), nenhum dos alelos S do pólen (S₁ ou S₂) é igual aos do pistilo (S₃S₄): neste caso todos os grãos de pólen podem germinar e crescer.

O desenvolvimento de iniciadores que detectem novos alelos-S leva a novos entendimentos sobre o sistema de auto-incompatibilidade genética em macieira, além de servir como 'ferramenta' para confirmar o 'pedigree' de muitas cultivares. A análise molecular permite também estabelecer grupos de

cultivares cujos cruzamentos entre si são incompatíveis, compatíveis (ambos alelos *S* diferem) e semi-incompatível (um alelo-*S* é comum) (Janssens et al., 1995).

O conhecimento destes alelos-*S* permite também a seleção correta de parentais compatíveis em programas de melhoramento genético. Da mesma forma, este conhecimento garante uma ampla distribuição de alelos-*S* entre as cultivares a serem selecionadas nas progênies segregantes, mantendo-se um bom fluxo gênico entre as cultivares (Sakurai et al., 1997).

4. OBJETIVOS

4.1 GERAL

O presente trabalho objetivou caracterizar os alelos-S de 12 cultivares de macieira provenientes do programa de melhoramento genético da Epagri/Estação Experimental de Caçador.

4.2 ESPECÍFICOS

- A) Otimizar reações de PCR com os marcadores específicos de alelos-S;
- B) Identificar alelos-S envolvidos na incompatibilidade de 12 cultivares de macieira através de marcadores;
- C) Determinar a viabilidade da germinação do pólen *in vitro*;
- D) Validar a identificação de alelos-S em progênies de cruzamentos dirigidos;
- E) Confirmar a incompatibilidade via combinações de cruzamentos dirigidos e análise de frutificação efetiva nas suas progênies;

5. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi executado em dois locais. A parte laboratorial foi desenvolvida no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, localizado no município de Florianópolis/SC e a parte experimental, a campo, foi realizada na Epagri - Estação Experimental de Caçador/SC.

5.1 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas 12 cultivares comerciais de macieira e duas seleções obtidas pelo programa de melhoramento genético da Epagri/Estação Experimental de Caçador e Estação Experimental de São Joaquim, SC, além de algumas cultivares referência que já possuem os alelos-*S* determinados (Tabela 2).

Tabela 2 Lista de cultivares criadas e seleções obtidas pelo programa de melhoramento genético da Epagri-SC com seus respectivos genitores, e cultivares referências de alelos-S.

Cultivares e Seleções	Parentais
Primícia	D1R101T117 x D1R103T245
Princesa	NJ – 56 x Anna
Fred Hough	NJ – 76 x Coop – 14
Catarina	Fuji x PWR37T133
Baronesa	Princesa x Fuji
Lisgala	Mutação cv. Gala
Fuji Suprema	Mutação cv. Fuji
Condessa	Gala x M-41
Daiane	Gala x Princesa
Duquesa	Anna x D1R100T147
Imperatriz	Gala x Mollie's Delicious
Joaquina	NJ-76 x Coop – 14
Seleção M13-91	Mollie's Delicious x Princesa
Seleção M46-94	Fred Hough x Gala
	Gala, Fuji, Melrose, Coop 14, Grany Smith,
Cultivares referência	Mutsu, Golden Delicious, Delicious, Gloster, Alkmene, Idared, Braeburn, NJ 56, Eva.

5.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletadas folhas jovens (início do ciclo vegetativo – na primavera de 2004), das 12 cultivares comerciais e das duas seleções obtidas pelos programas de melhoramento genético das Estações Experimentais de Caçador

e de São Joaquim, Epagri, SC, e das cultivares referência de alelos-S (Tabela 2). As amostras foram coletadas e colocadas em sacos plásticos com sua respectiva identificação. Em seguida, foram acondicionadas em caixa térmica com gelo para o transporte da Estação Experimental de Caçador até o Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) da UFSC, onde foram armazenadas em freezer -20°C até a extração do DNA.

5.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi feita a partir de folhas jovens utilizando-se o protocolo modificado de Doyle e Doyle (1987). As folhas jovens (100 a 150 mg) foram colocadas em cadinhos de porcelana, onde foram imersas em nitrogênio líquido e, em seguida, com auxílio de um bastão de porcelana foram maceradas até formar um fino pó. Sobre o macerado foi acrescentado 700 µl de tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20mM EDTA; 100 mM Tris-HCL, pH 8,0; 1% PVP-40 e 2% β-mercaptoetanol) pré-aquecido a 60°C. Esta solução foi então transferida para microtubos de 2,0 ml, os quais foram incubados em banho-maria a 60°C durante 60 min.

Após a retirada dos tubos do banho-maria, esperou-se os mesmos atingirem temperatura ambiente. Após esta espera, em capela de exaustão, foi acrescentado a cada tubo (amostra) 700 µl de CIA (cloroformio-álcool isoamílico 24:1) para realizar a primeira extração. Em seguida, os tubos foram invertidos por 5 min. Após este procedimento, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi retirado e transferido para um

novo tubo de 1,5 ml, acrescentando-se 50 µl de uma solução de 10% CTAB, 1,4 M NaCl, invertendo-se os tubos novamente por 5 min. O processo de extração com CIA foi repetido três vezes. O sobrenadante final foi transferido para um tubo novo, adicionado-se 400 µl de etanol absoluto frio (-20°C) e mantendo-o por 30 min ou mais à temperatura de -20°C. Os tubos foram então centrifugados a 10.000 rpm por 10 min (para a formação do *pellet*).

Após a formação do '*pellet*', o sobrenadante foi descartado e o '*pellet*' lavado duas vezes com 1 ml da solução de etanol 76% e 10 mM de acetato de amônio por 10 min e uma vez com 1ml de etanol absoluto frio. Em seguida, o *pellet* foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 70 µl de tampão TE contendo 10 µg/ml de RNase. Após esta etapa, o mesmo foi incubado a temperatura ambiente por 12 horas, para a digestão do RNA.

A quantificação de DNA foi feita em gel de agarose (0,8%), corado com brometo de etídio (0,02%), tendo como padrão de λ DNA as concentrações de 20, 50, 100 e 200 ng/µl. As amostras foram carregadas com 3 µl de uma solução estoque de tampão [20 ml de TE, pH 8,0; 8 g de sacarose; 50 mg de azul de bromofenol; 400 µl de brometo de etídio (1mg/ml) e 1 µl de água mili-Q autoclavada]. A determinação da concentração do DNA extraído foi feita por comparação com os padrões utilizados. O DNA ficou armazenado a -20°C até o uso.

5.4 REAÇÃO COM MARCADORES ALELOS S

A reação padrão de PCR (reação de polimerase em cadeia) foi ajustada para um volume final de 15 µl, incluindo 1 X de tampão padrão (*Invitrogen*), 1,75 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 1 µM de cada iniciador, 0.6 U de *Taq polimerase* e 100 ng de DNA genômico por reação. Foram testados 16 iniciadores disponíveis no GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) oriundos do sequenciamento de cDNA de diversas cultivares (Tabela 3). As condições de amplificação foram: 3 min à 94°C, seguidos de 30 ciclos de 1 min à 94°C (desnaturação); 1 min à 60°C (a temperatura de anelamento padrão pode ser alterada, dependendo do par de iniciadores) (Tabela 3) e 1 min à 72°C (extensão da *Taq polimerase* e incorporação dos nucleotídeos, sendo que, para os iniciadores *S6* e *S20* o tempo de extensão foi ajustado para 45 s). Após os 30 ciclos, a reação foi submetida ao resfriamento a 4°C até ser retirada do termociclador. Para discriminação dos alelos *S4*, *S16* e *S22*, parte dos produtos amplificados na PCR (10 µl) foi digerida pela enzima de restrição *TaqI* (1 h, 65°C). Similarmente, para a discriminação do *S20*, parte dos produtos amplificados na PCR (10 µl) foi digerida pela enzima de restrição *Nar I* (durante a noite, 37°C). Para todos os iniciadores desafiados, foram utilizados controles positivos (cultivares referência que possuem o respectivo alelo-S) e controles negativos (cultivares que não possuíam o respectivo alelo-S do iniciador) que se encontram na Tabela 4.

Para visualização e separação dos fragmentos amplificados foi utilizado gel de agarose (2%), contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo em TBE 1X (100 mM Tris/100 mM ácido bórico/2 mM de EDTA pH 8,0. Foi utilizado como

marcador uma solução contendo fragmentos de tamanho conhecido (*ladder*) de 50 pb (Invitrogen), e as corridas eletroforéticas foram a 70 V pelo período de 3 horas.

Tabela 3 Seqüência de nucleotídeos e condições de PCR para iniciadores específicos alelo-S.

Alelo S	Iniciadores	Seqüências (5' à 3')	Temperatura de Anelamento	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
	FTC168	ATATTGTAAGGCACCGCCATATCA T		
S1	FTC169	GGTTCTGTATTGGGGAAGACGCAC AA	60	530
	OWB122	GTTCAAACGTGACTTATGCG		
S2	OWB123	GGTTTGGTTCCTTACCATGG	60	449
	FTC177	CAAACGATAACAAATCTTAC		
S3	FTC226	TATATGGAAATCACCATTCG	57	500
	FCT5	TCCCACAATACAGAACGAGA		
S4	OWB249	CAATCTATGAAATGTGCTCTG	58, <i>TaqI</i>	274
	FTC10	CAAACATGGCACCTGTGGGTCTCC		
S5	FTC11	TAATAATGGATATCATTGGTAGG	60	346
	FTC141	ATCAGCCGGCTGTCTGCCACTC		
S6	FTC142	AGCCGTGCTCTTAATACTGAATAC	60, E 45 sec	850
	FTC143	ACTCGAATGGACATGACCCAGT		
S7	FTC144	TGTCGTTCAATTATTGTGGGATGTC	60	302
	OWB154	CAGCCGGCTGTCTGCCACTT		
S9	OWB155	CGGTTGATCGAGTACGTTG	62	343
	FTC12	CCAAACGTACTCAATCGAAG		
S10	FTC228	ATGTCGTCCCGTGCCTGAATC	60	209
	FTC5	TCCCACAATACAGAACGAGA		
S16	OWB249	CAATCTATGAAATGTGCTCTG	60, <i>TaqI</i>	274

	FTC229	TCTGGGAAAGAGAGTGGCTC		
S19	FTC230	TTTATGAACTTCGTTAAGTCTC	60	304
	FTC141	ATCAGCCGGCTGTCTGCCACTC		
S20	FTC142	AGCCGTGCTCTTAATACTGAATAC	60,E 45 sec, <i>Nar I</i>	920
	FTC5	TCCCACAATACAGAACGAGA		
S22	OWB249	CAATCTATGAAATGTGCTCTG	60, <i>TaqI</i>	274
	FTC222	CAATCGAACCAATCATTGGT		
S23	FTC224	GGTGTCATATTGTTGGTACTAATG	60	237
	FTC231	AAATATTGCAACGCACAGCA		
S24	FTC232	TTGAGAGGATTCAGAGATG	60	580
	FCT14	GAAGATGCCATACGCAATGG		
S26	FTC9	TTAATACCGAATATTGGCG	55	194

* E 45 = Temperatura de extensão 45 °C.

Os géis foram visualizados em transluminador de luz UV e fotografados para registro e análise em fotodocumentadora (Single UV M-20,UVP®), com auxílio do programa DigDoct. A análise foi realizada discriminando as bandas, baseada no número de pares de base (Figura 3), sendo utilizado como padrão em outras cultivares referência (Tabela 3).

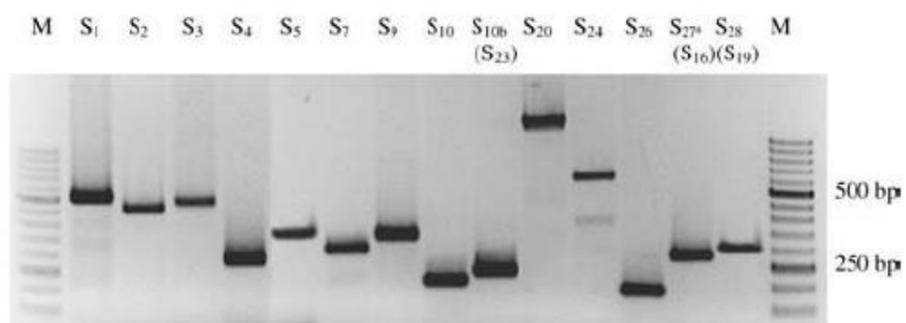


FIGURA 3 Separação de produtos amplificados para cada alelos-S em macieira. Cada linha mostra o peso molecular de alelo único específico. M= Ladder DNA 50 pb (150-750 pb) (Broothaerts, 2003).

Tabela 4 Código no GeneBank, origem do cDNA clonado e cultivares referência para alelos-S em macieira.

Alelo	Nº GeneBank	Origem do cDNA clonado	Cultivar referência	Referências
S1	D50837	Fuji ¹	Fuji (S_7S_9)	¹ Sassa et al. 1996;
S2	U12199	Golden Delicious ²	Golden Delicious (S_2S_3)	² Broothaerts et al. 1995;
S3	U12200	Golden Delicious ²	Golden Delicious (S_2S_3)	² Broothaerts et al. 1995;
S4	AF327223	Gravenstein ³	Gloster (S_4S_{19})	³ Van Nerum et al. 2001;
S5	U19791	Queen's Cox ⁴	Gala (S_2S_5)	⁴ Janssens et al. 1995;
S7	AB032246	Akane ⁵ Idared ⁴	Idared (S_3S_7)	⁴ Janssens et al. 1995; ⁵ Kitahara et al. 2000;
S9	D50836	Queen's Cox ⁴ Fuji ¹	Fuji (S_7S_9)	⁴ Janssens et al. 1995; ¹ Sassa et al. 1996
S10	AB052683	Discovery ⁶ , Maypole ⁶ , McIntosh ⁷ , Prima ³ , Telamon ³	McIntosh ($S_{10}S_{(25)}$)	⁶ Richman et al. 1997; ⁷ Kitahara e Matsumoto 2002; ³ Van Nerum et al. 2001;
S16	AF016919	Baskatong ⁸	Baskatong ($S_{16}S_{26}$),	⁸ Verdoodt et al. 1998;
S22	AF327222	Alkmene ³ , Delbard Jubil ³ , Merlijn ³	Alkmene (S_5S_{22})	³ Van Nerum et al. 2001;
S19	AB035273	Delicious ⁹ Starking Delicious ¹⁰	Delicious (S_9S_{19})	⁹ Matsumoto et al. 2000; ¹⁰ Okuno 2000;
S20	AB019184	Indo ¹¹	Mutsu ($S_2S_3S_{20}$)	¹¹ Matsumoto et al. 1999;
S23	AF239809	Granny Smith ¹²	Granny Smith (S_3S_{23})	¹² Schneider et al. 2001
S24	AF016920	Akane ⁵ Braeburn ⁸	Braeburn (S_9S_{24})	⁵ Kitahara et al. 2000; ⁸ Verdoodt et al. 1998;
S26	AF016918	Baskatong ⁸	Baskatong ($S_{16}S_{26}$)	⁸ Verdoodt et al. 1998;

¹ Os números sobrescritos nas cultivares de origem do 'cDNA clonado', correspondem aos seus respectivos autores (Referência).

5.5 SEGREGAÇÃO DOS ALELOS-S

Para o estudo da segregação dos alelos-S, foram utilizadas 30 progênies (*seedlings*) do cruzamento realizado entre as cultivares Sel. M46-94 (*S19S5*) X Sel. M13-91 (*S5 S10*), que apresentam semi-compatibilidade (grau de compatibilidade de 50%) e 36 progênies (*seedlings*) do cruzamento realizado entre as cultivares Imperatriz (*S3S5*) X Catarina (*S1S19*), que apresentam compatibilidade total (grau de compatibilidade de 100%), cruzamentos estes realizados em 2003 na Epagri Estação Experimental de Caçador. As reações de PCR foram feitas com DNA tanto dos parentais quanto das progenies, de acordo com metodologia proposta anteriormente no item 5.4. A análise da proporção de segregação obtida com a esperada foi testada utilizando-se teste χ^2 (Beiguelman, 1991). Na progênie do primeiro cruzamento a proporção esperada é de 1 *S19S10* : 1 *S5S10*, enquanto na segunda progênie é de 1 *S3S1* : 1 *S5S1* : 1 *S3S19* : 1 *S5 S19*.

5.6 NÚMERO DE ANTERAS E GRÃOS DE PÓLEN

Seguindo metodologia proposta por KEARNS & INOUYE (1993), foram coletadas quatro flores de cada cultivar e contado o número de estames por flor. Em seguida, foram coletadas cinco anteras de cada flor e estas foram armazenadas individualmente em tubos de eppendorf de 1,5 μ l contendo uma solução de ácido láctico. Posteriormente, os grãos de pólen de cada cultivar

foram colocados em uma lâmina e contados sob microscópio óptico, com aumento de 100x.

A quantidade de grãos de pólen em cada antera (N) foi estimada multiplicando-se a média do número de grãos de pólen da amostra (X) pelo volume do ácido láctico a qual foi realizada a diluição (1000 µl) e dividindo este valor pelo produto entre o volume de ácido láctico da amostra (1,5 µl) e o número de anteras de cada tubo (5). Esse procedimento pode ser resumido pela seguinte fórmula: $N = X.133,33$. Para estimar o número de grãos de pólen produzido por flor, foi efetuada a multiplicação da estimativa média de grãos de pólen por antera pelo número de anteras por flor. Os dados foram submetidos a análise de variância e a comparação entre médias através do teste de Duncan a 5% (Beiguelman, 2002).

5.7 GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN *in vitro*

Para a determinação da taxa de germinação de pólen foram utilizadas as cultivares Baronesa, Condessa, Daiane, Duquesa, Eva, Fred Hough, Gala, Imperatriz, Princesa e Suprema. Flores foram coletadas em estágio de balão rosado (fase de antese) e as anteras foram retiradas utilizando-se um estilete e colocadas para secar em estufa, sob temperatura $20 \pm 5^\circ\text{C}$. até a completa deiscência (liberação do pólen). O pólen seco foi então armazenado em tubos de vidros (10 ml), vedados com algodão e armazenado em dessecador mantido a 4°C até sua utilização, aproximadamente duas semanas. Para verificar a viabilidade dos grãos de pólen antes da realização dos cruzamentos a campo,

estes foram submetidos a teste de germinação *in vitro*, em meio de cultura com 10 g.L⁻¹ de ágar suplementados com 100 g.L⁻¹ de sacarose (Merk) e 0,04 g.L⁻¹ de ácido bórico (Galletta, 1983; Nunes, 2001) em placas de Petri. O pólen foi aspergido sobre o meio de cultura com auxílio de pincel de pele de camelo, para se obter uniformidade de distribuição na superfície do meio de cultura. As placas foram mantidas em incubadora (B.O.D) a 25°C. Após duas horas da inoculação, foi procedido a leitura da germinação com auxílio de microscópio binocular, considerando-se germinados os grãos de pólen cujo tubo polínico tinha comprimento de, pelo menos, o diâmetro do próprio grão de pólen. Para efeito de contagem, foram considerados cinco campos de leitura, totalizando ao menos 250 grãos de pólen, ou 50 grãos de pólen por campo de leitura.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo composto das dez diferentes origens de pólen (tratamentos) e cinco repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e a comparação entre médias feita através do teste de Duncan a 5% ((Beiguelman, 2002).

5.8 DESENVOLVIMENTO DO TUBO POLÍNICO

Para o estudo do desenvolvimento do tubo polínico foi realizada a polinização dirigida entre cultivares que possuem a mesma época de floração, conforme Tabela 5.

Tabela 5: Cruzamentos para estudo do desenvolvimento do tubo polínico, realizados na Epagri/ Estação Experimental de Caçador, SC.

CRUZAMENTOS					
Produtora		Polinizadora	Produtora		Polinizadora
Princesa	X	Condessa	Fred Hough	X	Daiane
Duquesa	X	Condessa	Fred Hough	X	Baronesa
Condessa	X	Condessa	Daiane	X	Imperatriz
Condessa	X	Princesa	Daiane	X	Gala
Condessa	X	Duquesa	Daiane	X	Fred Hough
Imperatriz	X	Gala	Daiane	X	Baronesa
Imperatriz	X	Fred Hough	Daiane	X	Suprema
Imperatriz	X	Daiane	Baronesa	X	Imperatriz
Imperatriz	X	Baronesa	Baronesa	X	Gala
Imperatriz	X	Suprema	Baronesa	X	Fred Hough
Gala	X	Imperatriz	Baronesa	X	Daiane
Gala	X	Fred Hough	Baronesa	X	Suprema
Gala	X	Daiane	Suprema	X	Imperatriz
Gala	X	Baronesa	Suprema	X	Gala
Gala	X	Suprema	Suprema	X	Fred Hough
Fred Hough	X	Imperatriz	Suprema	X	Daiane
Fred Hough	X	Gala	Suprema	X	Baronesa
Fred Hough	X	Suprema			

As polinizações foram realizadas em três estiletes em cada uma das 10 flores emasculadas de cada cruzamento, com três repetições (30 flores por

cruzamento). A coleta das flores foi realizada em cinco períodos: 24, 48, 72, 96 e 120 horas após as polinizações (6 flores para cada período). Imediatamente após a coleta das flores, os estiletes foram fixados em fixativo Carnoy (3 partes de etanol 95%:1 parte de ácido acético glacial) e levados ao laboratório. Para visualização dos tubos polínicos foi utilizada a técnica de fluorescência (MARTIN, 1959), que consistiu em colocar os estiletes em placas de relógio com NaOH 8N em estufa a 40 °C por aproximadamente 15 min. Após, os estiletes foram lavados com água destilada por três vezes e mantidos em água até a sua transferência para uma lâmina contendo uma gota de solução de azul de anilina 0,1% em K₃PO₄ (0,1 M). As observações foram feitas em microscópio invertido Olympus IMT-2 com aparato de epifluorescência com filtros de 450 nm. Após observadas, as lâminas foram classificadas de acordo com a capacidade de germinação dos grãos de pólen e da capacidade de crescimento dos tubos polínicos, utilizando-se a classificação proposta por Carvalho (1989). As classes de avaliação encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 Classes para avaliação do comprimento do tubo polínico crescido no estilete de flores de macieira. CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.

Classes ¹	Crescimento do tubo polínico no estilete
1	Tubo polínico não ultrapassando o estigma
2	Tubo polínico entre o estigma e a metade do estilete
3	Tubo polínico entre a metade e 2/3 do estilete
4	Tubo polínico entre 2/3 do estilete e entrada do ovário

- 5 Tubo polínico penetrando no ovário
- 6 Tubo polínico penetrando no óvulo

(¹) Classificação proposta por Carvalho (1989).

5.9 FRUTIFICAÇÃO EFETIVA

Para o estudo da frutificação efetiva (*fruit-set*), foram realizados quatro cruzamentos (Tabela 7), no período de 21/09/05 a 21/10/05, na Estação Experimental de Caçador. Os parentais foram escolhidos de acordo com o grau de incompatibilidade alélica, encontrado pela análise molecular dos alelos-S feita no laboratório.

Tabela 7 : Cruzamentos para o estudo da frutificação efetiva (*fruit set*). Epagri/Estação Experimental de Caçador, SC, 2005.

Cruzamento	Grau de Incompatibilidade
Baronesa (S_3S_9) x Fred Hough (S_5S_{19})	0%
Baronesa (S_3S_9) X Imperatriz (S_3S_5)	50%
Fred Hough (S_5S_{19}) x Fred Hough (S_5S_{19})	100%
Imperatriz (S_3S_5) x Daiane (S_3S_5)	100%

Foram selecionadas nove plantas sadias em cada cruzamento e realizada a emasculação com o auxílio de uma tesoura nas flores em estágio de balão. Imediatamente após, as flores foram polinizadas passando-se levemente sobre o estigma o dedo indicador contendo o pólen. Em seguida, foi feito o ensacamento das flores com papel encerado para evitar possível contaminação com pólen de outras origens. Para a utilização de pólen de cultivares diferentes foi realizada assepsia com álcool no dedo indicador, assim evitando uma possível contaminação. Foram polinizadas 250 flores em cada cruzamento. Quarenta dias após a polinização, determinou-se a percentagem “de pega” de frutos (frutificação efetiva) através da fórmula: frutificação efetiva = $(n^{\circ} \text{ de frutos} / n^{\circ} \text{ de flores polinizadas}) \times 100$ (PETRI e PASQUAL, 1981).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

O DNA extraído foi quantificado e todas as amostras mostraram concentração maior que 100 ng/ μ l (Figura 4), que é a concentração exigida para as reações com os iniciadores específicos de alelos S (Broothaerts, 2003).



Figura 4 Quantificação de DNA feita em gel de agarose (0,8%), corado com brometo de etídio (0,02%), tendo como padrão as concentrações de 20, 50, 100 e 200 ng/ μ l de λ DNA. Números de 1 a 14 correspondem às cultivares de macieira Primícia, Princesa, Fred Hough, Catarina, Baronesa, Lisgala, Fuji Suprema, Condessa, Daiane, Duquesa, Imperatriz, Joaquina, M46-94 e M13-91, respectivamente.

6.2 REAÇÃO COM MARCADORES ESPECÍFICOS DE ALELO-S

Dos 16 iniciadores testados, 10 amplificaram em temperatura de 60 °C, revelando produtos de 209 a 530 pares de bases (pb). Os iniciadores 'FCT5, OWB249', 'FTC5, OWB249', 'FTC141, FTC142' e 'FTC5, OWB249' foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *Taq I* e *Nar I* e apresentaram respectivamente 274, 274, 920 e 920 pares de base. Os alelos-S correspondentes a esses quatro iniciadores não foram amplificados nas cultivares objeto do presente estudo, mas apenas nas respectivas cultivares referência. Com base na similaridade com os produtos amplificados nas cultivares referências foram identificados 26 alelos-S em doze cultivares de macieira e duas seleções do programa de melhoramento genético da Epagri/Estação Experimental de Caçador (Figura 5, Tabela 8).

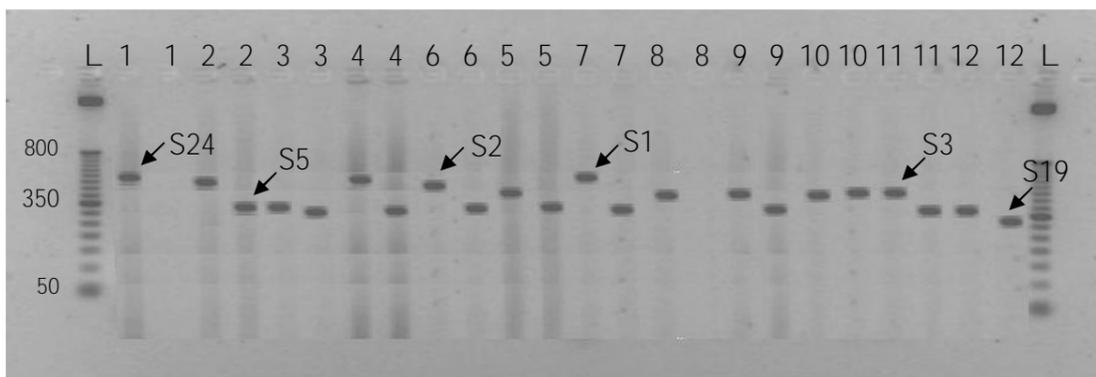


Figura 5 Separação de produtos amplificados (alelo-S). L= marcador de 50 pb (*Invitrogen*). Números em cada linha correspondem às cultivares: 1: Primícia, 2: Princesa, 3: Fred Hough, 4: Catarina, 5: Baronesa, 6: Lisgala, 7: Fuji Suprema, 8: Condessa, 9: Daiane, 10: Duquesa, 11: Imperatriz e 12: Joaquina.

Tabela 8 Cultivares e seleções estudadas com seus respectivos alelos-S encontrados. CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.

Cultivares e Seleções	Alelo-S encontrado	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
Primícia	<i>S24</i>	580
	n.a.	n.a.
Princesa	<i>S3</i>	500
	<i>S5</i>	346
Fred Hough	<i>S5</i>	346
	<i>S19</i>	304
Catarina	<i>S1</i>	530
	<i>S19</i>	304
Baronesa	<i>S3</i>	500
	<i>S9</i>	343
Lisgala	<i>S2</i>	449
	<i>S5</i>	346
Fuji Suprema	<i>S1</i>	530
	<i>S9</i>	343
Condessa	<i>S2</i>	449
	n.a.	n.a.
Daiane	<i>S3</i>	500
	<i>S5</i>	346
Duquesa	<i>S2</i>	449
	<i>S3</i>	500
Imperatriz	<i>S3</i>	500
	<i>S5</i>	346
Joaquina	<i>S5</i>	346
	<i>S19</i>	304
M46-94	<i>S5</i>	346
	<i>S19</i>	304
M13-91	<i>S5</i>	346
	<i>S10</i>	209

n.a. = não amplificado

As cultivares Daiane, Imperatriz e Princesa amplificaram os iniciadores 'FTC177, FTC226' e 'FTC10, FTC11' correspondente aos alelos *S3* e *S5*, conforme observado anteriormente nas cultivares referência Golden Delicious (Broothaerts et al., 1995) e Gala (Janssens et al., 1995) (Tabela 4).

Segundo a genealogia da cultivar Daiane, o alelo *S5* seria herdado da cultivar Gala (*S2S5*) (Janssens et al., 1995) e o alelo *S3* da cultivar Princesa (*S3S5*), pois a mesma é oriunda do cruzamento Gala x Princesa (Figura 6).

As reações de PCR com DNA das cultivares Fred Hough e Joaquina, que são irmãos-inteiros, amplificaram os pares de iniciadores 'FTC10 e FTC11' e 'FTC229 e FTC230' revelando, portanto, os dois alelos de incompatibilidade *S5* e *S19* em ambas cultivares (Tabela 8). Com o DNA de 'Lisgala' foram amplificados os iniciadores 'OWB122, OWB123' e 'FTC10, FTC11' resultando em produtos com 449 e 346 pb, respectivamente, sendo estes, referentes aos alelos *S2* e *S5*. Tais produtos já haviam sido observados na cultivar 'Gala'. Este resultado era esperado, pois a cultivar Lisgala é originada de uma mutação natural da cultivar Gala.

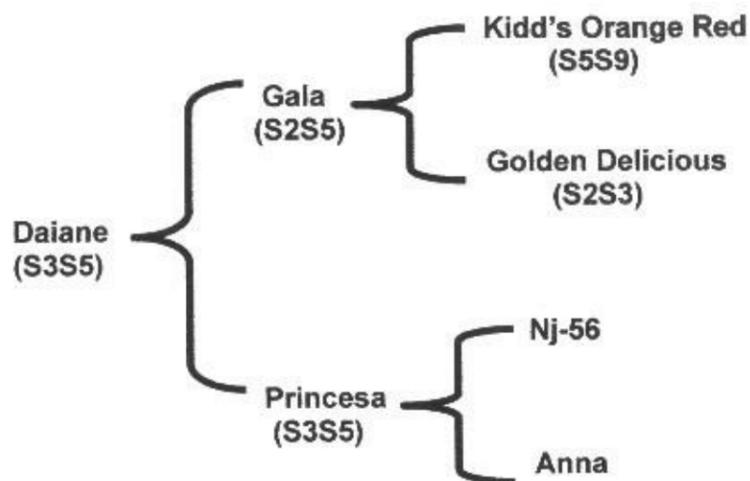


FIGURA 6 Representação genealógica da cultivar de macieira Daiane, com os alelos-S dos pais (Denardi e Camilo, 1998a).

Na cultivar 'Suprema' foram amplificados os produtos do par de iniciadores 'FTC168, FTC169' de aproximadamente 530 pb, e do par de

iniciador 'OWB154, OWB155' com 343 pb, referente aos alelos *S1* e *S9*, os mesmos encontrados anteriormente na cultivar Fuji (Sassa et al., 1994), a qual deu origem a esta cultivar também por mutação natural.

Na cultivar Catarina, os iniciadores amplificados foram 'FTC168, FTC169' e 'FTC229, FTC230' com aproximadamente 530 pb e 304 pb, respectivamente, exatamente o tamanho dos produtos esperados para este dois alelos. O alelo *S1* foi herdado da 'Fuji' (*S1S9*), um dos seus genótipos parentais. O alelo *S19* foi herdado provavelmente da seleção PWR37T133.

Os alelos *S3* e *S9* foram amplificados na 'Baronesa', correspondentes aos iniciadores 'FTC177, FTC226' e 'OWB154, OWB155'. As presenças dos alelos *S3* e *S9* nesta cultivar é resultado da herança das cultivares Princesa (*S3S5*) e Fuji (*S1S9*), respectivamente, uma vez que a cv. Baronesa é resultante do cruzamento entre ambas (Figura 7).

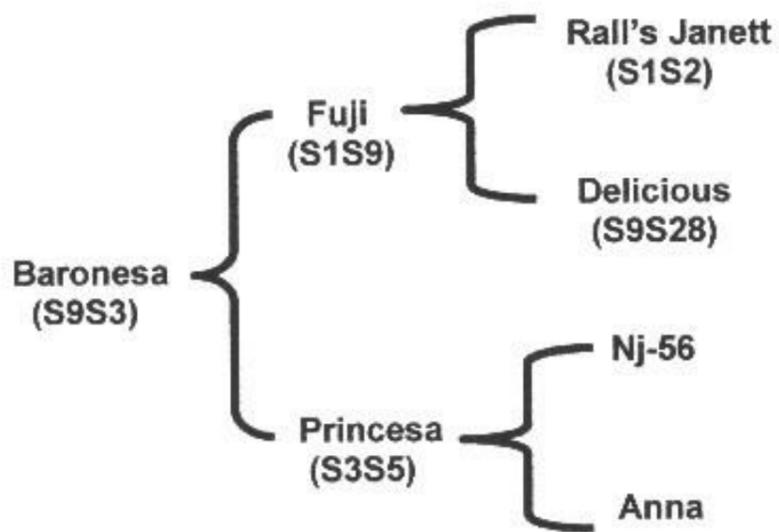


Figura 7 Representação genealógica da cultivar de macieira Baronesa, com os alelos S dos parentais (Denardi e Camilo, 1997).

Os produtos dos iniciadores 'OWB122, OWB123' e 'FTC177, FTC226', referente aos alelos *S2* e *S3*, foram verificados na cultivar 'Duquesa'.

Com o DNA da seleção M46-94 foram amplificados os produtos dos iniciadores 'FTC10, FTC11' e 'FTC229, FTC230', referente aos alelos *S5* e *S19*. Os alelos *S5* e *S19* dessa seleção provavelmente foram herdados das cultivares Gala (*S2S5*) e Fred Hough (*S5S19*), respectivamente.

A seleção M13-91 exibiu os alelos *S5* e *S10*, sendo que desses o alelo *S5* provavelmente foi herdado da cultivar parental Princesa que apresentou amplificação para os alelos *S3* e *S5*. O alelo *S10*, é provavelmente oriundo do parental Mollie's Delicious.

Foi identificado nas cultivares Primícia e Condessa apenas um dos alelos de incompatibilidade, sendo que para a 'Primícia' foi amplificado o produto do iniciador correspondente ao alelo *S24* e na cultivar 'Condessa' ao alelo *S2*, sendo que nesta última, o alelo *S2* provavelmente foi herdado da cultivar parental Gala (*S2S5*). O segundo alelo de cada uma dessas duas cultivares permanece não identificado.

A partir destes resultados pode-se inferir que a cultivar Daiane, Imperatriz e Princesa, por possuírem os mesmos alelos (*S3* e *S5*), devem ser totalmente incompatíveis entre si, o que acontece também entre as cultivares Fred Hough e Joaquina, que possuem os alelos *S5* e *S19* para a incompatibilidade gametofítica. Por outro lado, a composição alélica da 'Lisgala' exhibe apenas um alelo em comum com as cultivares 'Princesa', 'Fred Hough', 'Catarina', 'Daiane', 'Duquesa', 'Imperatriz' e 'Joaquina', indicando compatibilidade parcial com estas.

Os alelos da 'Suprema', por não mostrarem similaridade total (dois alelos em comum) com todas as cultivares estudadas, não deve apresentar problemas de incompatibilidade gametofítica com estas. A cultivar 'Catarina', descendente direta da 'Fuji', e por isso herdou somente um dos alelos desta, deve ser parcialmente compatível, tanto com 'Fuji', quanto com 'Fuji Suprema'. Por fim, a cultivar 'Catarina', a exemplo da 'Fuji Suprema', também pode ser compatível com todas as cultivares por possuir pelo menos um dos alelos diferentes aos daquelas.

Nas cultivares ou seleções estudadas, a frequência dos alelos *S3* e *S5* foi bastante elevada (Figura 8), sendo que o alelo *S3* foi detectado em cinco cultivares ou seleções, representando 19,23% de todos os alelos encontrados, por sua vez, a frequência do alelo *S5* foi ainda maior, pois está presente em oito cultivares ou seleções avaliadas, representando 30,7% dos alelos encontrados no estudo.

Esta alta frequência destes dois alelos-*S* pode estar relacionada com o modelo atual de melhoramento genético que vem sendo empregado para a cultura da macieira em todo o mundo, pois um grande número de cultivares comerciais foi derivado principalmente de cruzamentos nos quais um dos genitores foi "Golden Delicious" e/ou "Cox's Orange Pippin" (Noiton & Shelbourne, 1992). Estas cultivares elites possuem, respectivamente, os genótipos *S2S3* e *S5S9*, cujos alelos foram citados por Broothaerts et al., (2004) como os alelo-*S* de maior frequência em 150 cultivares mais utilizadas em programas de melhoramento genético em todo o mundo.

No presente trabalho não foram detectados os alelos *S4*, *S6*, *S16*, *S22*, *S23* e *S26*, que foram classificados por Broothaerts et al., (2004), como alelos-

S extremamente raros. Contudo, dois alelos-S ainda não foram identificados, um na cultivar Primicia e outro na Condessa. Assim, não se pode descartar a hipótese que um ou dois desses poderiam estar presentes neste conjunto de cultivares estudadas.

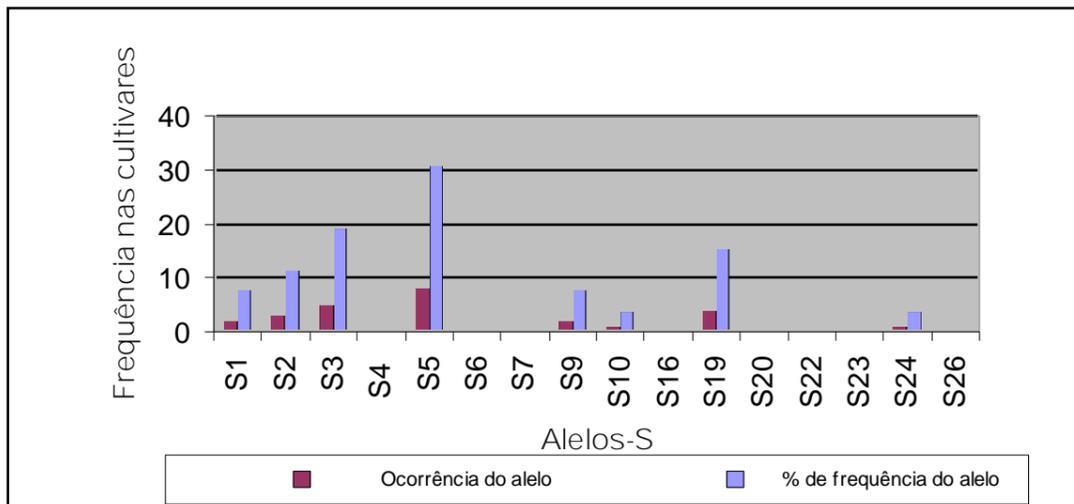


Figura 8 Frequência dos alelos-S nas cultivares e seleções objeto deste estudo. CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.

6.3 SEGREGAÇÃO DOS ALELOS-S

O estudo da segregação dos alelos-S foi realizado com 30 descendentes ('seedlings') de um cruzamento semi-compatível: [Seleção M46-94 (*S19 S5*) X Seleção M13-91(*S5 S10*)] e com 36 descendentes ('seedlings') de um cruzamento 100% compatível: [Imperatriz (*S3S5*) X Catarina (*S1 S19*)].

No cruzamento semi-compatível, "Seleção M46-94 (*S19 S5*) X Seleção M13-91(*S5 S10*)", o padrão de bandas reveladas nas progênies indicou a

segregação dos genótipos *S5S10* e *S10S19* na proporção 1:1 ($\chi^2 = 0,133$) (Tabela 9). Tais genótipos foram esperados em razão do cruzamento efetuado, que foi entre duas seleções semi-compatíveis.

No cruzamento entre as cultivares Imperatriz (*S3S5*) X Catarina (*S1S19*), a segregação observada dos genótipos *S1S3*, *S1S5*, *S19S5* e *S3S19* foi de 1:1:1:1, respectivamente ($\chi^2 = 0,44$). Assim, a segregação dos alelos-S ocorreu na proporção esperada (Tabela 10).

Estes resultados estão de acordo com o que foi verificado anteriormente por Manganaris e Alston (1987) e Batlle et al. (1995), que obtiveram esta proporção de segregação nos cruzamentos compatíveis que efetuaram com outras cultivares de macieira.

Tabela 9 Segregação genotípica na progênie do cruzamento entre as seleções M46-94 e M13-91. CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.

Cruzamento / Alelos-S	'Seedlings' (N)	Genótipo da Progênie		²	Probabilidade
		<i>S5S10</i>	<i>S10S19</i>		
M-46/94 x M-13/91 (<i>S19S5</i>) x <i>S5S10</i>)	30 (100)	16 (53,33)	14 (46,66)	0,133	0,70 < P < 0,80

²: Qui-quadrado com um grau de liberdade

Tabela 10 Segregação para alelos-S no cruzamento entre as cultivares Imperatriz X Catarina. CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.

Cruzamento	'Seedlings' (Nº)	Genótipo da progênie				²	Probabilidade
		S1 S3	S19 S5	S1 S5	S19 S3		
Imperatriz x Catarina (S3S5) x (S1S19)	36 (100)	10 (27,77)	8 (22,22)	10 (27,77)	8 (22,22)	0,44	0,90<P<0,95

²: Qui-quadrado com três graus de liberdade

6.4 NÚMERO DE ANTERAS POR FLOR E NÚMERO DE GRÃOS DE PÓLEN POR ANTERA

O número de anteras por flor variou de 16,3 a 20 nas diferentes cultivares avaliadas (Tabela 11). As cultivares Baronesa, Fuji Suprema e Imperatriz revelaram o maior número de anteras por flor, média de 20 anteras/flor. A cultivar Condessa revelou um número médio de anteras por flor menor (16,3) . É importante salientar que nem sempre o maior número de anteras é indicativo de uma maior quantidade de grãos de pólen por flor, e que a quantidade de anteras formadas em uma flor pode variar de um ano para o outro, pois as condições ambientais tem grande influência na formação desse órgão (Petri, 1976).

Tabela 11 Número de anteras por flor em diferentes cultivares de macieira.
CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.

CULTIVAR	Mínimo	Máximo	Média*		
Baronesa	20	20	20,0	a	
Fuji Suprema	20	20	20,0	a	
Imperatriz	20	20	20,0	a	
Lisgala	19	20	19,8	a	b
Joaquina	19	20	19,3	a	b
Princesa	17	20	19,0	a	b
Fred Hough	18	20	19,0	a	b
Daiane	19	19	19,0	a	b
Catarina	18	20	19,0	a	b
Primícia	16	20	18,8	a	b
Duquesa	17	19	18,0		b
Condessa	14	20	16,3		c
CV = 6,02					

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Quanto ao número de grãos de pólen por antera, destacou-se as cultivares Imperatriz e Lisgala, com média de 5.185 e 5.166 grãos de pólen por antera, respectivamente (Tabela 12), totalizando 103.700 e 101.770 grãos de pólen por flor, respectivamente. Esses valores estão bem acima dos encontrados por PASQUAL & PETRI (1980), os quais encontraram números que variaram de 696 a 4.318, para as cultivares utilizadas naquela época no Brasil. As maiores quantidades de grãos pólen por antera encontradas nas

cultivares desenvolvidas no Sul do Brasil (Tabela 12), podem estar relacionados à melhor adaptação climática dessas cultivares .

Tabela 12 Número médio de grãos de pólen por antera, número médio de anteras por flor e número de grãos de pólen por flor. CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.

Cultivar	Grãos de pólen por antera	Anteras por flor	Grãos de pólen por flor
Imperatriz	5.185 a	20,0	103.700
Lisgala	5.166 a	19,7	101.770
F Suprema	4.999 a	20,0	99.980
Princesa	4.934 a	19,0	93.746
Daiane	4.884 a b	19,0	92.796
Catarina	4.624 b c	19,0	87.856
Joaquina	4.422 cd	19,2	84.902
Primícia	4.255 de	18,7	79.568
Baronesa	4.130 de	20,0	82.600
Fred Hough	3.980 e	19,0	75.624
Condessa	3.44 f	16,2	55.924
Duquesa	2.981 g	18,0	53.658

CV= 4,63

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, segundo o teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

6.5 GERMINAÇÃO DE PÓLEN *IN VITRO*

Os resultados obtidos mostraram que todas as cultivares estudadas produzem pólen com boa capacidade germinativa (Figura 9). A taxa média de germinação foi maior que 60% em todas as cultivares (Tabela 13), situando-se bem acima dos 30% citados por diversos autores como suficiente para assegurar boa fertilização e boa frutificação efetiva (Keulemans et al., 1994; Macdaniels e Heinicke, 1929; Knowlton, 1935).

Por outro lado, a análise de variância mostrou diferenças significativas na taxa de germinação do pólen entre as cultivares estudadas. O teste Duncan a 5% permitiu separar as cultivares em dois grupos distintos. Os grãos de pólen da 'Princesa' e da 'Condessa', com 73,2% e 72,0% de germinação, respectivamente, germinaram em taxas significativamente maiores que o pólen das demais, cuja germinação variou de 64,8% na 'Eva' a 59,6% na Suprema (Tabela 13).

As cultivares Princesa e Duquesa são utilizadas como polinizadoras das cultivares comerciais que apresentam baixa necessidade de frio no Sul do Brasil como a cultivar 'Condessa e a Eva'. As cultivares Baronesa e Fred Hough são usadas como polinizadoras da cv. Imperatriz para climas de invernos amenos, mediante quebra de dormência artificial. Para climas mais frios, no Meio Oeste catarinense, estas duas cultivares vem apresentando boa eficiência como polinizadoras das cultivares Gala e Fuji Suprema (Denardi e Camilo, 1997). A cv. Baronesa é usada como polinizadora da cv. Fuji e a cv. Fred Hough, juntamente com a Imperatriz, para a cv. Gala (Tabela 14). Neste estudo, todas elas mostraram boa capacidade germinativa do pólen, variando

de 59,6% na 'Fuji Suprema' a 73,2% na 'Princesa', demonstrando bom potencial como polinizadoras.

Neste estudo foi avaliado a capacidade germinativa de grãos de pólen, apenas das cultivares utilizadas como polinizadoras, segundo recomendações da Epagri (Tabela 14).

Tabela 13 Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de 9 cultivares de macieira desenvolvidas no Sul do Brasil. CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.

Cultivar	Percentagem de germinação
Princesa	73,2 a
Condessa	72,0 a
Eva	64,8 b
Baronesa	64,0 b
Fred Hough	63,2 b
Imperatriz	61,2 b
Daiane	61,2 b
Duquesa	60,0 b
Gala	60,0 b
Suprema	59,6 b
C.V. = 8,77	

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Duncan (P 0,05).

Tabela 14 Distribuição das cultivares produtoras e respectivas polinizadoras para o Sul do Brasil. Epagri/EECD, Florianópolis, 2005.

Cultivar produtora	Cultivares polinizadoras
Condessa	Princesa e Duquesa
Eva	Princesa e Duquesa
Imperatriz	Baronesa e Fred Hough
Daiane	Sansa e Granny Smith
Gala	Fuji Suprema, Imperatriz e Fred Hough
Suprema	Gala, Baronesa e Fred Hough

Fonte: Epagri, 2005.

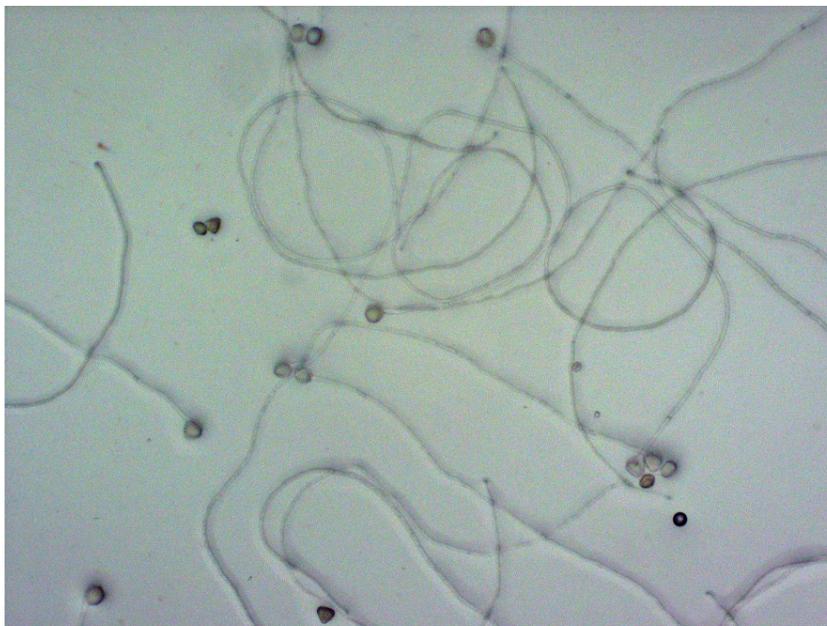


Figura 9 Germinação de grãos de pólen em meio de cultura, mostrando o desenvolvimento do tubo polínico. CCA/UFSC, Florianópolis, 2005.

6. 6 DESENVOLVIMENTO DO TUBO POLÍNICO

Mesmo havendo grande número de parentais em comum – elevado parentesco - entre as cultivares estudadas, com destaque para os parentais Gala e Fuji, na grande maioria das polinizações cruzadas, houve altas percentagens de tubos polínicos que cresceram até o ovário.

As combinações de parentais dos cinco primeiros cruzamentos, à exceção feita ao cruzamento 'Condessa x Princesa', no qual um dos alelos-S da primeira não é conhecido, apresentaram compatibilidade gametofítica total, pois os parentais em cada cruzamento eram portadores de diferentes alelos S (Tabela 8). Os dados da Tabela 15 confirmam isto. Os cinco cruzamentos referidos foram os que apresentaram as maiores percentagens de tubos polínicos que alcançaram o ovário (acima de 90%). Nos cruzamentos envolvendo parentais semi-compatíveis (Tabela 8), as percentagens de tubos polínicos que alcançaram o ovário situaram-se na faixa de 63,33% a 89,44%. Já nos últimos três cruzamentos mostrados na Tabela 15, envolvendo parentais com ambos os alelos S coincidentes, as percentagens de tubos polínicos no ovário ficaram significativamente menores que nos demais cruzamentos. Isto confirma a presença de incompatibilidade gametofítica total, tanto nos dois cruzamentos ('Imperatriz x Daiane' e a recíproca), quanto na auto-polinização da cv. Condessa.

No entanto, em alguns cruzamentos listados na Tabela 15, cujos parentais não apresentam coincidência de alelos S, como 'Imperatriz x 'Fuji Suprema' e a respectiva recíproca, e ainda 'Fred Hough x Baronesa' e recíproca, os valores de percentagens de tubos polínicos que atingiram o

ovário ficaram significativamente abaixo das percentagens dos primeiros quatro cruzamentos (100%, 100%, 98,8% e 97,2%), mesmo na presença de alta percentagens de pólen viável (Tabelas 13). É importante salientar que neste estudo, considerou-se apenas os grãos de pólen que efetivamente alcançaram o ovário. Provavelmente outros fatores podem estar interferindo na evolução dos tubos polínicos. Pode-se tomar como exemplo a combinação 'Daiane' x 'Fuji Suprema' (compatibilidade plena), que resultou na totalidade dos tubos polínicos no ovário; já na recíproca 'Fuji Suprema' x 'Daiane', a percentagem de tubos polínicos no ovário foi significativamente menor (85,6%). Estes resultados não devem ter relação com a capacidade de germinação do pólen, pois os percentuais não foram diferentes entre as duas cultivares (Tabela 13), mas podem ter relação com causas estruturais dos órgãos reprodutivos ou causa ainda desconhecida.

Tabela 15- Percentagem média de tubos polínicos que atingiram o ovário e o óvulo cento e vinte horas após a polinização a campo, de flores em estágio de balão rosado. CCA/UFSC, Florianópolis – SC, 2004.

Cv. Produtora	Cv. Polinizadora	Tubos polínicos no ovário (%)	
Daiane (S3 S5)	Fuji Suprema (S1 S9)	100,0	a
Baronesa (S3 S9)	Gala (S2 S5)	100,0	a
Fuji Suprema (S1 S9)	Gala (S2 S5)	98,8	a
Gala (S2 S5)	Fuji Suprema (S1 S9)	97,2	a b
Condessa (S2)	Princesa (S3 S5)	96,1	a b
Fred Hough (S5 S19)	Fuji Suprema (S1 S9)	91,1	b c
Fred Hough (S5 S19)	Daiane (S3 S5)	89,4	c d

Baronesa (S3 S9)	Daiane (S3 S5)	88,3	c d e
Imperatriz (S3 S5)	Fuji Suprema (S1 S9)	88,3	c d e
Imperatriz (S3 S5)	Baronesa (S3 S9)	87,2	c d e f
Fuji Suprema (S1 S9)	Fred Hough (S5 S19)	86,7	c d e f
Fuji Suprema (S1 S9)	Baronesa (S3 S9)	86,7	c d e f
Fred Hough (S5 S19)	Imperatriz (S3 S5)	86,1	c d e f
Gala (S2 S5)	Fred Hough (S5 S19)	86,1	c d e f
Daiane (S3 S5)	Baronesa (S3 S9)	86,1	c d e f
Fuji Suprema (S1 S9)	Daiane (S3 S5)	85,6	c d e f
Fred Hough (S5 S19)	Gala (S2 S5)	83,3	d e f g
Baronesa (S3 S9)	Imperatriz (S3 S5)	83,3	d e f g
Fred Hough (S5 S19)	Baronesa (S3 S9)	83,3	d e f g
Princesa (S3 S5)	Condessa (S2)	83,3	d e f g
Fuji Suprema (S1 S9)	Imperatriz (S3 S5)	80,6	f g
Daiane (S3 S5)	Gala (S2 S5)	77,2	g h
Baronesa (S3 S9)	Fuji Suprema (S1 S9)	73,9	h i j
Imperatriz (S3 S5)	Fred Hough (S5 S19)	70,0	i j
Gala (S2 S5)	Imperatriz (S3 S5)	69,4	i j
Baronesa (S3 S9)	Fred Hough (S5 S19)	69,4	i j
Imperatriz (S3 S5)	Gala (S2 S5)	67,8	i j
Daiane (S3 S5)	Fred Hough (S5 S19)	67,2	i j
Duquesa (S2 S3)	Condessa (S2)	65,0	j
Gala (S2 S5)	Daiane (S3 S5)	63,3	j
Condessa (S2)	Duquesa (S2 S3)	52,2	l
Imperatriz (S3 S5)	Daiane (S3 S5)	16,7	m

Condessa (S2)	Condessa (S2)	16,7	m
Daiane (S3 S5)	Imperatriz (S3 S5)	16,7	m

CV = 4,83

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Na Figura 10 pode-se observar o desenvolvimento do tubo polínico em um cruzamento compatível e em outro cruzamento incompatível. Destaca-se em C a grande quantidade de tubos polínicos crescendo ao longo do pistilo, mostrando-se um cruzamento altamente compatível. Já, ao contrário é observado em D, onde os tubos polínicos não conseguiram desenvolvimento.

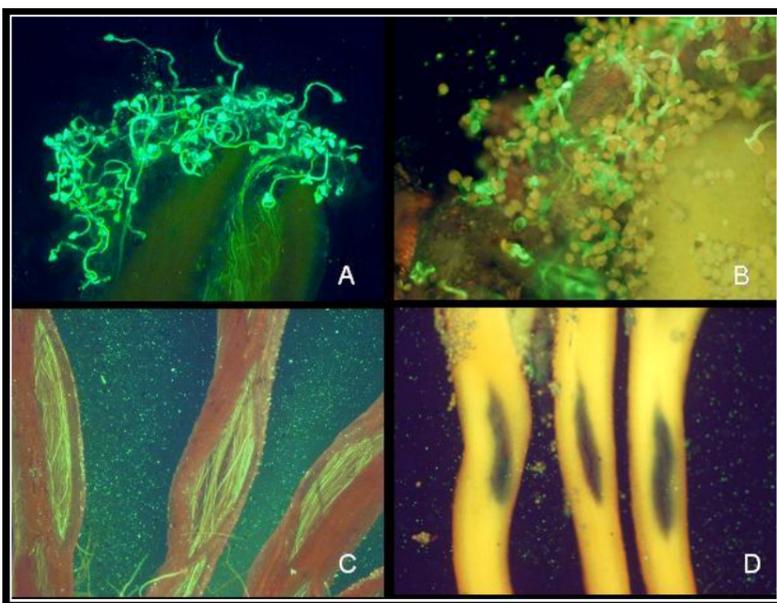


Figura 10 A- Superfície estigmática da cultivar Imperatriz, com pólen da cultivar Suprema (Cruzamento 100% compatível). B - Superfície estigmática da cultivar Imperatriz, com pólen da cultivar Daiane (Cruzamento 100% incompatível). C- Estilete aberto (cruzamento dirigido da cultivar Imperatriz com a cultivar Suprema - Cruzamento 100% compatível). D- Estilete aberto (cruzamento dirigido da cultivar

Imperatriz com a cultivar Daiane - Cruzamento 100% incompatível) CCA/UFSC - Florianópolis, 2005.

6. 7 FRUTIFICAÇÃO EFETIVA

O cruzamento que apresentou a maior frutificação efetiva foi o cruzamento entre as cultivares 'Fred Hough' x 'Baronesa', produzindo frutificação efetiva de 95,4%, provando a alta compatibilidade gametofítica existente entre estas cultivares e demonstrando ser uma combinação perfeita para pomares de macieira. Isto também revela que os testes de laboratório, ou seja, de germinação e desenvolvimento do tubo polínico *in vitro* são eficientes, pois igualmente comprovaram a alta compatibilidade entre essas duas cultivares.

No cruzamento 'Imperatriz' x 'Baronesa', a frutificação efetiva (84,1%) foi inferior ao do cruzamento mencionado anteriormente, mas evidencia também a existência de compatibilidade entre estas cultivares. Entretanto, pela análise dos alelos-S (Tabela 8), estas foram classificadas como semi-compatíveis, em razão da presença do alelo S3 nas duas cultivares. Com estes resultados, pode-se inferir que com o polimorfismo apenas em um dos alelos-S é possível obter uma boa frutificação efetiva.

No outro extremo, está o cruzamento 'Imperatriz' x 'Daiane', no qual foi observado uma frutificação efetiva muito baixa (5,7%), indicando uma alta incompatibilidade entre estas cultivares (Tabela 16). O mesmo resultado pode ser inferido pela análise molecular dos alelos S, revelando que ambas cultivares possuem o mesmo par de alelos-S (S3 e S5) (Tabela 8).

Essa taxa de frutificação encontrada (5,7%) no cruzamento 'Imperatriz' x 'Daiane' é superior a zero (taxa esperada) e pode ser decorrente da parternocarpia, que é variável dependendo da cultivar e das condições climáticas ou de uma

eventual contaminação de pólen. Entretanto, o mesmo fenômeno não ocorreu com a autopolinização da cultivar Fred Hough, em que também foi observado com clareza a expressão plena da auto-incompatibilidade gametofítica, resultando na formação de nenhum fruto (0%).

TABELA 16 Frutificação efetiva obtida durante o ciclo de 2005/06 nas cultivares Baronesa, Daiane, Imperatriz e Fred Hough, polinizadas com cultivares de diferentes níveis de incompatibilidade gametofítica. Epagri/EECD, Florianópolis, 2005.

Produtora	Polinizadora	Frutificação Efetiva (%)
Fred Hough	Baronesa	95,4
Imperatriz	Baronesa	84,1
Imperatriz	Daiane	5,7
Fred Hough	Fred Hough	0,0



Figura 11 (A) estágio ideal para cruzamentos (balão), (B) três flores já emasculadas e uma sendo emasculada com o auxílio da tesoura, (C) frasco de vidro com pólen e flor a ser polinizada e (D) polinização realizada com a ponta do dedo indicador.



Figura 12 (A) flor recém ensacada após a polinização, (B) planta com diversas flores polinizadas e ensacadas, (C) flores amareladas e caindo devido a incompatibilidade gametofítica e (D) frutos oriundos de um cruzamento compatível.

7 CONCLUSÕES

Conforme os objetivos propostos e com base nos resultados obtidos nesse trabalho, considerando as metodologias empregadas pode-se concluir que:

1. As cultivares objeto deste estudo (Condessa, Princesa, Eva, Duquesa, Imperatriz, Gala, Fred Hough, Daiane, Baronesa e Fuji Suprema) produzem pólen com boa capacidade germinativa, sendo aptas para serem utilizadas como polinizadoras;
2. Os resultados da análise molecular dos alelos S podem ser considerados robustos, não só pela inferência a partir das cultivares referências, mas também pelas análises de herdabilidade e frutificação efetiva feitas nas progênies.
3. Em termos de incompatibilidade gametofítica controlada pelos alelos S, dentre as cultivares estudadas existe compatibilidade total entre pólen e estigma nas seguintes combinações e seus respectivos cruzamentos recíprocos:
 - a. Princesa x Catarina, Princesa x Suprema;

- b. Fred Hough x Baronesa, Fred Hough x Suprema e Fred Hough x Duquesa;
 - c. Catarina x Baronesa, Catarina x Lisgala, Catarina x Daiane, Catarina x Duquesa e Catarina x Imperatriz;
 - d. Baronesa x Lisgala e Baronesa x Joaquina;
 - e. Lisgala (ou Gala) x Suprema (ou Fuji)
 - f. Suprema x Daiane, Suprema x Duquesa, Suprema x Imperatriz, Suprema x Joaquina;
 - g. Duquesa x Joaquina
4. Em termos de incompatibilidade gametofítica controlada pelos alelos S, dentre as cultivares estudadas existe compatibilidade parcial entre pólen e estigma nas seguintes combinações e seus respectivos cruzamentos recíprocos:
- a. Princesa x Fred Hough, Princesa x Baronesa, Princesa x Lisgala, Princesa x Duquesa e Princesa x Joaquina;
 - b. Fred Hough x Catarina, Fred Hough x Lisgala, Fred Hough x Daiane, Fred Hough x Imperatriz;
 - c. Catarina x Suprema e Catarina x Joaquina
 - d. Baronesa x Suprema, Baronesa x Daiane, Baronesa x Duquesa e Baronesa x Imperatriz;
 - e. Lisgala x Daiane, Lisgala x Duquesa, Lisgala x Imperatriz e Lisgala x Joaquina;
 - f. Daiane x Duquesa e Daiane x Joaquina;
 - g. Imperatriz x Joaquina;

5. Em termos de incompatibilidade gametofítica controlada pelos alelos S, dentre as cultivares estudadas existe incompatibilidade total entre pólen e estigma nas seguintes combinações e seus respectivos cruzamentos recíprocos:
- a. Princesa x Daiane;
 - b. Princesa x Imperatriz;
 - c. Daiane x Imperatriz;
 - d. Fred Hough x Joaquina;
6. Os resultados da análise de desenvolvimento do tubo polínico para avaliação do grau de incompatibilidade existente entre os cruzamentos estudados podem ser considerados, pois os mesmos foram confirmados pela análise molecular e análise de frutificação efetiva.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em razão da incompatibilidade gametofítica, sob controle da série alélica S ser um dos principais obstáculos na fertilização entre cultivares de macieira, o escopo principal deste estudo foi caracterizar os alelos do loco S nas cultivares introduzidas no mercado pela pesquisa brasileira.

Especificamente, a abordagem empregada foi eficiente na identificação dos alelos de 12 dos 14 genótipos estudados. No nosso conhecimento, este trabalho é pioneiro no país, o que o reveste de especial significado. Além disso, outras características da biologia reprodutiva também foram acessadas, com precisão estatística, revelando que as metodologias utilizadas foram adequadas.

O conhecimento dos respectivos alelos-S das diferentes cultivares, possibilitará também estabelecer combinações de parentais, em programas de melhoramento genético, com ampla gama de alelos S, contribuindo assim para o aumento da diversidade genética da espécie e o desenvolvimento de cultivares mais “adaptáveis em termos genéticos”.

Em termos gerais, os resultados obtidos no presente trabalho revelaram que o melhoramento genético da macieira realizado no Sul do Brasil vem seguindo o mesmo padrão genético dos diversos programas de melhoramento genético conduzidos em outros países. Apesar da enorme variabilidade genética existente

no germoplasma mundial de macieira, os melhoristas vêm utilizando um “pool” gênico muito limitado, com base genética muito estreita, envolvendo na maioria das situações apenas as cultivares elite, principalmente as do grupo ‘Delicious’, do grupo ‘Golden Delicious’ e, atualmente, as descendentes destas, as cultivares Gala e Fuji. Esta estratégia tem como consequência a geração de cultivares incompatíveis entre si, em razão da concentração de poucos alelos S.

O estudo não teve a pretensão de resolver por completo esta questão, pois sabe-se que outros fatores de ordem heteromórfica podem estar relacionados com os problemas de fertilização em macieira. Porém, uma vez conhecidos estes alelos, será mais seguro fazer as escolhas corretas das combinações de parentais em programas de melhoramento genético. Por outro lado, os resultados aqui encontrados facilitarão a definição de combinações “polinizadoras/produtoras” para fins comerciais.

Finalmente, este trabalho é um passo significativo da parceria entre a UFSC e a Epagri, permitindo à primeira não só o avanço no conhecimento científico e a formação de pesquisadores como também a utilização de resultados para o aumento da eficiência das atividades de pesquisa pela segunda. Dessa parceria espera-se a continuação dos trabalhos visando aprofundar o conhecimento sobre a auto-incompatibilidade em macieira.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPM, disponível em <http://www.abpm.org.br/> acesso em: 12 de maio de 2004.

ALSTON, F.H. Incompatibility alleles and apple pollination. *Acta Horticulturae*, Leuven, v.423, p.119-124, 1996.

ASKIN, A.; HEPAKSOY, S.; OZCAGIRAN, R. Investigations on the effects of atonic gibberellic acid and boric acid on the germination of some sweet cherry pollens. *Ege Universite Ziraat Fakultesi Dergise, Dergise*, v. 27, n. 03, p.105-116, 1990.

BATLE, I., F.H. ALSTON, AND K.M. EVANS. 1995. The use of the isoenzimic marker gene *Got-1* in the recognition of incompatibility S alleles in apple. *Theor. Applied Genet.* 90:303-306.

BEIGUELMAN, B. Curso prático de bioestatística. 5. ed. Ribeirão Preto: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto , 2002. 274p.

BENDER, R.J. Botânica e Fisiologia. In: Manual da cultura da macieira. Florianópolis: EMPASC , 1986. p.26-49.

BONETI, J.I.; RIBEIRO, P.A.; DENARDI, F.; CAMILO, A.P, BRIGHENTI, E.; PEREIRA, A.J. Epagri-402 – Catarina – nova cultivar de macieira resistente à sarna. Agropecuária Catarinense, v.9, p. 51-54, 1996.

BOSKOVIC, R.; TOBUTT, K. R (1999). Correlation of stylar ribonuclease isoenzymes with incompatibility alleles in apple. Euphytica, 107: 29-43.

BLAZEK, J. Pollination of single-cultivar blocks of apple cv. Golden Delicious. Acta Horticulturae, v.423, 1996.

BROOHAERTS, W. New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles. Theoretical Applied Genetics, v.106, p. 703-714, 2003.

BROOHAERTS, W. Update on and Review of the Incompatibility (S-) Genotypes of Apple Cultivars. HortScience, v.39, p. 943-947, 2004.

BROOHAERTS, W.; JANSSENS, G.A. PROOST, P., BROKAERT, W.F. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. Plant Molecular Biology, v.27, p.499-511, 1995.

BROWN, A.G. Apples. In: JANICK, J. & MOORE, J.N. Advances in Modern Fruit Breeding. Lafayette, Purdue University Press, p. 3-37. 1975.

CAMARGO, U.A. Comportamento de algumas cultivares e seleções de macieira (*Malus pumila* Mill.) quanto à polinização na região sul do Rio Grande do Sul. 1973. 62f. Dissertação – (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1973.

CAMILO, A.P.; DENARDI, F. Cultivares: Descrição e comportamento no Sul do Brasil. In: Epagri. A cultura da macieira. Florianópolis, 2002. p. 113-168.

CARVALHO, T.C.P. Comportamento de algumas cultivares de ameixeira japonesa (*Prunus salicina*) quanto à polinização no Rio Grande do Sul. Pelotas, 1989. 73f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1989.

CERTAL, A.C.; SANCHEZ, A.M.; KOKKO, H.; BROOHAERTS, W.; OLIVEIRA, M.M.; FEIJÓ, J.A. S-Rnases in apple are expressed in the pistil along the pollen tube growth path. Sex Plant Reprod., v.12, p.94-98, 1999.

CHALLICE, J.S. Chemotaxonomic studies in the family Rosaceae and evolutionary origins of the subfamily Maloideae. Preslia, v.53, n.3, p. 289-304, 1981.

CHALLICE, J.S.; WESTWOOD, M.N. Numerical taxonomic studies of the genus *Pyrus* using both chemical and botanical characteres. Botanical Journal of the Linnaean Society, v. 67, p.121-148, 1973.

COGO, C. Tendências de mercado safra 95/96. Seminário Técnico Mercadológico Ciba Agro. São Paulo, 1996.

CRUDEN, R. W. Pollen-ovule ratio: a conservative indicator of breeding system in flowering plants. *Evolution*, 1977, v. 31, p. 32-36.

DANTAS, A.C.M.; PEIXOTO, M.L.; ORTH, A.I.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. VIABILIDADE DO PÓLEN *IN VITRO* E DESENVOLVIMENTO DO TUBO POLÍNICO EM CULTIVARES DE MACIEIRA (*Malus sp.*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 2005 (no prelo).

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

DENARDI, F.; CAMILO, A.P. Duquesa: nova cultivar de macieira de baixa exigência em frio hibernal e alta resistência a sarna. *Agropecuária Catarinense*, v. 11, p. 19-21, 1998b.

DENARDI, F.; CAMILO, A.P. ‘ Epagri 404- Imperatriz ‘ – nova cultivar de macieira para dupla finalidade – produtora e polinizadora. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.22, n.1, p. 40-43, 2000.

DENARDI, F.; CAMILO, A.P. Epagri 406 Baronesa: nova cultivar de macieira de maturação tardia para o Sul do Brasil. Revista Brasileira de Fruticultura, v.19, n.2, p. 185-189, 1997a.

DENARDI, F.; CAMILO, A.P. Epagri 408-Condessa: nova cultivar de macieira de baixa exigência em frio hibernal. Agropecuária Catarinense, v. 11, n.2, p. 12-15. 1998c.

DENARDI, F.; CAMILO, A.P. Fred Hough – nova cultivar de macieira imune à sarna. Revista Brasileira de Fruticultura. V.16, p. 1-6, 1994.

DENARDI, F.; CAMILO, A.P. Novas cultivares de macieira: proposta de nova composição de pomares com polinizadoras/produtoras. Agropecuária Catarinense. Florianópolis/SC, v.10, n.2, p. 25-30, 1997b.

DENARDI, F.; CAMILO, A.P.; PETRI, J.L. Epagri 407- Lisgala: mutação da cultivar de macieira Gala com epiderme mais colorida. Agropecuária Catarinense, v. 10, n.1, 1997.

DENARDI, F.; HOUGH, L.F. Apple breeding in Brasil. HortScience, Mount Vernon, v.22, n.6, p.1231-1233, 1987.

DENARDI, F.; HOUGH, L.F.; CAMILO, A.P. Primícia e Princesa – novas cultivares de macieira para Santa Catarina. Agropecuária Catarinense, v. 5, n.1, 1992.

DE NETTANCOURT, D. Incompatibility in angiosperms. Berlin : Springer, 1977a. 230p.

DONG, Y.H.; KVARNHEDEN, A.; YAO, J.L.; SUTHERLAND, P.W.; ATKINSON, R.G.; MORRIS, B.A.; GARDNER, R.C. Identification of pollination-induced genes from the ovary of apple (*Malus domestica*). Sex Plant Reprod., v.11, p.277-283, 1998.

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

FRANKEL, R., E. GALUN, AND H.F. LINSKENS. 1977. Allogamy, p. 67. In: R. Frankel, E. Galun, and H.F. Linskens (eds.). Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding. Springer-Verlag, new York.

GALLETTA, G.J. *Pollen and Seed Management*. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. – Methods in fruit breeding, 464 p. 1983.

GOLDWAY, M. SHAI O.; YEHUDA, H.; MATITYAHU, A.; STERN, R.A. 'Jonathan' apple is a lower-potency pollenizer of 'Topred' than 'Golden Delicious' due to partial S-allele incompatibility. J. Hort. Sci. Biotechnol. 74: 381-385, 1999.

GRAUSLUND, J. Pollination experiments with selected apple cultivars. Acta Horticulturae, 423, p. 161-165, 1996.

HAUAGGE, R., BRUCKNER, C.H. Macieira. In: BRUCKNER, C.H. (ed).
Melhoramento de fruteiras de clima temperado. Viçosa: UFV, cap.2, p. 27-88,
2002.

HUGARD, J. Origine du pollen et varietes pollinisatrices. Fruit Belge, 381: 11-32,
1978.

ICEPA, disponível em <http://www.icepa.com.br> acesso em 12 de maio de 2004.

IPGRI. Apple Descriptors. In: WATKINGS, R.; SMITH, R.A. (eds.) Commission of
the European Communities: EEEEC, ECSC, EAEC, Brussels and Luxembourg,
IPBGR, Rome, 1982.

JANSSENS, G.A., I.J. GODERIS, W.F. BROEKAERT, AND W. BROOThAERTS.
1995. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific
PCR. Theor. Applied Genet. 91:691-698.

JENSEN, W.A. Fertilization in Flowering Plants. BioScience, Washington, 23: 21-27,
1973.

KAO, T.; McCubbin, A.G.; How Flowering plants discriminate between self and non-
self pollen to prevent inbreeding. Proc. Natl. Acad.Sci.USA, v.93, p. 12059-12065,
1996.

KATOH, N., K. YAMADA, A. KASAI, M. SENDA, K. MIYAIRI, AND T. OKUNO. 1997. cDNA cloning of apple S-Rnase. *Jpn. Soc. Biosci. Biotech. Agrochem.* 71 (Suppl.):236.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. 1993. *Techniques for pollination biologists.* University Press of Colorado. Colorado. 630 pp.

KEULEMANS, J., R. EYSSEN, AND G. COLDA. 1994. Improvement of seed set and seed germination in apple. p. 225-228. In: H. Schmidt and M. Kellerhals (eds.). *Progress in temperate fruit breeding.* Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands.

KITAHARA, K. ; SOEJIMA, J.; KOMATSU, H.; FUKUI, H.; MATSUMOTO, S. (2000). Complete sequences of the S-genes 'Sd' and 'Sh-RNase' cDNA in apple. *HortScience*, 35: 712-715.

KNOWLTON, H.E. The relative abundance of pollen production by varieties of apples. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., St. Joseph, Michigan*, 32: 7-9, 1935.

KOBEL, F., P. STEINEGGER, AND J. ANLIKER. 1939. Weitere Untersuchungen über die Befruchtungsverhältnisse der Apfel- und Birnsorten. *Landw. Jahrb. Schweiz.* 53: 160-191.

KORBAN, S.S. Interspecific hybridation in *Malus*. *HortScience*, v.21, p. 41-48, 1986.

KUTZELNIGG, H.; SILBEREISEN, R. Sortenkunde zu Pyrus und Malus. In: Illustrierte Flora von Mitteleuropa. 3 ed. Berlin: Paul Parey, [19..]. v.41.

LI, B.J.; HUANG, H.F.; JIANG, L.J. Study on pollen fertility and crossability of pear cultivars. Journal of Shenyang Agricultural University, Shenyang, n.04, v. 22, p.327-322, 1991.

LUNDQVIST, A. The nature of the two-loci incompatibility system in grasses. IV. Interaction between the loci in relation to pseudo-compatibility in *Festuca pratensis* Huds. Hereditas, v 52, p. 221-234, 1964.

MACDANIELS, L.H. HEINICKE, J. Pollination and other factors affecting the set of fruit, with special reference to the apple. New York: Cornell University, Agr. Expt. Sta.Bul., n., 497, 1929. p.31.

MANGANARIS, A.G. AND F.H. ALSTON. 1987. Inheritance and linkage relationships of glutamate oxaloacetate transaminase isozymes in apple. 1. The gene Got-1, a maker for the S incompatibility locus. Theor. Appl. Genet. 74:154-161.

MARTIN, F. Staining and observing pollen tubes in the style bu means of flurescence. STAIN TECHNOLOGY, V. 34, P. 125, 1959.

MATSUMOTO S, KITARA K, KOMORI s, SOEJIMA J (1999). A new S-allele in apple, 'Sg', and its similarity to the 'Sf' allele from 'Fuji'. HortScience 34:708-710.

MILUTINOVIC, M.; SURLAN-MOMIOVI, S.; NIKOLIC, D. Functionally of pollen and fruitset in apples. *Acta Horticulturae*, v.423, p.167-170, 1996.

MODLIBOWSKA, I. Pollen tube growth and embryosac development in apples and pears. *J. Pomol. Hort. Sci.*, 21: 57:89, 1945.

NETTANCOURT, D. (1997) "Incompatibility in Angiosperms", In: Frankel, R.; Gal, G.A.E. and Linnskens, H.F., eds, *Monographs on Theoretical and Applied Genetics* (Springer, New York), pp 28-57.

NETTANCOURT, D, de (2001) *Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants*. Springer-Verlag.

NODARI, R.O. 1993. Marcadores Moleculares no Melhoramento de Plantas: potencial e perspectives. In: *Biologia Molecular e Produção Vegetal – manual do curso oferecido pela UFSC/CCA*. Florianópolis-SC.

NOITON, D.; SHELBOURNE, C.J.A. Quantitative genetics in an apple breeding strategy. *Euphytica*, v.60, p.213-219, 1992.

NUNES, J.C.O.; DANTAS, A.C.M.; PEDROTTI, E.L.; ORTH, A.I.; GERRA, M.P. Germinação de pólen in vitro e receptividade do estigma em macieira cvs. Fuji e Golden Delicious. *Revista Brasileira de Fruticultura.*, v.23, n.1, p. 35-39, 2001.

OKUNO, T (2000). Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Springer Verlag.

OKUSE, I. Influences of some mineral ions on pollen germination and pollen tube growth in Starking Delicious apple. Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagoshima, n. 57, p.45-54, 1994.

PASQUAL, M; PETRI, J.L. Compatibilidade de pólen entre diversas cultivares de macieira. EMPASC. Comunicado Técnico, 38. Florianópolis, EMPASC, 1980. 30p.

PEREIRA, Adilson José ; BONETI, José Itamar da Silva ; BRIGHENTI, E. ; DENARDI, F. ; CAMILO, Anísio Pedro . Joaquina: nova cultivar precoce de macieira resistente á sarna. Revista Agropecuária Catarinense, Florianópolis, v. 16, n. 3, p. 70-73, 2003.

PETRI, J.L. Número de grãos de pólen por antera em diversas cultivares de macieira (*Malus Sylvestris*). Anais do Terceiro Congresso Brasileiro de Fruticultura. Campinas, Soc. Bras. Frut. 1976. p. 467-471.

PETRI, J.L.; DENARDI, F.; SUZUKI, A. Epagri, 405-Fuji Suprema: Nova cultivar de macieira . Agropecuária Catarinense, Florianópolis, v.10, n.3, p. 48-50, 1997.

PETRI, J.L. PASQUAL, M. Polinização da macieira no alto do Rio do Peixe, Santa Catarina. Florianópolis: EMPASC, 1981, 40p. Boletim Técnico n.1.

PONOMARENKO, V.V. Review of the species in the genus *Malus* Mill. Bulletin of Applied Botany, Genetics and Breeding, v. 106, p.3-27, 1986.

RICHMAN, A.D.; BROOHAERTS, W.; KOHN, J.R.; (1997) Self-incompatibility RNases from three plant families: homology or convergence? *Am J Bot*, 84:912–917.

RICHARDS, A. J. Plant breeding systems. London : Chapman & Hall, 1997. 529p.

SAKURAI, K., S.K. BROWN, AND N.F. WEEDEN. 1997. Determining the self-incompatibility alleles of Japanese apple cultivars. *HortScience* 32:1258-1259.

SAKURAI, K., S.K. BROWN, AND N.F. WEEDEN. 2000. Self-incompatibility Alleles of Apple cultivars and Advanced Selections. *HortScience* 35 (1): 116-119.

SASSA, H., N. MASE, H. HIRANO, AND H. IKEHASHI. 1994. Identification of self-incompatibility-related glycoproteins in styles of apple (*Malus x domestica*). *Theor. Appl. Genet.* 89:201-205.

SASSA, H., T. NISHIO, Y. KOWYAMA, H. HIRANO, T. KOBAYASHI, AND H. IKEHASHI. 1996. Self-Incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Mol. Gen. Genet.* 250:547-557.

SCHRAMM, C.C. Compatibilidade e incompatibilidade gametofítica entre as principais cultivares de macieiras (*Malus domestica*, Borkh.) em Pelotas. Dissertação – (Mestrado). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1985. 58p.

SCHNEIDER, D.; STERN, R.A.; EISIKOWITCH, D.; GOLDWAY, M (2001). Analysis of S-alleles by PCR for determination of compatibility in the Red Delicious apple orchard. *J Hortic Sci Biotech* 76:596–600.

SHARMA, S.P.; BIST, H.S. Flowering behavior in some local varieties of grapes (*Vitis* spp) in dry temperate region of Himachal Pradesh. *India Horticultural Journal*, v. 4, n. 01, p.11-14, 1991.

SHELBOURNE, C.J.A.; BURDON, R.D.; CARSON, S.D. FITH, A. VINENT, T.G. Development plan for breeding Radiata pipe. p.142. Forest Research Institute Report, Rotorua, 1986.

SILVA, N. F.; GORING, D.R., Review: Mechanisms of self-incompatibility in flowering plants, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Vol. 58, p. 1988–2007, 2001.

SOLTÉSZ, M. Lows of bloom phenology by apple. *Acta Horticulturae*, Leuven, v.437, p.451-456, 1997.

SPIEGEL-ROY, P.; Alston, F.H. Pollination requeriments of new apple cultivars. *J. Hort. Sci.* 57: 145-50, 1982.

STÖSSER, R., HARTMAN, W., ANVARY, S.F. General aspects of pollination and fertilization of pome and stone fruit. *Acta Horticulturae*, v.423, 1997.

SOUZA, C.M.; RASEIRA, M.C.B. Germinação *in vitro* de pólen de pereira. *Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas*, v. 01, n. 02, p.219-223, 1998.

VAN NERUN, I.; GEERTS, M.; VAN HAUTE, A.; KEULEMANS, J.; BROOThAERTS, W. Re-examination of the self-incompatibility genotype of apple cultivars containing putative 'new' S-alleles. *Theor Appl. Genet.* (2001) 103:584-591.

VERDOODT, L., A. VAN HAUTE, I.J. GODERIS, K. DE WITTE, J. KEULEMANS, AND W. BROOThAERTS. 1998. Use of the multi-allele self-incompatibility gene in apple to assess homozygosity in shoots obtained through haploid induction. *Theor. Appl. Genet.* 96:294-300.

WATKINS, R. Apple and Pear (*Malus and Pyrus* sp. – *Rosaceae*) In: SMARTT, J.; SIMMONDS, N.W. (eds.) *Evolution of Crops Plants*, Longman Scientific & Technical, Burnt Mill, p. 418-422, 1995.

WAY, R.D. ALDWINCKE, H.S. LAMB, R.C.; REJAMN, A.SANSAVINI, S.; SHEN, T.; WATKINS, R.; WESTWOOD, M.N.; YOSHIDA, Y. Apples (*Malus*) In: MOORE, N.; BALLING, J.R. (eds.) *Genetic resources of temperate fruit and nuts crops*. *Acta Horticulturae*, n. 290, ISHS, Wageningen, 1990.

WEESTWOOD, M.N. Dormancy and plant hardiness. In; WEESTWOOD, M.N. Temperate zone pomolog. San Francisco: W.N. Freeman, 1978. p.229-332.

WERNER, D.J.; CHANG, S. Stain testing viability in stored peach pollen. HortScience, v.16, p. 522-523, 1981.

WHILLIAMS, R.R., MAIER, M. Pseudo-compatibility afterpollination of the Cox's Orange Pippim. The Journal of Horticultural Science, Ashford, v.52, p.475-483, 1977.

WILLIAM, R.R.; MAIER, M. Pseudo-compatibility after-pollination of apple Cox's Orange Pippim. J. Hort. Sci., 52:475-83, 1977.

ZHANG, Y.X.; LESPINASSE, Y. SALESSES, G. Mise en evidence de quelques anomalies meiotiques conduisant a ala formation de gemetes males nom reduts chez le pommier cultive (*Malus domestica*, Borkh.). Cytologia, v.53, p. 749-755, 1988.

WILLIAMS, W.; BROWN, A. G. 1956. Genetic response to selection in cultivated plants: Gene frequencies in *Prunus avium*. Heredity, 10:237-245.

ZHANG, Y.X.; LESPINASSE, Y. SALESSES, G. Mise en evidence de quelques anomalies meiotiques conduisant a ala formation de gemetes males nom reduts

chez le pommier cultivé (*Malus domestica*, Borkh.). *Cytologia*, v.53, p. 749-755, 1988.