MAPAS DE LIGAÇÃO DE MARACUJÁ AMARELO

(*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)

BASEADOS EM MARCADORES RAPD

MONALISA SAMPAIO CARNEIRO

Engenheira Agrônoma

Orientador: Profa. Dra. **MARIA LUCIA CARNEIRO VIEIRA**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia, Área de
Concentração: Genética e Melhoramento de
Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Julho - 2001

ERRATA

MAPAS DE LIGAÇÃO DE MARACUJÁ AMARELO (*Passiflora ulais* Sims f. *flavicarpa* DEG.) BASEADOS EM MARCADORES RAPD

pagina	item	linha	onde se lê	leia-se
iii		12 ^a L.	... de acordo com Hulbert et al. (1988).	... de acordo com Hulbert et al. (1988).
1	1	2 ^a L.	... pelo fenômeno da autoincompatibilidade...	... pelo fenômeno da autoincompatibilidade...
1	1	15 ^a L.	... a localização de genes (ou QTL's) envolvidos...	... a localização de genes ou QTL's envolvidos...
2	1	3 ^a L.	... mapeamento denominada "pseudo-testcross".	... mapeamento denominada "pseudo-testcross" (Grattapaglia & Sederroff, 1994).
3	2.1	13 ^a L.	... maior centro distribuição geográfica...	... maior centro de distribuição geográfica...
4	2.1	22 ^a L.	... entre as frutíferas mais cultivadas...	... entre as espécies frutíferas mais cultivadas...
5	2.1	9 ^a L.	... apenas de uma garantia de...	... apenas de garantias de...
5	2.1	25 ^a L.	... número de pragas e doenças...	... número de pragas e patógenos...
6	2.1	6 ^a L.	... total da planta afetada (Teixeira et al., 1994).	... total da planta afetada (Teixeira, 1994).
10	2.1	11 ^a L.	... estimativas dos parâmetros genéticos.	... estimativas dos parâmetros genéticos.
16	2.3	4 ^a L.	Várias espécies para as quais...	Várias espécies para as quais...
18	2.3.1	27 ^a L.	... com auxílio de desses mapas.	... com auxílio desses mapas.
11	4.2	17 ^a L.	... nenhum produto de amplificação...	... nenhum produto de amplificação...
14	4.2	8 ^a L.	... foi de 54% (145/269) e...	... foi de 54% (148/269) e...
14	4.3	25 ^a L.	... todos os marcadores.	... todos os marcadores na população segregante.
15	4.3	1 ^a L.	... da população segregante.	... da população segregante, obtido com primer OPH 14.
54	4.3	10 ^a L.	... o método de Hulbert (1988) foi...	... o método de Hulbert et al. (1988) foi...
58	4.3	5 ^a L.	... no método de Hulbert (1988) o...	... no método de Hulbert et al. (1988) o...
32	4.3	6 ^a L.	... em que ordem estabelecida é 100 vezes...	... em que a ordem estabelecida é 100 vezes...
33	4.3	2 ^a L.	... não foram ordenados corretamente.	... não foram ordenados com igual confiança ...

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Carneiro, Monalisa Sampaio

Mapas de ligação de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)
baseados em marcadores RAPD / Monalisa Sampaio Carneiro. - - Piracicaba, 2001.
92 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Cruzamento vegetal 2. Mapeamento genético 3. Maracujá amarelo 4. Marcador
genético 5. Melhoramento genético vegetal I. Título

CDD 634.425

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Data de depósito junto à CPG/ESALQ

06 / 07 / 2001

A Deus,
por iluminar pelos caminhos,
Agradeço

A José Maurício Simões Bento,
por nosso amor e carinho,
Dedico

Aos meus pais, Liberato e Solange,
meus exemplos de vida e humildade,
Aos meus irmãos, José Fernando e Betanhia,
pelo amor que nos une,
e aos meus sobrinhos, Victor, Matheus e Vitória,
pela compreensão e carinho.
Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira, professora do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pela orientação, confiança e amizade, pelo apoio e estímulo, e por não faltar em nenhum momento, mesmo nos mais difíceis;

Aos pesquisadores Neuza Maria Colauto Stenzel e Rui Pereira Leite Júnior, do Instituto Agronômico do Paraná, pela concessão dos acessos 123 e 06 de maracujá amarelo, fundamental para realização desta pesquisa, minha gratidão por tanta gentileza e atenção;

Ao Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo, professor do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia da ESALQ/USP, pelo estímulo e contribuições inestimáveis a este trabalho;

Ao Dr. Roland Vencovsky, professor do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pela valiosas discussões sobre o tema deste trabalho, pelo incentivo e amizade;

Ao Eng^o. Agr^o. MS, Alexandre Siqueira Guedes Coelho, professor do Departamento de Biologia Geral da UFG, pela auxílio nas análises estatísticas e pela amizade;

Aos professores que, além da sua amizade, permitiram a utilização de equipamentos de seus laboratórios: Dr. Márcio de Castro Silva Filho (Genética/ ESALQ), Dr. Isaías Geraldi (Genética/ ESALQ), Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner (Genética/ ESALQ) e Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira (Ciências Biológicas/ ESALQ);

Ao Dr. Giancarlo Conde Xavier de Oliveira, professor do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pelas correções do “summary”;

Aos professores do Departamento de Genética da ESALQ/USP, que, com grande profissionalismo me transmitiram seus conhecimentos, e pela amizade;

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas: Paulo Barroso, Elizabete Keiko, Mariza Monteiro, Luciana Barbosa, Luciana Rossini, Vera Quecini, Adriano Castro, Ricardo e Teresa Lopes, Michel, Frederico, Maria Aldete, Maria Zucchi, Adriana Alves, Heiko Rossman, Salete Gazola, Juliano Gomes, Jannay Almeida, Matheus Mondin e Silvia Cuco por formamos um grupo unido em prol da pesquisa e pela agradável convivência;

A Carlos Alberto de Oliveira pelo auxílio durante a execução da parte experimental deste trabalho e pela amizade e paciência constante;

Aos meus amigos (vizinhos) do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas: Maria Cristina, Sabrina, Reinaldo, Maria Helena, Ana Lúcia, Juliana, Cláudio, Phellippe, Veridiana, Patrícia, Danila e Rafael;

Aos colegas Américo José dos S. Reis e Fábio Pandini (*in memoriam*) pelas interessantes discussões genéticas e amizade.

A todos os funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP por esses anos de convívio que fizeram deste lugar a minha segunda casa;

As bibliotecárias da Biblioteca do Departamento de Genética e Central da ESALQ/USP pela atenção e carinho sempre constantes;

Ao Carlos Macedônio, funcionário do Departamento de Genética da ESALQ/USP pelos auxílios computacionais, pela paciência e amizade;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, particularmente ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela possibilidade de realizar o Doutorado;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos durante a realização do Doutorado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Melhoramento genético de maracujá.....	3
2.2 Marcadores moleculares.....	11
2.3 Mapas genéticos em plantas.....	13
2.3.1 Princípios básicos da construção de mapa de ligação.....	16
2.4 Estratégia de mapeamento “pseudo-testcross”.....	26
2.5 Aplicações dos mapas de ligação.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Obtenção da população segregante.....	32
3.2 Germinação das sementes.....	34
3.3 Extração do DNA genômico.....	34
3.4 Quantificação do DNA.....	36
3.5 Reação de RAPD.....	36
3.6 Seleção de “primers”.....	37
3.7 Construção do mapa de ligação.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 Obtenção da população segregante e germinação das sementes.....	40

4.2 Seleção de “primers”	41
4.3 Construção dos mapas de ligação.....	44
5 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 <i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg: acesso 123 (A), acesso 06 (B), retirada das anteras contendo o pólen do genitor masculino (C), e fruto proveniente do cruzamento entre os acessos 123 e 06 (D).....	33
2 Plântula de maracujá amarelo obtida do cruzamento entre os acessos 123 e 06.....	40
3 Detecção de polimorfismo: os primers OPA01 (A), OPAB12 (B) e OPH14 (C) foram utilizados para amplificação do DNA genômico dos acessos 123 (1) e 06 (2) e de uma amostra de seis indivíduos da população segregante. Marcadores polimórficos estão indicados com setas. M = 100 pb Ladder (Amersham Pharmacia Biotech ou Gibco/BRL), marcador de peso molecular.....	42
4 Perfil de RAPD dos genitores, acessos 123 (1) e 06 (2), e de uma amostra 90 indivíduos da população segregante. Marcadores polimórficos estão indicados com setas. M = 100 pb Ladder (Amersham Pharmacia Biotech), marcador de peso molecular.....	45
5 Mapa genético de <i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg. acesso 123. As relações de ligação dos 135 marcadores RAPD foram estabelecidas com LOD 4,0 e $\theta = 0,3$. Os grupos de ligação foram compostos de 65 marcas e ordenadas com LOD > 2,0. Marcadores não ordenados foram considerados como acessórios e listados à direita dos grupos de ligação.....	55

- 6 Distribuição dos marcadores RAPD nos grupos de ligação do acesso 123 de maracujá amarelo. Em branco estão os marcadores dispostos dentro do grupos de ligação e em preto, os marcadores acessórios..... 58
- 7 Mapa genético de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. acesso 06. As relações de ligação dos 96 marcadores RAPD foram estabelecidas com LOD 4,0 e $\theta = 0,3$. Os grupos de ligação foram compostos de 64 marcas e ordenadas com LOD > 2,0. Marcadores não ordenados foram considerados como acessórios e listados à direita dos grupos de ligação..... 59
- 8 Distribuição dos marcadores RAPD nos grupos de ligação do acesso 06 de maracujá amarelo. Em branco estão os marcadores dispostos dentro do grupos de ligação e em preto, os marcadores acessórios..... 62

LISTA DE TABELAS

	Página
1 "Kits" comercializados pela Operon Technologies (Alameda, Califórnia, EUA) contendo 20 "primers" cada, número de produtos amplificados (bandas) por conjunto, e o número médio de bandas por "primer".....	43
2 Segregação dos marcadores RAPD no acesso 123 representados por um código que contém a denominação do "primer" e o respectivo peso molecular (pb), valores absolutos observados na progênie, e valores do teste de χ^2 ($\alpha = 0,05$, 1GL).....	47
3 Segregação dos marcadores RAPD no acesso 06 representados por um código que contém a denominação do "primer" e o respectivo peso molecular (pb), valores absolutos observados na progênie, e valores do teste de χ^2 ($\alpha = 0,05$, 1GL)	51
4 Número de marcadores RAPD e comprimento em centimorgans (cM) de cada grupo de ligação do mapa de <i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg., acesso 123.....	54
5 Número de marcadores RAPD e comprimento em centimorgans (cM) de cada grupo de ligação do mapa de <i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg., acesso 06.....	61
6 Características dos mapas de ligação de <i>Passiflora edulis</i> f. Sims <i>flavicarpa</i> Deg., obtidos utilizando-se a estratégia de mapeamento "pseudo-testcross", segundo o acesso.....	63

MAPAS DE LIGAÇÃO DE MARACUJÁ

(*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) BASEADOS EM

MARCADORES RAPD.

Autora: Monalisa Sampaio Carneiro

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Lucia Carneiro Vieira

RESUMO

Um cruzamento controlado entre dois acessos de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. ($2n=18$) foi selecionado para mapeamento genético. A população de mapeamento de maracujá foi composta de 90 plantas F_1 derivadas de 'IAPAR 123' (genitor feminino) x 'IAPAR 06' (genitor masculino). Um total de 380 "primers" de RAPD foi analisado de acordo com a estratégia de mapeamento "two-way pseudo testcross". Mapas de ligação dos acessos foram construídos com 269 locos (2,38 marcadores/"primer"). Para 70,4% dos marcadores, o tamanho das bandas variou entre 500 a 1500 bp. O mapa de ligação para 'IAPAR123' consistiu de 135 marcadores, com aproximadamente 48,1% (65 locos) localizados dentro dos grupos de ligação. Foram obtidos nove grupos de ligação cobrindo 728 cM, com uma distância média de 11,2 cM entre os locos. O tamanho dos grupos de ligação variou entre 56 a 144,6 cM. O mapa

de ligação para 'IAPAR 06' consistiu de 96 marcadores com 64 locos (66,7%) distribuídos nos grupos de ligação, cobrindo 783,5 cM. Foram gerados 9 grupos de ligação com uma distância média entre os dois locos de 12,2 cM. O comprimento dos grupos variou de 20,6 a 144,2 cM. Na média, as marcas de DNA cobriram 61% do genoma. Em ambos, os testes de χ^2 ($\alpha = 0.05$) foram realizados para testar a hipótese nula de segregação (1:1). Quatorze marcadores (5,2%) demonstraram distorções da segregação. A análise de ligação foi realizada utilizando-se o programa "Mapmaker" com LOD 4.0 e max. $\theta = 0,30$. Vinte e quatro locos (8,9%) permaneceram não ligados. A distância dos mapas em centimorgans foi calculada utilizando-se a função de mapeamento de Kosambi. O tamanho do genoma foi estimado de acordo com Hulbet et al. (1988). Este é o primeiro registro de um mapa genético no gênero *Passiflora*. Entre outras aplicações, estes mapas genéticos são o ponto de partida para identificar locos quantitativos de resistência à bacteriose causada por *Xanthomonas* sp. pv. *passiflorae*, principal doença que afeta a cultura no sul e sudeste do Brasil.

GENETIC LINKAGE MAPS OF PASSION FRUIT
(*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) BASED ON
RAPD MARKERS.

Author: Monalisa Sampaio Carneiro

Adviser: Prof^a Dr^a Maria Lucia Carneiro Vieira

SUMMARY

A single controlled cross between two clones of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. ($2n=18$) was selected for genetic mapping. The passion fruit mapping population was composed of 90 F_1 plants derived from 'IAPAR 123' (female parent) x 'IAPAR 06' (male parent). A total of 380 RAPD primers were analyzed according to two-way pseudo testcross mapping strategy. Linkage maps were constructed with 269 RAPD loci (2.38 markers/primer). For 70.4% of the markers, the size of the bands ranged from 500 to 1500 bp. The linkage map for 'IAPAR123' consisted of 135 markers, with approximately 48.1% of them (65 loci) located on the framework map. A total of nine linkage groups were assembled covering 728 cM, with an average distance of 11.20 cM between two framework loci. The size of the linkage groups ranged from 56 to 144.6 cM. The linkage map for 'IAPAR 06' consisted of 96 markers with 64 loci (66.7%) establishing the framework and covering 783.5 cM. The average distance

between framework loci was 12.2 cM. The framework loci were mapped into nine linkage groups. The length of the groups ranged from 20.6 cM to 144.2 cM. On average, both maps provided 61% genome coverage. For both maps, χ^2 test ($\alpha = 0.05$) was performed to test the null hypothesis of segregation (1:1) on all scored markers. Fourteen markers (5.2%) showed segregation distortion. The linkage analysis was done using Mapmaker with LOD 4.0 and max. $\theta = 0.30$. Twenty four loci (8.9%) remained unlinked. Map distances in centimorgans were calculated using the Kosambi's mapping function. Genome map sizes were estimated according to Hulbert et al. (1988). This is the first report of a genetic linkage map in the genus *Passiflora*. Among many applications, these linkage maps are a starting point for identifying quantitative trait loci for resistance to the bacteriosis caused by *Xanthomonas* sp. pv. *passiflorae*, the main disease that affects passion fruit orchards in the south of Brazil.

1 INTRODUÇÃO

O maracujá é uma espécie alógama, na qual a polinização cruzada é condicionada pelo fenômeno da autoincompatibilidade (Bruckner, 1997). Basicamente, uma única espécie, *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. ($2n=2x=18$), é responsável por cerca de 95% da área plantada no Brasil, com um total de aproximadamente 44 mil hectares (FNP Consultoria & Comércio, 2000). O suco concentrado de maracujá ocupa o segundo lugar na pauta de exportações brasileiras de sucos de frutas que movimenta um mercado mundial de 5,0 bilhões de dólares/ano (Carraro & Cunha, 1994).

Apesar dessa condição privilegiada da cultura, a produtividade média é ainda muita baixa quando comparada à de outros países produtores. As principais causas seriam o uso inadequado de práticas de cultivo e a incidência de doenças, sendo uma das principais, a bacteriose causada por *Xanthomonas* sp. pv. *passiflorae*, de ocorrência nos estados do sul e sudeste.

A construção de mapas é de extrema importância no melhoramento genético, pois permite a localização de genes (ou QTL's) envolvidos na produção, resistência a patógenos e pragas, precocidade de produção, e qualidade de frutos, possibilitando a seleção precoce de indivíduos superiores.

Em geral, mapas de ligação em espécies alógamas são construídos envolvendo linhagens homozigóticas e gerações de autofecundação e retrocruzamento as quais, em alguns casos, não são facilmente obtidas em função da forte depressão endogâmica e devido a problemas de auto-incompatibilidade. Cruzamentos simples entre indivíduos altamente heterozigóticos podem ser realizados gerando progênies que se assemelham à

população F₂ ou de retrocruzamento. Em cruzamentos envolvendo plantas altamente heterozigóticas é recomendada a estratégia de mapeamento denominada “pseudo-testcross”.

O presente trabalho teve como objetivo a construção do mapa de ligação em *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg., a partir de marcadores RAPD, utilizando a estratégia de mapeamento “pseudo-testcross”. Ressalte-se ainda, que não há registros na literatura de mapas genéticos de *Passiflora*, sendo esta uma proposta inédita.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Melhoramento genético de maracujá

O maracujá pertence à ordem *Passiflorales*, tribo *Passiflorae* e família *Passifloraceae*. Esta família apresenta 18 gêneros e 630 espécies, sendo que 95% delas são nativas da América do Sul. Os outros 5% são encontrados na América do Norte, Índia, Ilhas Galapágos, África e Austrália (Vanderplank, 1996).

Há divergências quanto ao número de gêneros brasileiros. Segundo Killip (1938) e Sacco (1980) são quatro os gêneros: *Dilkea* (Amazonas e Pará), *Tetrastylis* (Bahia, Minas Geras e Rio de Janeiro), *Mitostemma* (Mato Grosso, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul) e *Passiflora*, presente em todo país. Para Leitão Filho & Aranha (1974), os gêneros *Dilkea* e *Passiflora* são os únicos existentes no Brasil.

O gênero *Passiflora* é considerado o mais importante, pois apresenta um grande número de espécies, entre as quais estão as principais espécies exploradas comercialmente no mundo (Lopes, 1991; Souza & Meletti, 1997). O maior centro distribuição geográfica do gênero localiza-se no Centro-Norte do Brasil (Lopes, 1991). Diversas espécies são cultivadas com a finalidade de fornecer frutos para consumo *in natura* ou à indústria, bem como para a extração de substâncias de interesse farmacológico, ou ainda, como plantas ornamentais (Souza & Meletti, 1997).

No Brasil, as principais espécies são: *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. (maracujá amarelo ou azedo), *Passiflora edulis* Sims (maracujá-roxo), *Passiflora alata* Dryand. (maracujá doce) (Ruggiero et al., 1996; Souza & Meletti, 1997; Meletti & Maia, 1999) e *Passiflora nitida* Kunth. (maracujá-de-rato ou maracujá suspiro amarelo), de pouca expressão comercial (Oliveira & Ruggiero, 1998; Passos, 1999).

A origem do maracujá amarelo é ainda bastante discutida. Alguns pesquisadores consideram esta espécie nativa do Brasil, devido à existência de relatos datados do século XVI que mencionam um maracujá com frutos muito semelhantes. No entanto, outros salientam que surgiu na Austrália, por mutação de *P. edulis* (Ruggiero et al., 1996; Meletti & Maia, 1999).

Apesar da grande variabilidade existente neste gênero e de algumas espécies serem consideradas promissoras, os cultivos comerciais baseiam-se em uma única espécie, *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., que é responsável por 95% dos pomares brasileiros (Ruggiero et al., 1996; Meletti & Maia, 1999), com cerca de 44 mil ha plantados com uma produção de 2.661.901 mil frutos, elevando o Brasil à posição de maior produtor mundial (FNP Comércio & Consultoria, 2000). O crescimento médio da área plantada no país situa-se ao redor de 5,3% ao ano, estando a cultura em franca expansão, tendo como principais estados produtores: Pará, Bahia, São Paulo, Minas Gerais e Sergipe (Meletti et al., 2000).

O maracujazeiro ocupa o oitavo lugar entre as frutíferas mais cultivadas no Estado de São Paulo. Em 1994, a região Sudeste foi responsável por 23,5% da produção brasileira de maracujá azedo. Nesta região, a produção cresceu de forma acentuada nos últimos anos, passando de 56,7 mil toneladas em 1988 para 137,3 mil toneladas em 1996, o que corresponde a um incremento da ordem de 142%. Em São Paulo, a produção passou de 12,9 mil toneladas em 1988 para 83,2 mil toneladas em 1996, um aumento de 545%, correspondente a um incremento de 400% na área cultivada com a cultura, atingindo 6.970,1 ha (Piza Junior, 1998).

A produção brasileira de maracujá amarelo tem sido destinada, nos últimos anos, à produção de suco concentrado ao lado da comercialização de frutas *in natura*. A indústria consome cerca de 35% da produção e o mercado de consumo *in natura* os 65% restantes (Rossi, 1998). O suco concentrado de maracujá ocupa o segundo lugar na pauta das exportações brasileiras de sucos de frutas que movimentam um mercado mundial de 5,0 bilhões de dólares/ano. O grande mercado comprador do suco de maracujá brasileiro é a Europa, que absorve mais de 90% das exportações. O mercado internacional de maracujá é considerado emergente, necessitando apenas de uma garantia de continuidade de fornecimento ao longo dos anos (Carraro & Cunha, 1994; Ruggiero et al., 1996).

Apesar da posição de destaque que o Brasil ocupa, a produtividade média nacional é de 22 t/ha, sendo baixa quando comparada à de outras regiões produtoras como, por exemplo, o Havaí com 45 t/ha (Ruggiero et al., 1996). As doenças, notadamente aquelas do sistema radicular, como o definhamento precoce, e as pragas se constituem nos principais problemas dos plantios de maracujá, sendo responsáveis pelo caráter nômade nos cultivos desta *Passifloraceae*. A dificuldade para obtenção de sementes selecionadas, seja em pomares grandes, seja em pequenos, também é outra limitação à expansão da cultura (Oliveira, 1987; Oliveira & Ferreira, 1991).

Oliveira & Ferreira (1991) apontam a falta de um cultivar homogêneo e produtivo, tolerante às principais moléstias, como um entrave à qualidade e à produtividade dos pomares comerciais. Apesar da grande importância da cultura, as variedades de maracujá comercial existentes no Brasil são, em sua maioria, susceptíveis a um grande número de pragas e doenças, além de pouco produtivas. Isso é reflexo da incidência de doenças do sistema radicular e da parte aérea, sendo as mais severas a bacteriose causada por *Xanthomonas* sp. pv. *passiflorae*, a murcha de *Fusarium*, e outra de etiologia desconhecida, o definhamento precoce.

A bacteriose constitui-se na principal doença da parte aérea do maracujazeiro pelos danos que provoca, dificuldade de controle e ocorrência generalizada no Brasil (Oliveira & Ruggiero, 1998). A moléstia manifesta-se, principalmente, nas partes tenras ou suculentas dos tecidos, estendendo-se aos elementos vasculares adjacentes podendo, além de inutilizar os frutos para o consumo, acarretar a destruição total da planta afetada (Teixeira et al., 1994).

Todas as variedades comerciais de maracujá existentes são suscetíveis à bacteriose. A medida de controle de maior importância, atualmente, é a utilização de mudas e sementes sadias. No entanto, em São Paulo, a bacteriose está disseminada em praticamente todas as regiões onde se cultiva comercialmente o maracujazeiro, o que é um entrave para a obtenção de material sadio de propagação (Malavolta Junior, 1998). O controle químico tem sido realizado de maneira preventiva, o que tem elevado o custo de produção além de aumentar os impactos ambientais da monocultura. O desenvolvimento de variedades resistentes é apontada como medida mais efetiva no controle da doença.

O maracujá amarelo é uma espécie alógama, cuja polinização é cruzada e condicionada pelo fenômeno da auto-incompatibilidade (Bruckner, 1997), o que mantém elevado o seu grau de heterozigose (Duvick, 1967). A auto-incompatibilidade ocorre devido à incapacidade do pólen de uma planta em fertilizar as flores da mesma planta. Diferentes plantas podem, ou não, ser compatíveis entre si. A polinização do maracujá requer a presença de diferentes genótipos e de insetos polinizadores, entre os quais as mamangavas são os mais eficientes, ou pode se proceder a polinização manual (Bruckner & Otoni, 1999). Conforme estabeleceram Bruckner et al. (1995), a auto-incompatibilidade do maracujazeiro amarelo é do tipo homomórfica esporofítica, sendo controlada por dois genes, o S (série alélica S_1, S_2, S_3, S_4 e S_5) e outro, cuja expressão precisa ser melhor investigada (Rêgo et al., 1999).

As análises cariotípicas realizadas nas espécies de *Passiflora* indicam a presença de satélites e constrições secundárias. Em *Passiflora edulis*

f. *flavicarpa* Deg. ($2n=2x=18$), foram encontradas constrições secundárias nos pares 8 e 9 (Mayeda & Vieira, 1994; Mayeda, 1997).

Sendo uma planta alógama, vários são os métodos de melhoramento aplicáveis ao maracujazeiro. O melhoramento de plantas alógamas pode ser dirigido visando essencialmente o aumento da freqüência de genes favoráveis que é obtido por métodos de seleção, levando à formação de uma população melhorada, ou pela exploração do vigor híbrido (Paterniani & Miranda Filho, 1987; Bruckner & Otoni, 1999).

Os primeiros estudos visando o melhoramento da cultura no Brasil foram realizados na UNESP/Jaboticabal - SP, no início da década de 70 (Oliveira, 1980). O programa consistia na introdução, seleção massal e hibridação de populações de maracujá amarelo brasileiras e havaianas, visando-se obter um aumento da produtividade, teor de sólidos solúveis, rendimento de suco, dentre outras características de interesse. Segundo Oliveira (1980), a população de maracujá obtida por hibridação foi superior em produção àquela obtida por seleção massal em 11,4% na primeira safra, sendo que a diferença entre as médias de produção do segundo ano não foi significativa.

Oliveira (1980) realizou hibridações sexuais interespecíficas entre a espécie comercialmente cultivada e espécies selvagens visando a introgressão de genes de resistência às principais doenças da cultura. Entretanto, devido a problemas de incompatibilidade entre as espécies, os poucos híbridos interespecíficos obtidos apresentaram baixa fertilidade, mostrando níveis variáveis de esterilidade do pólen, limitando os avanços deste programa de melhoramento (Oliveira & Ferreira, 1991; Vieira, 1997; Otoni, 2000).

Em face às dificuldades encontradas na hibridação sexual interespecífica, a hibridação somática, via fusão de protoplastos, foi uma alternativa encontrada para contornar barreiras de cruzamentos entre espécies sexualmente incompatíveis de *Passiflora*. Híbridos somáticos entre a espécie cultivada *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., e as espécies selvagens *P.*

amethystina Mikan, *P. alata* Dryand, *P. cincinnata* Mast e *P. gibeti* N. E. Brown foram produzidos por Dornelas et al. (1995), e foram avaliados quanto ao seu desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, visando o seu aproveitamento como porta-enxertos ou em esquema de retrocruzamentos (Vieira et al., 1999). Estes híbridos produzidos no Departamento de Genética da ESALQ/USP são únicos no Brasil (Vieira, 1997).

Um outro trabalho foi iniciado em 1986, a partir da seleção de plantas elites provenientes dos pomares comerciais do Triângulo Mineiro, sendo estes materiais denominados como seleção Maguary (Silva, 1998). Segundo Meletti & Maia (1999), o material Maguary, hoje propagado, apesar de apresentar um grande variação, possui como características básicas: plantas muito vigorosas com tolerância à bacteriose e antracnose, produtividade média de 73 Kg por planta, frutos com peso médio de 145 g, rendimento de suco da ordem de 42% e com um teor de sólidos solúveis totais de 14,5°Brix.

Segundo Stenzel & Sera (1999) foi iniciado em 1998 um programa de melhoramento que buscava a obtenção de genótipos superiores de maracujá amarelo adaptados ao Estado do Paraná. A pesquisa encontra-se na fase de introdução e avaliação de cerca de 124 acessos de maracujá amarelo, coletados em pomares comerciais nos Estados de Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo. Na primeira safra, obteve-se peso médio de fruto de 229,1 g, 63,9% de rendimento de suco em relação ao peso total do fruto, e com um teor de sólidos solúveis totais superior a 16°Brix. Estes materiais foram avaliados, sob condições de campo, com base em uma escala de notas de severidade à bacteriose causada por *Xanthomonas* sp. pv. *passiflorae*, que variava de 0 (sem sintoma) a 5 (máximo de sintoma), e mostraram uma grande variabilidade genética, apresentando notas que variaram de 0,4 a 4,8. (Wendland, 1997; Leite Júnior et al., 1999).

Cunha (1999), utilizando populações de maracujá amarelo e maracujá roxo e os métodos de seleção massal estratificada e seleção entre e dentro de famílias de meios irmãos, pretende estudar a eficiência destes

métodos, bem como obter populações melhoradas de alta produtividade e com características agrônômicas desejáveis. Resultados preliminares obtidos na primeira safra indicam que as plantas selecionadas apresentaram o dobro do peso médio de frutos, com elevados teores de sólidos solúveis (32,1%) quando comparadas àquelas não selecionadas.

Conforme descreve Meletti & Maia (1999), teve início em 1991, no Instituto Agrônomo de Campinas, um programa de melhoramento utilizando ciclos de seleção recorrente, visando desenvolver um cultivar homogêneo quanto à qualidade de fruto, com alta produtividade e bem aceito pelos padrões do mercado de frutas frescas. Desse trabalho resultou, inicialmente, um composto conhecido como IAC-27, que é comercializado na região Sudeste e oferece um acréscimo de até 100% na produtividade. Os frutos resultantes correspondem ao padrão 2A e 3A do mercado atacadista de frutas frescas em São Paulo, com mais de 51% de polpa, teor de sólidos solúveis totais superior a 15°Brix, e tendo cerca de 65% dos frutos com peso médio de 180g (Meletti, 1998).

Dando continuidade ao programa, foram obtidos os híbridos 'IAC Série 270' que são constituídos do IAC-273, IAC-275 e IAC-277 que apresentam frutos bastantes semelhantes entre si. Em média, apresentam frutos com 190 g de peso, com teor médio de sólidos solúveis totais de 15,2°Brix e uma produtividade média de 50 t/ha, sob polinização manual complementar (Meletti & Maia, 1999). Estes híbridos constituem a primeira cultivar de maracujá amarelo com origem garantida e já encontram-se disponíveis para os produtores. Recentemente, foram lançados mais três híbridos, IAC-3, IAC-5 e IAC-7, que apresentam, em média, peso de 218 g, teor de sólidos solúveis totais de 15°Brix e 51% de rendimento de polpa. A produtividade média foi de 45 t/ha/ano, com polinização manual auxiliar, resultando em frutos do tipo 2A e 3A (Meletti et al., 2000).

Bruckner (1994) propõe a obtenção de linhagens endogâmicas, o que permitiria a produção de híbridos simples e duplos de maracujá.

Autopolinizações podem ser viabilizadas no estágio de botão, quando a barreira da auto-incompatibilidade ainda não está completamente estabelecida (Bruckner & Otoni, 1999). Bruckner et al. (1995) obteve 29,6% de autofecundação no estágio de botão.

Diversos estudos foram conduzidos para definir protocolos de cultura de tecidos com o objetivo de introduzir e clonar *in vitro* algumas espécies de *Passiflora* (Dornelas & Vieira, 1994; Otoni et al., 1996; Passos, 1999). Em substituição às técnicas de estaquia, o domínio dos protocolos de cultura *in vitro* permite a clonagem rápida de plantas inteiras e isentas de pragas e doenças. Em ensaios de melhoramento, quando se avalia caracteres com média ou baixa herdabilidade, a multiplicação imediata das plantas permite a clonagem dos genótipos avaliados, possibilitando uma melhor estimativa dos parâmetros genéticos.

A utilização de marcadores moleculares em *Passiflora* restringe-se a estudos de diversidade genética (Fajardo et al., 1998), não havendo relatos na literatura do emprego dessas técnicas para auxiliar os programas de melhoramento genético de maracujá.

Apesar dos resultados obtidos nos programas de melhoramento e na utilização de métodos biotecnológicos descritos anteriormente, a cultura do maracujazeiro necessita de mais estudos com o objetivo de aumentar a produtividade nacional, melhorando a qualidade de frutos tanto para a indústria como o consumo *in natura* e, principalmente, para buscar genótipos que sejam resistentes ou tolerantes às principais doenças da cultura. Um aspecto importante é a utilização de marcadores moleculares para melhor caracterizar a ampla variabilidade genética existente na espécie, bem como para construção de mapas genéticos que podem permitir a localização de genes de interesse, o que viria auxiliar o melhoramento genético da cultura.

2.2 Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares, ao contrário dos marcadores fenotípicos, são abundantes nos genomas vegetais e não sofrem influência ambiental, revelando diretamente os polimorfismos de sequências de DNA. Estes polimorfismos de DNA são detectados devido à ocorrência de alterações no tamanho dos fragmentos produzidos por enzimas de restrição (RFLPs) ou pela amplificação (em seguida, ou não, à uma etapa de restrição) de fragmentos do DNA por reação em cadeia da polimerase (RAPDs, AFLPs, Microsatélites, SCARs) (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Joshi et al., 1999; Fungaro & Vieira, 2001).

Os RAPDs, dentre os marcadores baseados na PCR, são facilmente obtidos para qualquer espécie, não carecendo de informações prévias do organismo para a construção de “primers” específicos, podendo ser utilizados aqueles disponíveis no mercado.

Os RAPDs foram concebidos independentemente por três grupos de pesquisadores nos Estados Unidos (Williams et al., 1990; Welsh & McClelland, 1990; Caetano-Anollés et al., 1991a) e estão entre os marcadores mais empregados em análises genéticas. Baseiam-se na utilização de pequenos oligonucleotídeos (cerca de 10 pb) de DNA de fita simples, chamados de “primers”, que apresentam uma sequência contendo de 50 a 80% de C+G (Williams et al., 1990). Além dos “primers”, a enzima Taq polimerase (Saiki et al., 1988), isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus*, é outro elemento indispensável nesta técnica.

O fundamento da técnica consiste em misturar oligonucleotídeos de sequência arbitrária com o DNA genômico, na presença da Taq polymerase, dNTPs e tampão apropriado. Submete-se a mistura a ciclos de temperatura em termociclador por período pré-determinado. A quantidade e o tamanho dos produtos da reação dependem da complementaridade entre a sequência dos

oligonucleotídeos e do DNA molde, da distância entre os oligonucleotídeos e das condições de reação (Williams et al., 1990).

Os segmentos amplificados são separados por meio de eletroforese, utilizando géis de agarose corados com brometo de etídeo e observados sob luz ultravioleta (Welsh & McClelland, 1990; Williams et al., 1990; Ferreira & Grattapaglia, 1996). Como alternativas para visualização dos produtos de amplificação podem ser utilizados também géis de poliacrilamida, corados com nitrato de prata (Hollingsworth et al., 1998).

A natureza molecular do polimorfismo de RAPD não é inteiramente conhecida (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Entretanto, evidências experimentais indicam que diferenças de apenas um par de bases (mutações de ponto) são suficientes para causar a não complementaridade do "primer" com o sítio de iniciação ("priming site") e assim impedir a amplificação do segmento (Williams et al., 1990; Caetano-Anollés et al., 1991b). Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções, inserções ou translocações, colocando dois sítios de iniciação adjacentes a uma distância superior àquela que a DNA polimerase é capaz de percorrer (Williams et al., 1990; Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Os marcadores RAPD são dominantes visto que a presença de uma determinada banda não determina se o loco correspondente é homozigótico (AA) ou heterozigótico (Aa) (Williams et al., 1990). Assim, o polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Fungaro & Vieira, 2001).

Os marcadores RAPDs têm sido amplamente utilizados na geração de mapas de genéticos vegetais (Eujay et al., 1998; Pal et al., 1998; Chowdhury & Slinkard, 1999; Debener & Mattiesch, 1999; Kalo et al., 2000). Conforme salientam Liu (1998) e Grattapaglia & Sederoff (1994), apesar de serem marcadores dominantes, fornecem a mesma quantidade de informação genética que os codominantes, quando utilizados em populações de mapeamento de

retrocruzamento, de linhagens duplo-haplóides e na estratégia de mapeamento "pseudo-testcross".

2.3 Mapas genéticos em plantas

Com a redescoberta simultânea dos trabalhos de Mendel, no final do século XIX, que propôs as leis básicas da hereditariedade, por Hugo de Vries, Carl Correns e Erick von Tschermak-Seysenegg, inúmeros trabalhos foram realizados no sentido de esclarecer o mecanismo básico de herança dos caracteres biológicos. Estes trabalhos culminaram com a formulação da *Teoria Cromossômica da Herança* por Walter Sutton e T. Boveri, em 1902, que estabeleceu a relação entre os cromossomos e os fatores mendelianos (genes), segundo a qual, os cromossomos são elementos celulares portadores dos genes. No mesmo ano, Bateson, Saunders e Punnet, trabalhando com ervilhas doces, demonstraram que as segregações dos caracteres cor de flor e formato do pólen não ocorriam de forma independente (veja Lander & Weinberg, 2000).

Assim como Bateson, Saunders e Punnet, Morgan e seus colaboradores (Bridges, Muller e Sturtevant), em 1910, em estudos com *Drosophila melanogaster* encontraram resultados que desviaram da segunda lei proposta por Mendel. Morgan sugeriu, então, que alguns genes poderiam estar situados no mesmo par de cromossomos homólogos, e que durante a meiose, ocasionalmente, existiria troca física de parte desses segmentos cromossômicos ("crossing-over"). A pressuposição da ocorrência de quiasmas corroborava os resultados genéticos encontrados por Morgan. Este autor percebeu, ainda, que a proporção da progênie recombinante variava bastante, e propôs que estas variações, de algum modo, refletiam a distância real que separa os genes nos cromossomos. Em 1913, Sturtevant interpretando dados de "crossing-over" entre genes ligados sugeriu o uso da porcentagem de recombinantes como indicador quantitativo de distância linear entre dois genes na construção de mapas de genéticos. Estes mapas demonstravam que a

posição dos genes poderia corresponder a uma ordem linear nos cromossomos, e aperfeiçoaram a teoria cromossômica da herança, incluindo o conceito de localização dos genes em uma ordem linear em cada cromossomo (Gardner & Snustad, 1986; Griffiths et al., 1998).

O mapeamento genético rapidamente se tornou uma poderosa ferramenta para os geneticistas, embora a prova definitiva da associação entre os mapas de ligação e cromossomos tenha vindo mais tarde, com estudos feitos por Barbara McClintock em cromossomos de milho. Creighton & McClintock (1931), demonstraram que o "crossing-over" é o resultado de uma troca de segmentos cromossômicos.

Os primeiros mapas genéticos eram baseados em marcadores morfológicos e citológicos. Estes últimos, foram originados pela obtenção de estoques cromossômicos, gerados por alterações cromossômicas (como aneuploidias, translocações, deleções e inversões), principalmente em culturas como milho, tomate e ervilha (Coe et al., 1988; Rick & Yoder, 1988).

Em espécies cujo cariótipo é bem conhecido é possível localizar em qual cromossomo situam-se determinados genes, relacionando alterações cromossômicas com alterações fenotípicas. Por exemplo, em trigo, fumo, tomate e milho foram analisadas as características de linhagens portadoras de monossomias ou trissomias para cada um de seus cromossomos e assim um grande número de genes pôde ser localizado. Esta análise pode ser refinada utilizando-se aberrações que afetam apenas uma parte do cromossomo, como a ausência de um dos braços ou uma duplicação de um pequeno segmento (Guerra, 1988).

Em 1928, Lesley cruzando plantas diplóides e triplóides obteve a primeira série de trissômicos em tomate. Com base nestes trissômicos, Lesley foi pioneiro no mapeamento genético em tomate. Ele atribuiu sete mutantes, sendo quatro no cromossomo A (cromossomo 2), e outros três em diferentes cromossomos. Mais de 1200 mutantes têm sido descritos, e desses pelo menos 400 têm sido localizados nos seus respectivos cromossomos, e suas distâncias

de ligação já estão estabelecidas (Quiros, 2001). A coleção de estoques cromossômicos de tomate é mantida pelo "National Plant Germplasm System" e pelo "Tomato Genetics Stock Center" ambos nos Estados Unidos (Ricker & Yoker, 1988).

Apesar da importância dos estoques cromossômicos em estudos de genéticos, estes são restritos às espécies que apresentam um grande conhecimento citológico (e.g., milho, trigo, tomate, ervilha, aveia). Uma outra limitação é de que eles não permitem estudos de caracteres cuja herança é quantitativa. Embora o uso de estoques cromossômicos apresentem limitações, continuam sendo utilizados nas espécies vegetais de maior importância econômica, como os cereais (Scanlon et al., 1994; Seo & Peterson, 1995; Cheng et al., 2000; Dubcovsky et al., 2000; Seah et al., 2000) e tomate (Frary et al., 1996) para atribuição de genes, bem como para localizar regiões centroméricas.

Marcadores morfológicos também têm sido utilizados na construção de mapas genéticos, sendo estes associados a fenótipos de fácil identificação, como nanismo, deficiência clorofítica, cor de pétala e morfologia foliar (Coe et al., 1988; Ricker & Yoker, 1988). Entretanto, o pequeno número de marcadores morfológicos em uma mesma linhagem reduz a chance de encontrar associações significativas entre estes marcadores e caracteres de importância, o que limita seu emprego em programas de melhoramento (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Liu, 1998).

No início do década de 60, surgiram as isoenzimas (Markert & Moller, 1959), marcadores bioquímicos que permitem a construção de mapas genéticos, potencialmente, em todas as espécies de plantas (Garvin & Weeden, 1994). Estes marcadores foram extensivamente utilizados em milho, trigo, tomate, dentre outras espécies vegetais, antes do surgimento dos marcadores baseados em polimorfismos de DNA. No entanto, o número total de locos detectados é muito baixo, o que restringe seu uso pois

conduz a uma cobertura restrita do genoma (Ricker & Yoker, 1988; Ferreira & Grattapaglia, 1996; Liu, 1998).

A partir da década de 80, com o surgimento das análises de DNA, o mapeamento genético se tornou, efetivamente, ilimitado para todas as espécies (Bostein et al., 1980). Mapas genéticos que levaram décadas para serem desenvolvidos devido à restrita disponibilidade de marcadores morfológicos e isoenzimáticos, foram amplamente saturados com o uso de marcadores moleculares, como em tomate (Tanksley et al., 1992; Draye et al., 2001). Várias espécies para as quais nem sequer ligação gênica entre qualquer tipo de marcador havia sido anteriormente descrita, tiveram mapas genéticos rapidamente desenvolvidos (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

2.3.1 Princípios básicos da construção de mapas de ligação

A grande disponibilidade de marcadores genéticos neutros, altamente polimórficos, cuja herança pode ser acompanhada sem influência do ambiente, aliada a procedimentos estatísticos complexos, tem permitido a construção de mapas de ligação para praticamente todas as espécies vegetais, inclusive, para aquelas de longo ciclo de vida, como as florestais e fruteiras (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

A construção de mapas de ligação está baseada na análise de segregação de centenas de marcadores e, por isso, tem sido amplamente computadorizada. Programas como "Mapmaker" (Lander et al., 1987), "Gmendel" (Liu & Knapp, 1992), "Linkage 1" (Suiter et al., 1983), entre muitos outros, foram desenvolvidos para auxiliar na análise genética dos dados visando a construção de mapas genéticos, e estão disponíveis na internet (<http://linkage.rockefeller.edu/>).

Aspectos importantes devem ser considerados na construção de uma mapa genético, a saber:

(a) seleção da população mais apropriada

A seleção da população para o mapeamento genético envolve a escolha de genitores e a determinação do delineamento genético a ser utilizado, sendo considerada uma etapa crítica para o sucesso da construção do mapa (Staub et al., 1996; Liu, 1998). No entanto, independentemente desta escolha, duas condições básicas devem ser atendidas: o máximo de polimorfismo entre os genitores, e que sejam produzidas gerações em que os locos estejam em desequilíbrio de ligação (Paterson et al., 1991; Tanksley, 1993; Liu, 1998).

Os genitores escolhidos para mapeamento devem ser contrastantes (inclusive quanto à expressão fenotípica para caracteres de interesse), já que o número de marcas no mapa representa o número de caracteres contrastantes nos genitores. Em casos em que o polimorfismo é baixo, pode-se realizar cruzamentos interespecíficos, de modo a permitir um maior número de locos informativos (Tanksley et al., 1992). No entanto, como salientam Staub et al. (1996) a supressão de recombinação entre genomas distantes e a ocorrência de alelos deletérios podem provocar distorções das proporções mendelianas esperadas na descendência, quebrando as premissas assumidas na análise estatística e afetando o cálculo da distância e a ordem dos marcadores nos grupos de ligação.

As gerações oriundas de retrocruzamentos, da F_2 , dos cruzamentos entre indivíduos heterozigóticos e de linhagens duplo-haplóides são os delineamentos genéticos mais utilizados na construção de mapas de ligação (Tanksley, 1993; Liu, 1998; Lynch & Walsh, 1998). Conforme salienta Coelho (2000), determinados genótipos (e. g., indivíduos F_2) são portadores de dois gametas informativos, enquanto em outros delineamentos genéticos (e.g., retrocruzamento), cada indivíduo carrega somente um gameta informativo, sendo o outro complemento não informativo. Assim, de modo aproximado, um indivíduo F_2 fornece duas

vezes mais informações do que um indivíduo oriundo de uma geração de retrocruzamento. Esta relação é aproximada dado que nem todos os genótipos F_2 são informativos (Paterson et al., 1991; Liu, 1998).

A escolha do tipo de população mais apropriada ao mapeamento está relacionada com o tipo de marcador empregado (Tanksley et al., 1988a). O máximo de informação genética alcançada, quando combinados estes dois aspectos, ocorre quando se usa uma população F_2 e marcadores codominantes (Staub et al., 1996).

O desequilíbrio de ligação entre os locos segregantes deve ser atribuído ao desequilíbrio da ligação física entre os locos, que é originado do desequilíbrio gamético de ligação, decorrente da redução da frequência de recombinação entre genes situados em regiões próximas ao longo de determinado cromossomo (Weir, 1996; Liu 1998; Coelho 2000). Cabe ressaltar, que o desequilíbrio não deve ser causado por seleção ou deriva genética. O desequilíbrio de ligação devido à ligação física dos locos atinge seu ponto máximo nas populações derivadas de cruzamentos controlados e, como consequência, a capacidade de se detectar a ligação entre dois locos fisicamente ligados também é máxima (Tanksley, 1993; Liu, 1998).

O número de genótipos identificados estabelece o nível máximo de resolução que pode ser alcançado com número ilimitado de marcadores no mapa genético. Assim, frequências de recombinação abaixo de 10% só podem ser obtidas pela avaliação de mais de 10 gametas passíveis de recombinação e, portanto, informativos (Coelho, 2000).

(b) tipo de marcador genético a ser utilizado

Os marcadores moleculares representam um recurso muito útil em análises genéticas. Existe um grande número de mapas genéticos disponíveis tanto para espécies animais com vegetais e um número crescente de genes tem sido detectado com auxílio de desses mapas. Vários tipos de marcadores

podem ser utilizados (por exemplo, isoenzimas, RFLPs, RAPDs, AFLPs e microssatélites) na construção de mapas, sendo que estes diferem em alguns aspectos, tais como: número de locos que pode ser detectado, graus de polimorfismo entre e dentro de acessos e características de dominância (Maliepaard et al., 1997; Joshi et al., 1999). Coelho (2000) ressalta que é importante considerar o conteúdo informativo dos marcadores de natureza codominante (RFLPs e SSRs) em relação aos marcadores dominantes (RAPDs e AFLPs), além de aspectos como custo, tempo necessário para a realização das avaliações e dificuldades práticas inerentes à execução de cada técnica.

A influência do número de marcadores genéticos está relacionada ao quanto da resolução pré-estabelecida pelo número de genótipos identificados será de fato realizada. Tanto o grau de cobertura do genoma quando a densidade do mapa a ser construído são funções diretas do número de marcadores (Liu, 1998; Coelho, 2000). Liu (1998) e Lynch & Walsh (1998) apresentam procedimentos estatísticos para estimar o número adequado de marcadores na construção de mapas genéticos.

(c) teste de distorção mendeliana

Como já mencionado, a construção de um mapa genético é feita com dados oriundos de algum tipo de delineamento, como por exemplo, de retrocruzamento, da geração F_2 , entre outros. Em cada um destes delineamentos espera-se um padrão mendeliano típico, que é pressuposto nos modelos probabilísticos (Bearzoti, 2000). A ausência de padrão mendeliano é chamada distorção mendeliana, sendo causada, por exemplo, pelo efeito de amostragem ou viabilidade diferencial de gametas (Liu, 1998). O critério mais imediato de verificação da distorção mendeliana é o teste de aderência de qui-quadrado, cuja hipótese H_0 , não admite a ocorrência de distorções (Fregene et al., 1997; Lespinasse et al., 2000).

Segundo Liu (1998) os locos que apresentam distorção mendeliana afetam os testes estatísticos usados para detectar a ligação podendo gerar falsos positivos. É recomendado, preferencialmente, o descarte dos locos que apresentam distorções na segregação mendeliana para não comprometer a qualidade do mapa (Liu, 1998; Yao et al., 1999; Bearzoti, 2000). Na construção do mapa de ligação de *Cryptomeria japonica* 50% dos marcadores apresentaram desvios na segregação esperada, não sendo utilizados nas análises de ligação. Os autores atribuíram este resultado à sobreposição de fragmentos de AFLP, de tamanhos bastante semelhantes, o que provavelmente dificultou a sua correta identificação (Nikaido et al., 2000). Outra possibilidade discutida, foi a grande presença de genes letais relatada em *Cryptomeria japonica*, sugerido que algumas das regiões analisadas no mapeamento poderiam estar associadas a esses genes letais, explicando as distorções encontradas.

No entanto, é relatado na literatura o uso de marcadores com distorções mendelianas na construção de mapas de ligação (Kubisiak et al., 1995; Conner et al., 1997; Van Heusden et al., 2000). Barreneche et al. (1998) encontraram que 20% do total de marcadores analisados apresentavam desvios da proporção esperada, e verificaram ainda, que estes marcadores não se distribuíram ao acaso no genoma de *Quercus robur*, tendendo a se concentrar, preferencialmente, em pequenos agrupamentos nos grupos de ligação. Esta tendência encontrada pelos autores foi observada em outros trabalhos, como em *Allium roylei* (Van Heusden et al., 2000) e em *Malus domestica* (Conner et al., 1997).

(d) cálculo da frequência de recombinação entre cada par de marcadores e funções de mapeamento

A mensuração da frequência de gametas recombinantes entre dois locos representa o procedimento básico a partir do qual o mapeamento é realizado (Staub et al., 1996).

Diversos procedimentos estatísticos podem ser usados para estimar a frequência de recombinantes entre dois locos, dentre eles, o método dos momentos, o método dos quadrados mínimos e o da máxima verossimilhança. De modo geral, pelo método dos momentos obtém-se os parâmetros igualando-se os valores observados às suas expectativas em termos de esperanças matemáticas. Pelo método dos quadrados mínimos obtém-se as estimativas para os parâmetros de modo que a soma de quadrados dos desvios entre os valores observados e os estimados seja mínima, enquanto pelo método de máxima verossimilhança obtém-se as estimativas para os parâmetros de modo que os valores observados representem o caso mais provável de ocorrência (Liu, 1998; Weir, 1996).

Embora a frequência de recombinantes indique a medida de distância entre dois locos ao longo de determinado cromossomo, o ideal é que as distâncias usadas na construção de mapas genéticos sejam totalmente aditivas, de modo que ao adicionar novos locos (marcadores) ao mapa, não seja necessário ajustar as distâncias já estabelecidas. Entretanto, as frequências de recombinação não são aditivas e, portanto, são inadequadas como medida direta de distâncias entre dois locos a serem utilizadas nos mapas de ligação (Staub et al., 1996; Liu, 1998; Lynch & Walsh, 1998).

Para ilustrar essa questão, Lynch & Walsh (1998) tomam como exemplo três locos, que supostamente estão na ordem A, B e C, cujas probabilidades de ocorrência de recombinação entre eles é de r_{AB} , r_{AC} e r_{BC} . Sendo assim, a probabilidade de ocorrência de recombinação corresponde à probabilidade de ocorrência de um número ímpar de "crossing-overs" entre dois

genes, enquanto $(1-r)$ indica a probabilidade de ocorrência de um número par (inclusive zero) de "crossing-overs" entre os dois genes. Desta forma, existem duas maneiras de haver um número ímpar de permutações no fragmento A-C: quando se tem um número ímpar de "crossing-overs" no fragmento A-B e par no fragmento B-C, ou quando se tem um número par em A-B e ímpar em B-C. Admitindo-se que as ocorrências de permuta são eventos independentes entre si (ausência de interferência), tem-se, utilizando as regras básicas de probabilidade, que:

$$r_{AC} = r_{AB} (1 - r_{BC}) + (1 - r_{AB}) r_{BC} \quad (1)$$

Manipulando-se esta expressão, tem-se que:

$$r_{AC} = r_{AB} + r_{BC} - 2 r_{AB} r_{BC} \quad (2)$$

Esta expressão (2) é conhecida como fórmula de Trow (1913) que demonstra o caráter não aditivo das freqüências de recombinação. Obviamente, em casos em que o segmento cromossômico é pequeno, as freqüências de recombinação podem ser consideradas aditivas, desde que os valores de r_1 e r_2 sejam pequenos, de modo que o produto $r_1.r_2$ torna-se desprezível (Liu, 1998; Lynch & Walsh, 1998).

Segundo Bailey (1961) uma unidade de medida de distância que é, ao mesmo tempo, função da freqüência de recombinantes e possui caráter aditivo, é o número de eventos de recombinação que ocorrem entre dois locos (marcadores) em uma geração. De acordo com Weir (1996), uma unidade de medida de distância genética de mapa é definida como sendo a distância entre dois locos ao longo da qual se espera que ocorra um "crossing-over" por gameta, por geração. Esta medida é denominada de Morgan (M), sendo normalmente expressa em centiMorgans (cM).

Para estabelecer a relação entre as distâncias genéticas entre dois locos no mapa e a frequência de gametas recombinantes foram criadas as funções de mapeamento (Liu, 1998; Lynch & Walsh, 1998).

Um grande número de funções de mapeamento têm sido desenvolvidas (Haldane, 1919; Kosambi, 1944; Carter & Falconer, 1951; Rao et al., 1977; Felsenstein, 1979; Karlin, 1982), sendo que as funções de Haldane (1919) e Kosambi (1944) são as mais utilizadas no mapeamento genético de vegetais (Staub et al., 1996).

A função de Haldane admite que a ocorrência de "crossing-overs" se dá de modo independente (ausência de interferência) e seguindo uma distribuição de Poisson (Liu, 1998).

A função de Kosambi, ao contrário da de Haldane, admite a possibilidade de que a ocorrência de pontos de permuta não sejam eventos independentes (presença de interferência). Sendo assim, a função de Kosambi assume a interferência completa entre regiões arbitrariamente próximas, sendo esta interferência decrescente para locos mais distantes e igual a zero para locos independentes (Weir, 1996; Liu, 1998).

Outro aspecto importante, é que não existe uma correlação entre distância física (número de pares de base) com a distância de mapa. Ou seja, existem regiões cromossômicas de apenas algumas dezenas de milhares de pares de bases (distância física pequena) onde a probabilidade de recombinação é alta (regiões alvos de recombinação – "hotspot"). Ao mesmo tempo, há regiões de alguns milhões de pares de bases (distância física grande) onde a recombinação é praticamente suprimida, em que a distância entre os genes presentes é mínima (e.g., regiões centroméricas e teloméricas) (Tanksley et al., 1992; Ferreira & Grattapaglia, 1996; Jiang et al., 1997; Saliba-Colombani et al., 2000).

(e) estabelecimento dos grupos de ligação

Do ponto de vista biológico, os grupos de ligação são definidos como grupos de genes (marcadores) cujos locos estão localizados no mesmo cromossomo. Estatisticamente, grupo de ligação pode ser definido como um grupo de locos que são herdados juntos, com base em certos critérios estatísticos (Liu, 1998).

Conforme discutem Grattapaglia & Sederoff (1994) o estabelecimento dos grupos de ligação deve ser feito com o "LOD SCORE" variando entre 4 a 6. Quando existe um grande número de marcadores, LODs com valores baixos (menores que 4) podem ocasionar ligações espúrias, enquanto que o aumento nos valores de LODs (acima de 6) poderia resultar na fragmentação dos grupos de ligação.

Para separar os grupos de ligação, são feitos testes considerando duas marcas (locos) de cada vez, admitindo a hipótese de que a frequência entre ambas é igual a 0,5 (H_0 : segregação independente). Vários procedimentos estatísticos são usados para detectar a ligação (desequilíbrio de ligação), sendo os mais comuns a máxima verossimilhança e o teste de aderência de qui-quadrado (Liu, 1998; Bearzoti, 2000).

Para demonstrar que dois locos estão ligados pode-se utilizar as razões de verossimilhança em que no numerador é disposta a função de verossimilhança considerando $r = 0,5$ (ausência de ligação) e, no denominador, a função que possui a estimativa de máxima verossimilhança de r . Para facilitar a interpretação, esta razão é colocada no logaritmo com base 10, sendo este termo definido com "LOD SCORE". Assim, por exemplo, um LOD igual a 3 indica que a ocorrência de ligação é mil vezes mais provável do que a de segregação independente (Bearzoti, 2000).

O teste de qui-quadrado se baseia na comparação das frequências observadas das diversas classes genóticas com aquelas esperadas sob a condição de segregação independente entre os locos. Este teste permite a

estimativa da probabilidade de ocorrência dos desvios, dada a condição de independência. Normalmente, se utiliza como ponto crítico para a rejeição da hipótese de independência (H_0), o nível de 5% de probabilidade. Isto significa, rejeitar H_0 e, portanto, assumir que os locos não estão segregando independentemente, quando a probabilidade de ocorrência dos desvios encontrados, dada a condição de independência, for menor do que 5%. (Liu, 1998; Bearzoti, 2000).

(f) determinação da ordem de cada marcador dentro do seu grupo de ligação

Uma vez conhecidas as frações de recombinação entre cada par de marcadores e já discriminados os grupos de ligação, deve-se então, determinar a melhor ordem para os marcadores dentro de cada grupo de ligação.

Weir (1996) descreve a idéia básica para ordenação envolvendo três locos, A, B, e C, através da soma dos coeficientes de recombinação adjacentes (*sar* – “*sum of adjacent recombination coefficients*”). Este processo propõe que a ordem correta entre os locos seja a aquela que possibilite o mínimo valor de “*sar*”. Este valor sob a ordem incorreta será sempre maior que sob a ordem correta. Este método pode ser empregado para qualquer número de locos.

No entanto, um dos problemas no uso dos valores obtidos pelo critério “*sar*” para se determinar a ordem correta ocorrem quando a análise envolve um número muito grande de locos. O número de ordens possíveis para m locos é igual a $m!/2$. Sendo assim, se tivermos $m=30$ teremos $1,3263 \times 10^{32}$ combinações possíveis. Desta forma, este procedimento é considerado impraticável, sendo necessário outros métodos de ordenação que apresentem princípios alternativos (Weir, 1996; Liu, 1998).

Existem várias metodologias para este propósito: (i) delineação rápida em cadeia (Doerge, 1996), (ii) seriação (Buetow & Chakravarti, 1987a, 1987b), (iii) anelamento simulado (Kirkpatrick et al. 1983) e (iv) ramos e conexões (Thompson, 1987).

2.4 Estratégia de mapeamento “pseudo-testcross”

Tradicionalmente, a construção de mapas genéticos envolve o uso de linhagens homozigóticas e gerações de autofecundação e retrocruzamento, as quais, em alguns casos, não são facilmente obtidas em função da forte depressão endogâmica e devido a problemas de auto-incompatibilidade (Ritter et al., 1990; Grattapaglia & Sederoff, 1994; Hemmat et al., 1994; Maliepaard et al., 1997; Simone et al., 1997). No entanto, o cruzamento simples entre plantas altamente heterozigóticas abre a possibilidade de se gerar mapas genéticos para quaisquer espécies sem necessidade de se produzir populações clássicas de mapeamento (e.g. F₂, retrocruzamento, linhagens puras recombinantes, dentre outras) (Ritter et al., 1990; Maliepaard et al., 1997).

Uma das alternativas consideradas mais rápidas e simples é a estratégia de mapeamento “pseudo-testcross”, em que as análises são conduzidas separadamente para cada genitor (Ritter et al., 1990; Carlson et al., 1991; Grattapaglia & Sederoff, 1994; Maliepaard et al., 1997). Ritter et al. (1990), estudando clones auto-incompatíveis de batata, descrevem o procedimento teórico para análise de ligação entre marcadores RFLP segregantes, em cruzamentos entre indivíduos altamente heterozigóticos. Carlson et al. (1991) e Grattapaglia & Sederoff (1994), usando o mesmo procedimento com marcadores dominantes, sugeriram a ampla aplicabilidade desta metodologia para espécies frutíferas, florestais e não domesticadas.

Um fator de complicação das análises de ligação para esta estratégia é que, na maioria das vezes, a fase de ligação é não conhecida *a priori*, enquanto o conhecimento da fase é requerido para detecção dos eventos de recombinação.

Quando a fase de ligação não pode ser inferida com base nos avós, o procedimento aplicado é estimar as frequências de recombinação para as fases de repulsão e de associação, e escolher aquela em que a estimativa da frequência de recombinação seja menor que 0,5, levando em consideração a significância do “LOD SCORE” utilizado nas análises (Maliepaard et al., 1997).

A denominação “pseudo-testcross” decorre do fato da configuração do cruzamento não ser conhecida *à priori*, como em um cruzamento-teste clássico, e sim ser inferida *à posteriori*, após análise da segregação. Como esta inferência é feita para ambos genitores envolvidos, são gerados dois mapas individuais e o termo mais apropriado é duplo “pseudo-testcross” (“two-way pseudo-testcross”) (Grattapaglia & Sederoff, 1994; Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Esta estratégia é conceitualmente simples e pode ser aplicada com qualquer tipo de marcador molecular. A configuração “pseudo-testcross” aliada ao RAPD permite o mapeamento genético de qualquer espécie de fecundação cruzada, com “pedigrees” simples, sem necessidade de informação genética prévia, além de dois genitores e uma progênie (Grattapaglia & Sederoff, 1994). A falta de codominância dos RAPDs não constitui desvantagem na construção de mapas de ligação em genitores altamente heterozigóticos (Carlsón et al., 1991; Hemmat et al., 1994; Kubisiak et al., 1995; Dalbó et al., 2000).

Espera-se, pelo fato de um genitor ser heterozigótico para o loco de RAPD e outro apresentar fenótipo nulo (ausência da banda), que a progênie F_1 mostre segregação 1:1, semelhante ao que se observa na progênie de um cruzamento-teste.

A seleção dos vários oligonucleotídeos que detectam polimorfismo entre os genitores e na população segregante, representada por uma amostra de poucos indivíduos F_1 , é feita, previamente, à análise do conjunto de indivíduos. A eficiência dessa estratégia é diretamente proporcional ao nível de heterozigosidade da espécie e da distância genética entre os indivíduos cruzados. Nos cruzamentos interespecíficos, praticamente todo “primer” revela um marcador em configuração “pseudo-testcross”, freqüentemente vários em um mesmo gel são visualizados

(Grattapaglia & Sederoff, 1994; Verhaegen & Plomoin, 1996; Dalbó et al., 2000). Em cruzamentos intraespecíficos, a chance de encontrar polimorfismo é menor e pode ser aumentada à medida que os genitores escolhidos sejam geneticamente divergentes e provenientes de regiões geográficas distintas (Carlsón et al., 1991; Hemmat et al., 1994).

Resultados sugerem que altos níveis de heterozigosidade em populações F_1 são frequentemente encontrados em espécies perenes e autoincompatíveis (Hemmat et al., 1994; Simone et al., 1997).

2.5 Aplicações dos mapas de ligação em plantas

O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética de espécies, e, potencialmente, no melhoramento de plantas (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Lee, 1995). Diante desses avanços, procedimentos como a localização e mapeamento de QTL's, estudos de sintenia e clonagem de genes baseada em mapas genéticos, passaram a representar alternativas importantes a serem consideradas em programas de melhoramento das mais variadas espécies vegetais (Lee, 1995).

Uma das mais importantes aplicações dos mapas genéticos é a localização de genes que controlam características de importância econômica, como, produção de grãos, altura da planta, teor de proteína, resistência a doenças, que resultam da ação cumulativa de um conjunto de genes (Liu, 1998). Estas características são denominadas poligênicas, quantitativas ou de herança complexa, e os locos que as controlam são chamados de QTL's ("Quantitative Trait Loci") (Tanksley, 1993).

A ligação entre uma característica qualitativa e uma quantitativa foi primeiramente demonstrada por Sax (1923). No entanto, os fundamentos da teoria do mapeamento de QTL só foram entendidos a partir do trabalho de Thoday (1961). Este autor sugeriu que se um oligogene (herança complexa) estiver ligado

a um monogene (herança simples), os efeitos fenotípicos do oligogene podem ser indiretamente estudados com base nos efeitos do gene vizinho. Com o advento dos marcadores moleculares, foi ampliado significativamente o número de associações entre esses marcadores e caracteres de herança oligênica, de importância econômica. O grande número de marcadores distribuídos pelo genoma permite uma amostragem mais completa na busca de ligação gênica entre o marcador e o loco de interesse (Tanksley, 1993).

A determinação de ligação genética entre marcadores e os QTL's depende da existência de desequilíbrio de ligação entre os alelos do loco marcador e os alelos do QTL (Falconer & Mackay, 1996). A maioria das estratégias de mapeamento de QTL's está baseada no uso de populações segregantes tradicionalmente utilizadas na construção de mapas genéticos. Os genitores destas populações devem apresentar fenótipos extremos em relação à característica quantitativa de interesse. A capacidade de detecção de QTL é função da magnitude do seu efeito sobre a característica, do tamanho da população segregante avaliada, da frequência de recombinação entre o marcador e o QTL, bem como da herdabilidade da característica (Paterson et al., 1991; Tanksley, 1993).

O mapeamento do QTL permite a sua localização física no genoma, quantificação e caracterização de seus efeitos, como interações alélicas (e. g., o grau de dominância), e mesmo de interações epistáticas ou pleiotrópicas. Estudos mais completos permitem a detecção e a decomposição da interação genótipos por ambientes ao nível de cada QTL (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Diversos métodos têm sido desenvolvidos para a localização de QTL's, entre eles, mapeamento por intervalo (Lander & Botstein, 1989), mapeamento por intervalo composto (Zeng, 1993, 1994; Jansen, 1993) e mapeamento multiponto (Kearsey & Hyne, 1994).

Os estudos de QTL's têm permitido importantes contribuições na área da fitopatologia (Schuster et al., 2001) no sentido de aumentar a eficiência dos programas de melhoramento, possibilitando a seleção precoce de genótipos

resistentes, além de permitir o desenvolvimento de uma nova classe de marcadores, os chamados marcadores homólogos à genes de resistência (Camargo, 2000).

O mapeamento comparativo (“comparative mapping” ou “synteny mapping”) constitui-se em outra importante aplicação dos mapas genéticos. A comparação das estruturas genômicas de diferentes espécies, do ponto de vista de homologia de genes e conservação de distâncias e da ordem de ligação nos cromossomos, permite uma melhor compreensão da evolução dos genomas (Tanksley et al., 1988b; Kianian & Quiros, 1992; Ahn & Tanksley, 1993; Keller & Feuillet, 2000). Uma outra utilização do mapeamento comparativo é como estratégia de obtenção de um mapa único de referência para a maioria das espécies vegetais cultivadas (Moore et al., 1995; Sewell et al., 1999), pelo menos ao nível de famílias taxonômicas.

Paterson et al. (1995) identificaram um pequeno número de QTL's presentes em sorgo, arroz e milho associados à produção de sementes grandes e independência do florescimento às condições de fotoperíodo, e concluíram que estes QTL's transcenderam a 65 milhões de anos de evolução e ao isolamento reprodutivo destas espécies.

Moore et al. (1995) demonstraram a existência de homologia entre genomas (sintenia) encontrada em espécies distintas como trigo, milho, sorgo, cana-de-açúcar, milheto e arroz, e sugeriram a construção de um mapa consenso para uma provável espécie ancestral das gramíneas.

Pan et al. (2000) estudando a homologia dos genes de resistência “R” em batata, tomate e outros membros da família Solanacea, verificaram que estes conservam a sua posição nas espécies. No entanto, para *Arabidopsis*, uma outra espécie dicotiledônea, não observou-se homologia, sugerindo uma rápida evolução desses genes durante a disrupção das famílias de plantas.

A clonagem de genes baseada em mapas genéticos (“map-based cloning” e “positional cloning”) se constitui na mais audaciosa aplicação dos mapas genéticos.

Nesta abordagem, o efeito fenotípico do gene é verificado anteriormente através da avaliação da característica de interesse na progênie e sua posição cromossômica aproximada é determinada através do mapeamento. Este mapeamento detalhado de alta resolução consiste em identificar marcadores próximos a um gene, sendo que esta resolução depende do número de marcadores, como também da disponibilidade de um grande número de indivíduos na progênie, o que aumenta a probabilidade de se encontrar eventos de recombinação no segmento de interesse (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Liu, 1998).

Segundo Lynch e Wash (1998), uma grande limitação na realização da clonagem baseada em mapeamento está no tamanho do fragmento de DNA que deve ser seqüenciado, mesmo quando a posição do gene de interesse está delimitada por dois marcadores tão próximos quanto 1 cM. Esses autores, ressaltam que para se construir um mapa em que as distâncias entre os marcadores se situem entre 0,1 cM e 0,01 cM seriam necessários de 3.000 a 30.000 indivíduos, respectivamente. Como salientam Tanksley et al. (1995), as espécies apresentam mais de 1 bilhão de pares de bases. Em trigo, por exemplo, estima-se que há 16 bilhões de pares de bases, o que torna a procura por um gene uma difícil e árdua tarefa.

Conforme ressalta Lee (1995) a falta de linearidade entre as distâncias de mapa e as distâncias físicas é outro aspecto importante, pois esta relação interfere no sucesso ou não da clonagem de genes por mapeamento, via "chromosome walking" implicando no exaustivo seqüenciamento de segmentos muito longos, sem interesse. Segundo o autor, a razão *número de pares de bases/centiMorgan* pode variar em até 1.000 vezes entre diferentes regiões do genoma, além do que a distribuição da recombinação dentro dos genomas é aparentemente não aleatória ao longo dos cromossomos, com uma tendência de ser mais freqüente em regiões distais e menos freqüente em regiões centroméricas. Apesar das dificuldades encontradas na clonagem baseada em mapas genéticos, há alguns exemplos descritos na literatura: Martin et al (1993) e Fray et al. (2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção da população segregante

Para obtenção da população segregante foi realizado um cruzamento simples entre dois acessos de *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. pertencentes ao Lote de Introdução e Seleção de Materiais do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Londrina-PR, quais sejam:

(a) Acesso 123 que faz parte da seleção Maguary, apresentando excelentes características agrônômicas, principalmente aquelas voltadas ao processamento industrial (teor de sólidos solúveis totais, acidez e rendimento de suco), além de ser resistente à *Xanthomonas* sp. pv. *passiflorae*, agente causal da bacteriose do maracujazeiro. Este acesso foi utilizado como genitor feminino (Figura 1A).

(b) Acesso 06 que é uma introdução do Marrocos, apresentando características agrônômicas inferiores às do acesso 123 e susceptível à bacteriose (Figura 1B).

Polinizações manuais controladas entre os dois acessos foram realizadas durante os meses de novembro e dezembro de 1997. Flores de cada genitor foram cobertas com sacos de papel (12 x 8 cm) cerca de duas horas antes da abertura, que ocorre por volta das 14 horas. Depois da antese, as anteras contendo o pólen do genitor masculino (acesso 06) foram cortadas (Figura 1C) e levadas para as flores do genitor feminino onde foram passadas sobre o estigma. Após este procedimento, estas flores foram etiquetadas,

indicando os acessos genitores e a data da realização dos cruzamentos (Figura 1D), e novamente ensacadas para assegurar que não houvesse contaminação por outros pólenes.

Figura 1 - *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg: acesso 123 (A), acesso 06 (B), retirada das anteras contendo o pólen do genitor masculino (C), e fruto proveniente do cruzamento entre os acessos 123 e 06 (D).

Os frutos foram coletados 70 dias após as polinizações. A retirada das sementes foi feita com o auxílio de um liquidificador, conforme descrito por Lima et al. (1994). Este procedimento foi realizado individualmente para todos os frutos obtidos. Em seguida, as sementes provenientes de cada fruto foram secas à sombra e armazenadas em refrigerador a 10°C, de acordo com Lima et al. (1994) e Ruggiero et al. (1996).

Estacas dos genitores de aproximadamente 15 cm foram coletadas e plantadas em copos plásticos de 300 mL contendo substrato apropriado (Plantmax®). Após 60 dias do plantio, novas estacas foram retiradas propiciando a clonagem e manutenção dos acessos.

3.2 Germinação das sementes

Uma amostra de 150 sementes tomadas ao acaso de diferentes frutos do cruzamento entre os acessos 123 e 06 foram germinadas *in vitro*, no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, do Departamento de Genética da ESALQ/USP, Piracicaba - SP.

As sementes foram esterilizadas e cultivadas conforme protocolo estabelecido por Dornelas & Vieira (1994). Inicialmente, as sementes foram escarificadas com ácido sulfúrico concentrado durante 2 min. Em seguida, sob condições assépticas, foram embebidas em etanol 70% (v/v) por 40 segundos, lavadas quatro vezes em água destilada e autoclavada, a seguir imersas em solução de NaOCl 2% durante 10 min, e então lavadas seis vezes em água destilada e autoclavada.

As sementes foram inoculadas *in vitro* em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo a metade da concentração original de sais e compostos orgânicos, na ausência de luz e sob temperatura de 28°C. Do total de sementes inoculadas, foram utilizadas 90 plântulas visando a construção do mapa de ligação.

3.3 Extração do DNA genômico

O DNA total foi extraído utilizando o método CTAB descrito por Murray & Thompson (1980), com modificações. Folhas frescas foram lavadas individualmente com água destilada antes de iniciar o processo de extração de DNA.

Foram utilizados, aproximadamente, 250 mg de tecido fresco de cada planta. Após a maceração em nitrogênio líquido, o material foi colocado em eppendorfs de 2 mL, contendo 1 mL do tampão de extração CTAB previamente aquecido a 65°C. O material foi homogeneizado com auxílio de uma espátula, e mantido a 65°C por 30 min, em banho-maria, com agitações brandas e periódicas. Após a retirada dos eppendorfs do banho maria, acrescentou-se uma mistura de 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), que foi homogeneizada por inversões dos tubos.

As amostras foram centrifugadas por 15 min a 14000 rpm em microcentrífuga Eppendorf, recuperando-se 700 µL do sobrenadante, os quais foram transferidos para novos tubos de 2 mL. Para a precipitação do DNA, acrescentou-se 520 µL de isopropanol, invertendo-se cuidadosamente os tubos, que foram mantidos por 30 min à temperatura ambiente. O DNA precipitado foi recuperado por meio de centrifugação a 10000 rpm (10 min). O isopropanol foi descartado e os resíduos foram removidos passando-se uma espátula envolvida em papel Kleenex® dentro de cada tubo.

Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução de lavagem nos tubos, deixando o DNA em imersão por 30 min. A solução de lavagem foi descartada e os resíduos foram eliminados repetindo-se o procedimento adotado para a eliminação do isopropanol.

Acrescentou-se 100 µL de tampão TE aos eppendorfs, os quais permaneceram à temperatura de aproximadamente 4°C por cerca de 2 horas, até a ressuspensão completa do DNA. O DNA foi novamente precipitado acrescentando-se 50 µL de acetato de NH₄ (7,5 M) e 375 µL de etanol absoluto. O conteúdo do tubo foi misturado por inversões suaves e o DNA precipitado foi recuperado através de centrifugação por 15 min a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e uma última lavagem foi realizada adicionando-se 500µL de etanol 70% durante 20 min. O etanol foi descartado e os resíduos foram

eliminados. Finalmente, o DNA de cada planta foi ressuspendido em 100 μ L de tampão TE.

3.4 Quantificação do DNA

A quantificação foi realizada após eletroforese (3 V/cm) de alíquotas de cada amostra, comparando-as com uma série de concentrações conhecidas do DNA (20, 40, 60, 80 a 100 ng) do fago lambda (Gibco-BRL), realizadas em géis de agarose a 0,8% (p/v). A concentração de DNA foi estimada a partir da comparação visual da intensidade das bandas, reveladas pela coloração com brometo de etídeo (0,5 μ g/mL). Diluições de 30 ng/ μ L foram feitas e novas alíquotas foram submetidas à eletroforese, para confirmar as concentrações previamente determinadas.

3.5 Reação de RAPD

As reações foram realizadas em termociclador PCR Express Hybaid (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as condições descritas por Vieira et al. (1997), com modificações. As reações de amplificação foram feitas em volume de 25 μ L contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 3,0 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de "primers" (Operon Technologies, USA), 0,2 mM de cada dNTP (Amersham Pharmacia Biotech), 30 ng de DNA molde e 0,3 unidades de Taq polimerase (Gibco-BRL). Estas foram submetidas a 45 ciclos de amplificação após desnaturação inicial a 94°C por 5 min. Cada ciclo térmico foi constituído de 1 min a 94°C, 1 min a 35°C e 2 min a 72°C. Os ciclos foram seguidos de uma extensão final de 6 min a 72°C.

Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese (3 V/cm) em géis de agarose 1,4% (p/v) utilizando o tampão de corrida TEB 1X. Como marcador de peso molecular utilizou-se o padrão de 100 bp Ladder (Gibco-BRL ou Amersham Pharmacia Biotech). Os géis foram corados com

brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados e fotografados sob luz UV em equipamento de fotodocumentação (Geldoc - Bio Rad).

3.6 Seleção dos “primers”

Um total de 380 primers (Kits A, AA, AB, AC, AD, AE, AF, B, C, D, E, G, H, I, J, M, N, R, T) foi avaliado comparando-se o perfil dos dois genitores e de uma amostra de seis indivíduos da população segregante, com intenção de selecionar marcadores polimórficos para configuração “pseudo-testcross”. Esta configuração se caracteriza pela presença da banda (marcador) somente em um dos genitores, e também, em pelo menos em um dos seis indivíduos da progênie, sendo este loco de RAPD classificado como provável heterozigótico para aquele genitor.

Para minimizar possíveis erros experimentais foram usadas duas concentrações de DNA (30 e 15 ng) nas reações de amplificação para cada “primer”. Foram selecionados os “primers” cujo polimorfismo de bandas esteve presente em ambas as concentrações. Os géis que mostraram variação entre os genitores foram repetidos, visando confirmar a ocorrência de polimorfismo.

3.7 Construção do mapa de ligação

A construção do mapa de ligação foi baseada na estratégia de duplo “pseudo-testcross” (Grattapaglia & Sederoff, 1994).

Com base nos oligonucleotídeos pré-selecionados, os marcadores polimórficos foram avaliados segundo a presença ou ausência de bandas em uma amostra de 90 indivíduos que constituíram a população segregante. Nos casos em que não foi possível identificar o genótipo molecular de um determinado indivíduo da progênie, este loco foi considerado como dado perdido.

Para cada loco marcador foi adotado o teste de aderência de χ^2 quadrado, ao nível de 5% de significância com grau de liberdade igual a 1, para verificar a hipótese nula (H_0) de segregação mendeliana, cuja proporção esperada é de 1:1. Os locos que apresentaram distorções da segregação mendeliana foram excluídos das análises de mapeamento.

Dois conjuntos de dados foram obtidos e analisados separadamente. O primeiro conjunto incluiu os locos heterozigóticos para o acesso 123 enquanto o segundo conjunto, aqueles locos heterozigóticos para o acesso 06. A presença da banda foi indicada por H (heterozigótico) enquanto a ausência por A (homozigótico).

A ligação entre os marcadores foi determinada usando o programa "Mapmaker" PC versão 3.0 (Lander et al., 1987). Para permitir a detecção de ligação entre marcadores RAPD em fase de repulsão, cada conjunto de dados foi duplicado, e novo conjunto foi recodificado, de modo que os locos que foram designados como "H" no conjunto original, passaram a ser indicados como "A", e vice-versa. Os marcadores na fase de associação (ou acoplamento) foram indicados por "+", enquanto os marcadores em repulsão foram identificados por "-" (Grattapaglia & Sederoff, 1994).

Os grupos de ligação foram estabelecidos com o comando "two point/group" com LOD > 4,0 e à uma frequência máxima de recombinação $\theta = 0,30$. A ordem dos marcadores nos grupos de ligação foi estabelecida em duas etapas:

(a) primeiramente, por meio do comando "multipoint/order" e adotando como critério o LOD $\geq 3,0$, foi estabelecida a melhor ordem para os marcadores. Em seguida, para confirmar a ordenação do conjunto de marcadores, foi empregado o comando "multipoint/ripple" (LOD > 2).

(b) na segunda etapa, novos marcadores foram adicionados através do comando "multipoint/try" usando o LOD > 2. A ordem final do conjunto de marcadores nos grupos de ligação foi confirmada com "multipoint/ripple" (LOD > 2).

Marcadores que não foram ordenados com igual confiança foram colocados como “acessórios” e indicados ao lado dos grupos de ligação, por meio do comando “multipoint/place”.

A função “error detection” do “Mapmaker” foi empregada para verificar potenciais erros na identificação dos genótipos. As frações de recombinação foram convertidas em valores de distâncias de mapa pela função Kosambi (Kosambi, 1944).

Para se referir a um produto polimórfico amplificado foi utilizada a denominação descrita por Grattapaglia & Sederoff (1994). Por exemplo: o marcador AB01_1689 corresponde ao fragmento de RAPD amplificado pelo oligonucleotídeo AB01, cujo tamanho do fragmento é de 1689 pb. O peso molecular do fragmento foi determinado a partir de uma equação de regressão, obtida com base nas distâncias de migração dos fragmentos do DNA Ladder 100 pb, sendo que os valores foram arredondados.

O tamanho do genoma foi estimado de acordo com o método do Hulbert et al. (1988), levando em consideração apenas os marcadores que se localizaram dentro dos grupos de ligação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção da população segregante e germinação das sementes

Das 22 flores polinizadas, apenas uma não originou frutos. Plantas normais com brotações vigorosas, bem enraizadas (Figura 2), foram obtidas de 80% das sementes germinadas *in vitro*, semelhantes ao valor encontrado por Faria & Segura (1997). Não houve perdas nos transplantes das plântulas para vasos na casa de vegetação.

Figura 2 - Plântula de maracujá amarelo obtida do cruzamento entre os acessos 123 e 06.

4.2 Seleção de “primers”

A avaliação inicial do nível de polimorfismo, objetivando a seleção dos “primers”, foi realizada utilizando-se os dois genitores (acesso 123 e acesso 06) e seis indivíduos da progênie (Figura 3).

Observou-se um total de 3428 produtos de amplificação, perfazendo uma média de 9,0 bandas por “primer”. Cerca de 70,4% das bandas tiveram seu peso molecular variando entre 500 a 1500 pb. Os fragmentos de tamanho máximo e mínimo mostraram 163 pb e 2960 pb, respectivamente.

Dos 380 “primers” avaliados, 14 (3,7%) não revelaram qualquer produto de amplificação, 253 (66,6%) apresentaram-se monomórficos na progênie e 113 (29,7%) revelaram pelo menos um loco polimórfico na configuração de “pseudo-testcross”. Os “Kits” G, N, E, H e AB apresentaram os maiores números de produtos amplificados, os quais correspondem a 30% do total de fragmentos (Tabela 1).

Os “primers” AA05, AA19, AE20, AD07, AF01, B15, G01, G20, N05, R15, R18, AC16, AC18 e H10 não revelaram nenhum produto de amplificação. Certos “primers” não apresentam complementariedade no genoma, e têm sido normalmente relatados nos estudos de construção de mapas genéticos, como em *Saccharum spontaneum* (Al-Janabi et al., 1993), *Eucalyptus* spp. (Grattapaglia & Sederoff, 1994) e *Citrus* spp. (Cristofani et al., 1999), cuja ocorrência foi de 8,6%, 18,7% e 22,5%, respectivamente.

Figura 3 - Detecção de polimorfismo: os primers OPA01 (A), OPAB12 (B) e OPH14 (C) foram utilizados para amplificação do DNA genômico dos acessos 123 (1) e 06 (2) e de uma amostra de seis indivíduos da população segregante. Marcadores polimórficos estão indicados com setas. M = 100 pb Ladder (Amersham Pharmacia Biotech ou Gibco/BRL), marcador de peso molecular.

Tabela 1. “Kits” comercializados pela Operon Technologies (Alameda, Califórnia, EUA) contendo 20 “primers” cada, número de produtos amplificados (bandas) por conjunto, e o número médio de bandas por “primer”.

Kits de “primers”	Número de produtos amplificados	Número médio de bandas/“primer”
A	171	8,55
AA	163	8,15
AB	204	10,20
AC	164	8,20
AE	155	7,75
AD	151	7,55
AF	153	7,65
B	188	9,40
C	167	8,35
D	156	7,80
E	209	10,45
G	222	11,10
H	207	10,35
I	180	9,00
J	180	9,00
M	192	9,60
N	219	10,95
R	171	8,55
T	176	8,80
Total	3428	9,02

Os 113 “primers” selecionados revelaram um total de 269 locos polimórficos com configuração “pseudo-testcross” (segregação 1:1), sendo que 148 locos mostraram-se heterozigóticos no acesso 123 e, os outros 121, no acesso 06. O número de marcadores por “primer” selecionado foi 2,38. Este número foi alto em relação ao encontrado em outros trabalhos que utilizaram a estratégia “pseudo-testcross” em cruzamentos intraespecíficos, como 1,60 em *Stevia rebaudiana* (Yao et al., 2000), 1,88 em *Saccharum spontaneum* (Al-Janabi et al., 1993) e 1,33 em *Manihot esculenta* (Gomez et al., 1996). No entanto, os valores aqui encontrados foram menores aos relatados em cruzamentos interespecíficos usando essa mesma estratégia: 3,69

marcadores/"primer" em *Eucalyptus* spp. (Grattapaglia & Sederoff, 1994) e 5,6 em *Vitis* spp. (Dalbó et al., 2000). Este resultado já era esperado pois a estratégia de "pseudo-testcross" é mais eficiente em cruzamentos interespecíficos, visto que os genitores são mais distantes geneticamente e, praticamente, todo primer revela um marcador polimórfico (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Verhaegen & Plomoin, 1996).

O nível de heterozigosidade encontrado nos acessos 123 e 06 foi de 54% (145/269) e 45% (121/269), respectivamente. Em populações de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. espera-se um alto grau de heterozigosidade pelo fato da espécie ser alógama, na qual a polinização cruzada é condicionada pelo fenômeno da auto-incompatibilidade. Este aspecto favorece o uso da estratégia de "pseudo-testcross" em maracujazeiro pois sua eficiência é diretamente proporcional ao nível de heterozigosidade da espécie e da distância genética entre os indivíduos cruzados.

Em estudos similares sobre mapeamento genético, se têm encontrado valores altos de heterozigosidade nos genitores, como em *Malus* spp. (65 e 44%, Hemmat et al., 1994) e em *Pinus* spp. (56 e 44%, Kubisiak et al., 1995). Esses resultados sugerem que altos níveis de heterozigosidade estão presentes em espécies de ciclo longo (perenes) (Carlson et al., 1991; Kubisiak et al., 1995) e auto-incompatíveis (Hemmat et al. 1994; Crouzillat et al., 1996).

4.3 Construção dos mapas de ligação

Uma amostra de 90 indivíduos da população segregante, em comparação ao perfil dos genitores, foi avaliada na presença dos "primers" selecionados para permitir as análises de ligação (Figura 4). O perfil de bandas encontrado na etapa de seleção de "primers" foi confirmado para todos os marcadores. Isto pode ser atribuído ao uso duas concentrações de DNA, o que possibilitou a eliminação de bandas espúrias.

Figura 4 - Perfil de RAPD dos genitores, acessos 123 (1) e 06 (2), e de uma amostra 90 indivíduos da população segregante. Marcadores polimórficos estão indicados com setas. M = 100 pb Ladder (Amersham Pharmacia Biotech), marcador de peso molecular.

Dos 24.748 dados gerados para construção do mapa de ligação dos dois acessos de maracujá amarelo, apenas 64 (0,26%) foram considerados perdidos. A exemplo de que vem sendo descrito na literatura (Marques et al., 1998; Tanksley et al., 1992), isto se deve a genótipos com avaliação duvidosa, sendo preferível desconsiderar aquele loco naquele indivíduo, do que introduzir possíveis erros. Segundo Weir (1996), os erros na avaliação de genótipos podem produzir eventos de recombinação falsos, tendendo a tornar os mapas genéticos mais amplos. O programa "Mapmaker" realiza as análises de ligação na presença de dados perdidos (Lincoln et al., 1992).

A análise de qui-quadrado (Tabelas 2 e 3) revelou que 14 (5,2%) dos marcadores mostraram distorções da proporção esperada de 1:1 ($\alpha=0,05$; GL=1). Desvios na segregação mendeliana têm sido discutidos nos estudos de mapeamento genético, sendo, na maioria dos casos, relacionados a causas biológicas, como seleção pré e pós zigótica (Cai et al., 1994; Echt et al., 1994; Conner et al., 1997) e rearranjos cromossômicos (Tanksley, 1984). No conjunto de dados analisados, dado um valor de $\alpha=0,05$ e considerando um total de 269 marcadores, o valor esperado de marcas que apresentem distorções de segregação é igual a 13,45. Como os valores referentes às proporções esperadas e observadas foi similar, os desvios encontrados podem ser atribuídos a variações amostrais. Como é relatado na literatura, na maioria das vezes, são baixos os níveis de distorção da segregação em cruzamentos intraespecíficos comparados a cruzamentos interespecíficos. (Becker et al., 1995; Menéndez et al., 1997). Os marcadores que mostraram desvios da segregação mendeliana não foram usados nas análises de ligação.

Tabela 2. Segregação dos marcadores RAPD no acesso 123, representados por um código que contém a denominação do "primer" e o respectivo peso molecular (pb), valores absolutos observados na progênie e valores do teste de χ^2 ($\alpha = 0,05$, 1GL).

Código do marcador	Valor observado na progênie + -	χ^2	Código do marcador	Valor observado na progênie + -	χ^2	Código do marcador	Valor observado na progênie + -	χ^2
A19_1130	42 48	0,30	AA09_1053	46 44	0,03	AC10_1108	46 44	0,03
A18_937	41 49	0,53	AA08_682	47 43	0,13	AC08_1297	50 40	0,83
A16_1381	36 54	2,70	AA08_1053	46 44	0,03	AC06_337	47 43	0,13
A16_1580	46 44	0,03	AA07_1085	43 46	0,07	AC06_914	49 41	0,53
A12_1462	43 47	0,13	AA07_1330	41 49	0,53	AC06_1297	49 41	0,53
A12_163	45 45	0,00	AA03_1019	43 47	0,13	B20_652	48 42	0,30
A09_747	39 51	1,20	AB18_471	47 43	0,13	B20_734	47 43	0,13
A07_521	44 46	0,03	AB12_1794	46 44	0,03	B20_1227	44 46	0,03
A07_694	48 42	0,30	AB12_672	46 44	0,03	B20_1420	49 41	0,53
A05_790	47 43	0,13	AB05_1948	47 43	0,13	B20_1721	46 44	0,03
A05_1233	48 42	0,30	AB05_673	50 40	0,83	B20_2242	46 44	0,03
A04_794	50 40	0,83	AB05_1220	43 47	0,13	B18_944	41 49	0,53
A04_1055	39 51	1,20	AB01_2960	36 54	2,70	B08_729	51 39	1,20
A01_2247	49 41	0,53	AB01_1689	38 52	1,63	B08_566	43 47	0,13
AA12_1270	49 41	0,53	AB01_1815	50 40	0,83	B04_1433	39 51	1,20

(*) marcadores com distorções das proporções esperadas (1:1)

(+) presença da banda (-) ausência da banda

Tabela 2. Segregação dos marcadores RAPD no acesso 123, representados por um código que contém a denominação do “primer” e o respectivo peso molecular (pb), valores absolutos observados na progênie e valores do teste de χ^2 ($\alpha = 0,05$, 1GL).

Código do marcador	Valor observado na progênie + -	χ^2	Código do marcador	Valor observado na progênie + -	χ^2	Código do marcador	Valor observado na progênie + -	χ^2
E18_324	45 45	0,00	G08_567	44 46	0,03	I01_689	43 47	0,13
E18_900	48 42	0,30	G07_1363	50 34	2,99	I01_1039	46 40	0,57
E17_559	43 47	0,13	G06_630	42 48	0,30	I01_1219	47 43	0,13
E17_963	46 44	0,03	G05_1525	43 47	0,13	J15_967	46 44	0,03
E14_1376	43 47	0,13	G03_1794	47 43	0,13	J13_1500	45 45	0,00
E09_673	42 48	0,30	G03_1188	43 47	0,13	J10_1614	42 48	0,30
E09_795	45 45	0,00	H19_746	45 45	0,00	J10_1007	48 42	0,30
E03_834	46 44	0,03	H14_993	43 47	0,13	J06_2649	49 41	0,53
E01_805	41 49	0,53	H11_1062	45 44	0,02	J06_1197	38 52	1,63
G18_1517	51 39	1,20	H08_882	43 47	0,13	J06_1171	46 44	0,03
G15_1423	48 42	0,30	H05_1958	42 48	0,30	A11_1129	48 42	0,30
G15_2203	50 40	0,83	I19_992	44 44	0,03	A11_698	50 40	0,83
G09_1072	43 47	0,13	I18_1769	48 42	0,30	A16_964	38 52	1,63
G09_1353	40 50	0,83	I07_376	44 46	0,03	B02_1145	45 45	0,00
G09_1433	39 51	1,20	I05_1290	43 47	0,13	E02_1054	50 40	0,83

(*) marcadores com distorções das proporções esperadas (1:1)
(+) presença da banda (-) ausência da banda

Tabela 2. Segregação dos marcadores RAPD no acesso 123, representados por um código que contém a denominação do “primer” e o respectivo peso molecular (pb), valores absolutos observados na progênie e valores do teste de χ^2 ($\alpha = 0,05$, 1GL).

Código do marcador	Valor observado na progênie + -	χ^2	Código do marcador	Valor observado na progênie + -	χ^2	Código do marcador	Valor observado na progênie + -	χ^2
E06_1535	43 44	0,07	N10_674	37 53	2,13	N14_455	44 46	0,03
E06_1190	41 46	0,21	N19_935	45 45	0,00	N15_365	43 47	0,13
E06_852	49 41	0,53	N19_855	45 45	0,00	M02_1135	37 53	2,13
C07_1303	46 44	0,03	T01_1593	45 44	0,02	T16_763	48 42	0,30
C07_441	47 43	0,13	T01_836	48 42	0,30	AC20_799	49 41	0,53
C07_1122	46 44	0,03	T14_694	42 48	0,30	AA01_484	50 40	0,83
C12_1298	45 45	0,00	T14_489	47 43	0,13	AA10_941	51 39	1,20
I10_1502	38 52	1,63	T18_806	49 40	0,74	A10_450	43 47	0,13
I04_1366	40 43	0,39	C15_1116	45 45	0,00	A10_1000	45 45	0,00
N02_450	45 45	0,00	AE05_793	48 42	0,30	D03_859	48 42	0,30
N02_645	42 48	0,30	R10_545	46 44	0,03	D01_1281	45 45	0,00
N02_1383	44 46	0,03	R10_911	46 44	0,03	D01_1881	45 45	0,00
N02_1474	46 44	0,03	R04_811	37 53	2,13	N18_588	51 39	1,20
N02_753	49 41	0,53	R02_505	45 45	0,00	AE18_748	45 45	0,00
N10_987	42 48	0,30	N03_964	50 40	0,83	AF07_1176	45 41	0,36

(*) marcadores com distorções das proporções esperadas (1:1)

(+) presença da banda (-) ausência da banda

Tabela 2. Segregação dos marcadores RAPD no acesso 123, representados por um código que contém a denominação do "primer" e o respectivo peso molecular (pb), valores absolutos observados na progênie e valores do teste de χ^2 ($\alpha = 0,05$, 1GL).

Código do marcador	Valor observado na progênie + -	χ^2	Código do marcador	Valor observado na progênie + -	χ^2
AF07_650	46 44	0,03	D14_678	57 33	6,40*
R09_429	48 42	0,30	A02_1563	59 31	8,71*
R17_736	48 42	0,30	A03_892	56 34	5,38*
D16_1252	36 54	2,70	A06_1256	33 57	6,40*
D16_392	45 45	0,00			
J18_950	50 40	0,83			
J17_1071	50 39	1,08			
AA11_1072	49 41	0,53			
AD04_849	44 46	0,03			
AD04_642	43 47	0,13			
AB01_1953	21 69	25,60*			
AB08_1108	22 67	21,51*			
C01_480	31 59	8,71*			
J13_1003	20 70	17,78*			
J20_682	34 56	5,38*			

(*) marcadores com distorções das proporções esperadas (1:1)

(+) presença da banda (-) ausência da banda

Tabela 3. Segregação dos marcadores RAPD no acesso O6, representados por um código que contém a denominação do “primer” e o respectivo peso molecular (pb), valores absolutos observados na progénie e valores do teste de χ^2 ($\alpha = 0,05$, 1GL).

Código do marcador	Valor observado na progénie + -	χ^2	Código do marcador	Valor observado na progénie + -	χ^2	Código do marcador	Valor observado na progénie + -	χ^2
A12_1668	45	0,00	AB05_765	44	0,04	B20_1591	42	0,40
A09_1321	50	1,11	AB04_1357	46	0,04	B08_1017	47	0,18
A07_915	49	0,71	AB01_876	48	0,40	B08_1527	43	0,18
A04_1542	50	1,11	AB01_2277	43	0,18	E18_1094	48	0,40
A04_1734	50	1,11	AC10_1400	50	1,11	E17_509	47	0,18
AA09_334	46	0,04	AC10_503	49	0,71	E17_1604	40	1,11
AA08_1182	39	1,60	AC09_1145	46	0,04	E17_1815	45	0,00
AA07_1263	40	1,11	AC09_760	44	0,04	E14_725	54	3,60
AA07_1961	46	0,04	AC09_968	46	0,04	E14_1288	54	3,60
AA04_1386	44	0,04	AC06_366	52	2,18	E08_1314	49	0,71
AA03_531	39	1,60	AC06_1063	40	1,11	E03_1103	44	0,04
AA03_1308	38	2,18	AC06_1509	51	1,60	G07_2034	45	0,00
AB14_2013	46	0,04	B20_1183	53	2,84	G07_2169	47	0,18
AB08_882	51	1,60	B20_953	46	0,04	G07_959	49	0,71
AB08_953	46	0,04	B20_823	47	0,18	G05_1068	39	1,60

(*) marcadores com distorções das proporções esperadas (1:1)

(+) presença da banda (-) ausência da banda

Tabela 3. Segregação dos marcadores RAPD no acesso 06, representados por um código que contém a denominação do “primer” e o respectivo peso molecular (pb), valores absolutos observados na progênie e valores do teste de χ^2 ($\alpha = 0,05$, 1GL).

Código do marcador	Valor observado na progênie + -	χ^2	Código do marcador	Valor observado na progênie + -	χ^2	Código do marcador	Valor observado na progênie + -	χ^2
G03_1500	36 54	3,60	J06_467	41 49	0,71	N10_1476	48 42	0,40
H19_1139	44 46	0,04	J06_734	50 40	1,11	N19_1545	43 47	0,18
H19_691	51 39	1,60	E09_533	53 37	2,84	N19_1387	43 47	0,18
H19_1391	42 48	0,40	G03_2329	38 52	2,18	T01_327	49 41	0,71
H14_1704	53 37	2,84	A16_2405	47 43	0,18	T09_1593	46 44	0,04
H09_1100	41 49	0,71	E02_1486	45 45	0,00	T09_589	46 44	0,04
H08_1165	52 38	2,18	E02_489	42 48	0,40	T14_1122	49 41	0,71
H05_1165	53 37	2,84	C07_641	46 44	0,04	T18_305	48 42	0,40
H03_1280	44 46	0,04	C12_674	42 48	0,40	T18_989	42 48	0,40
I19_478	46 44	0,04	H17_1107	47 43	0,18	T19_1192	47 43	0,18
I08_788	42 48	0,40	H17_974	41 49	0,71	T19_219	37 53	2,84
I18_388	47 43	0,18	I10_1090	49 41	0,71	T19_138	51 39	1,60
I18_1017	50 40	1,11	J11_921	47 43	0,18	C15_458	47 43	0,18
I01_335	43 47	0,18	J11_573	42 48	0,40	C15_412	45 45	0,00
J15_1502	46 44	0,04	N02_1571	51 39	1,60	C15_758	46 44	0,04

(*) marcadores com distorções das proporções esperadas (1:1)

(+) presença da banda (-) ausência da banda

Tabela 3. Segregação dos marcadores RAPD no acesso 06, representados por um código que contém a denominação do "primer" e o respectivo peso molecular (pb), valores absolutos observados na progênie e valores do teste de χ^2 ($\alpha = 0,05$, 1GL).

Código do marcador	Valor observado na progênie + -	χ^2	Código do marcador	Valor observado na progênie + -	χ^2	Código do marcador	Valor observado na progênie + -	χ^2
R01_321	44 46	0,04	D01_604	42 48	0,40	R03_472	35 55	4,44*
R04_860	50 40	1,11	AE18_1107	41 49	0,71			
R02_763	44 46	0,04	AE18_454	46 44	0,04			
N03_911	47 43	0,18	B07_893	42 48	0,40			
N03_628	46 44	0,04	R09_467	54 36	3,60			
N14_321	45 45	0,00	R17_1579	43 47	0,18			
N15_545	41 49	0,71	D15_938	44 46	0,04			
M04_545	41 49	0,71	D16_988	43 47	0,18			
M04_628	46 44	0,04	J18_471	42 48	0,40			
M02_429	39 51	1,60	A13_806	51 39	1,60			
M02_1076	48 42	0,40	A10_893	31 59	8,71*			
AE05_2386	50 40	1,11	C07_360	57 33	6,40*			
A10_611	45 45	0,00	H05_341	33 57	6,40*			
D03_425	42 48	0,40	H09_782	60 30	10,00*			
D01_1196	46 44	0,04	N18_1211	56 34	5,38*			

(*) marcadores com distorções das proporções esperadas (1:1)

(+) presença da banda (-) ausência da banda

(a) Acesso 123: mapa de ligação

Dos 140 locos heterozigóticos revelados para o acesso 123 e utilizados nas análises de ligação, cinco não foram atribuídos a nenhum dos grupos de ligação (marcadores não ligados): A07_694; AA08_682; B18_944; E09_795 e AC20_799.

Um total de 135 marcadores foi usado para estabelecer o mapa do acesso 123 (Figura 5). Aproximadamente 48,1% destes (65 locos) foram atribuídos aos grupos de ligação sendo gerados nove grupos com um comprimento total de 728 cM. Os tamanhos individuais variaram de 56,0 a 144,6 cM, apresentando uma média de $80,9 \pm 25,8$ (Tabela 4). O comprimento total do genoma, utilizando-se o método de Hulbert (1988), foi estimado em 1195,6 cM.

Tabela 4. Número de marcadores RAPD e comprimento em centimorgans (cM) de cada grupo de ligação do mapa de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., acesso 123.

Grupo de ligação	Número de marcadores	Comprimento (cM)
1	11	144,6
2	9	84,2
3	11	83,6
4	6	81,6
5	6	75,9
6	7	71,8
7	5	67,8
8	7	62,5
9	3	56,0
Total	65	728

Figura 5- Mapa genético de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. acesso 123 (grupos 1 a 4). As relações de ligação dos 135 marcadores RAPD foram estabelecidas com LOD 4,0 e $\theta = 0,3$. Os grupos de ligação foram compostos de 65 marcas e ordenadas com LOD > 2,0. Marcadores não ordenados foram considerados como acessórios e listados à direita dos grupos de ligação.

Figura 5 - Mapa genético de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. acesso 123 (grupos 5 a 9). As relações de ligação dos 135 marcadores RAPD foram estabelecidas com LOD 4,0 e $\theta = 0,3$. Os grupos de ligação foram compostos de 65 marcas e ordenadas com LOD > 2,0. Marcadores ordenados foram considerados como acessórios e listados à direita dos grupos de ligação.

A distância média entre dois marcadores foi de 11,2 cM. Aproximadamente 15% dos intervalos nos grupos de ligação foi superior a 25 cM, sendo 33 e 0 cM a maior e a menor distância encontrada, respectivamente.

A distribuição dos marcadores RAPD não foi uniforme nos grupos de ligação (Figura 6). Aproximadamente 57% das marcas concentram-se nos grupos de ligação 1, 2 e 3, que juntos correspondem a 43% do comprimento total do mapa (Tabela 4). Observou-se co-segregação de 17 marcadores (12,6%), sendo quatro numa só região do grupo de ligação 3 e 6 marcas no grupo de ligação 9 (Figura 5).

Foi observado a formação de um pequeno agrupamento ("cluster") de marcadores no grupo 3 (Figura 5). A baixa taxa de recombinação sugere que esta região pode estar associada ao centrômero ou a outras regiões de DNA repetitivo. Esta sugestão deve ser tomada com cautela, visto que para estabelecer a relação entre regiões cromossômicas e taxa de recombinação seria necessário estabelecer a associação entre os mapas físico e genético. Associações entre agrupamentos de marcadores e regiões centroméricas e teloméricas têm sido amplamente discutidas na literatura (Tanksley et al., 1992; Jiang et al., 1997; Saliba-Colombani et al., 2000). O sequenciamento dos marcas de RAPD que mostram agrupadas no grupo de ligação poderá elucidar a sua natureza (se DNA repetitivo ou de sequência simples).

(b) Acesso 06: mapa de ligação

Dos 121 locos heterozigóticos no acesso 06, 19 marcadores não foram atribuídos aos grupos de ligação (marcadores não ligados): AA03_1308; AB08_882; B20_1183; E18_1094; E14_1288; E08_1314; G07_2169; H19_691; I18_388; A16_2405; H17_1107; I10_1090; N19_1545; N19_1387; T14_1122; T18_305; R01_321; R04_860 e AE05_2386.

Figura 6 - Distribuição dos marcadores RAPD nos grupos de ligação do acesso 123 de maracujá amarelo. Em branco estão os marcadores dispostos dentro dos grupos de ligação e em preto, os marcadores acessórios.

Um total de 96 marcadores foi usado para gerar o mapa de ligação referente ao acesso 06 (Figura 7), sendo que 64 marcas (66,7%) foram atribuídas aos nove grupos de ligação. O comprimento total foi de 783,5 cM; os grupos variaram de 20,6 a 144,2 cM, com uma de média de $87,1 \pm 44,0$ (Tabela 5). Com base no método de Hulbert (1988), o comprimento total do genoma foi estimado em 1293,3 cM.

A distância média entre dois marcadores foi de 12,2 cM. Aproximadamente 18% dos intervalos nos grupos de ligação foram superiores a 25 cM, sendo 34,7 e 0 cM a maior e a menor distância encontradas, respectivamente.

A exemplo do mapa gerado para o acesso 123, os marcadores RAPD não se distribuíram uniformemente nos grupos de ligação (Figura 8). Cerca de 81% encontram-se distribuídos em cinco grupos de ligação (1 a 5). Juntos correspondem a 76,4% do comprimento total do mapa. Dois marcadores (2,1%) co-segregaram nas análises de ligação (Figura 6).

Figura 7 - Mapa genético de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. acesso 06 (grupos 1 a 4). As relações de ligação dos 96 marcadores RAPD foram estabelecidas com LOD 4,0 e $\theta = 0,3$. Os grupos de ligação foram compostos de 64 marcas e ordenadas com LOD > 2,0. Marcadores não ordenados foram considerados como acessórios e listados à direita dos grupos de ligação.

Figura 7 - Mapa genético de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. acesso 06 (grupos 5 a 9). As relações de ligação dos 96 marcadores RAPD foram estabelecidas com LOD 4,0 e $\theta = 0,3$. Os grupos de ligação foram compostos de 64 marcas e ordenadas com LOD > 2,0. Marcadores não ordenados foram considerados como acessórios e listados à direita dos grupos de ligação.

Tabela 5. Número de marcadores RAPD e comprimento em centimorgans (cM) de cada grupo de ligação do mapa de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., acesso 06.

Grupo de ligação	Número de marcadores	Comprimento (cM)
1	11	144,2
2	10	131,9
3	9	116,1
4	9	114,0
5	7	92,7
6	9	69,8
7	4	66,0
8	2	28,2
9	3	20,6
Total	64	783,5

Cerca de 9,4% dos marcadores não foram atribuídos a nenhum dos dois mapas gerados para *Passiflora*. A ocorrência de marcadores não ligados sugere que algumas regiões do genoma não foram mapeadas. Resultados similares foram encontrados em *Stevia* spp. (8,2%) (Yao et al., 1999) e em *Rosa* spp. (9,0%) (Debener & Mattiesch, 1999). Entretanto, a porcentagem de marcadores não ligados citada na literatura é bastante variável, sendo igual a 26,8% em *Citrus* spp (Cristofani et al., 1999) ou a 1% em *Eucalyptus* spp. (Marques et al., 1998). Em mapas de alta resolução, como o de tomate (Tanksley et al., 1992) não têm sido detectados marcadores não ligados, sendo esta uma das evidências que sugerem a completude dos mapas (saturação).

Figura 8 - Distribuição dos marcadores RAPD nos grupos de ligação do acesso 06 de maracujá amarelo. Em branco estão os marcadores dispostos dentro dos grupos de ligação e em preto, os marcadores acessórios.

Em média, cerca de 57% dos marcadores foram ordenados dentro dos grupos de ligação nos dois mapas (Tabela 6). A ordenação correta do conjunto de marcas nos grupos de ligação foi realizada simulando-se permutações entre os marcadores vizinhos, e avaliada a probabilidade daquela nova ordem ter sido a mais provável. Isso permitiu a construção de grupos de ligação em que ordem estabelecida é 100 vezes (LOD 2) melhor que a segunda ordem provável. A acurácia na determinação da ordem dos locos é um dos aspectos importantes que devem ser considerados na utilização de mapas genéticos para localização de regiões controladoras de caracteres quantitativos (QTL) (Plomion et al., 1995), sendo os critérios de LOD 2 e 3 utilizados para detecção de QTL (Lander & Bostein, 1989).

Tabela 6. Características dos mapas de ligação de *Passiflora edulis* f. Sims *flavicarpa* Deg., obtidos utilizando-se a estratégia de mapeamento “pseudo-testcross”, segundo o acesso.

	Acesso 123	Acesso 06
Número de marcadores	148	121
Número de marcadores com distorção da proporção mendeliana ($\alpha = 0,05$)	8	6
Número de grupos de ligação	9	9
Número de marcadores não ligados	5	19
Distância média entre os marcadores (cM)	11,2	12,2
Comprimento do mapa (cM) ^a	728,0	783,5
Comprimento estimado do mapa (cM) ^b	1195,6	1293,3

^a Corresponde à soma do comprimento dos grupos de ligação estabelecido pelo programa “Mapmaker”.

^b Estimativa do comprimento do mapa calculado pelo método de Hulbert (1998).

Para ambos os mapas, em média, 43% dos marcadores não foram ordenados corretamente. Isto pode indicar que o número de indivíduos usados na construção dos mapas não tenha sido suficientemente grande para permitir a adequada ordenação, visto que o número de indivíduos estabelece a resolução máxima a ser alcançada.

Em média, 9,5% de marcas mostrando co-segregação foram encontradas nos dois mapas. Estes resultados podem refletir a ocorrência de ligação absoluta entre eles (ausência de recombinação entre as marcas), o que torna a informação genética redundante, de modo que apenas um dos locos é suficiente para análises de ligação. Isto têm sido reportado na literatura (Tanksley et al., 1992; Debener & Mattiesch, 1999; Saliba-Colombani et al., 2000), sendo sugerida a retirada de um dos marcadores em futuras análises.

A distribuição dos marcadores em 9 grupos de ligação (Figura 5 e 7), em ambos os mapas, está de acordo com o número de cromossomos ($2n=18$) da espécie *Passiflora edulis* f. *Sims flavicarpa* Deg.

A estimativa do comprimento do genoma, com base na análises de ligação, dentre outros propósitos, serve para avaliar a porcentagem do genoma que foi coberta pelo mapa de ligação (Lefebvre et al., 1995). Para os mapas genéticos de *Passiflora* foi obtida a mesma cobertura, isto é, de 61% (Tabela 6). Sendo este o primeiro mapa gerado para espécie, pode-se considerar uma cobertura de moderada densidade.

Os dois mapas mostram intervalos superiores a 25 cM e uma cobertura parcial do genoma. Segundo Liu (1998) tanto o grau de cobertura do genoma quando a densidade do mapa a ser construído são funções diretas do número de marcadores utilizados. Supondo que a distribuição das marcas ocorre ao acaso no genoma, à medida que a densidade do mapa aumenta, maior será cobertura do genoma, e menor será o intervalo entre os marcadores.

Conforme descrevem Lange & Boehnke (1982), o número mínimo de marcadores (N) com distribuição aleatória no genoma, pode ser estimado com base nesta fórmula:

$$N = \ln(1 - p) / \ln(1 - 2d/L) \quad (3)$$

sendo:

p = porção do genoma que se deseja cobrir,

2d = a distância máxima entre dois marcadores,

L = o comprimento total do genoma estimado.

Sendo assim, para o obter a cobertura de 95% do genoma de *Passiflora*, com uma distância 20 cM entre os marcas e comprimento do genoma de 1250 cM (média entre os comprimentos estimados para os acessos 123 e 06), seriam necessários, no mínimo, 186 marcadores. Este valor é três vezes maior do que o número de marcadores usados na construção dos mapas de ligação, o que torna evidente a necessidade de um maior número de marcadores para aumentar a cobertura do genoma de maracujazeiro. O aumento no número de marcadores deve vir acompanhado de maior quantidade de indivíduos da população de mapeamento, visto que, a influência do número de marcadores genéticos utilizados está relacionada com a resolução máxima pré-estabelecida pelo número de genótipos.

A qualidade de um mapa genético pode ser quantificada com base no nível de confiança que foi estimada a ordem dos marcadores nos grupos de ligação e na distribuição dos marcadores no mapa (Liu, 1998).

Inúmeras aplicações têm sido dadas à construção de mapas genéticos, desde a localização de genes controladores de caracteres quantitativos, que possibilitam a seleção assistida via marcadores e estudos de sintenia, até a clonagem de genes (Lee, 1995; Lynch & Walsh, 1998). Para atender a diferentes finalidades de utilização, os mapas podem variar bastante no que diz respeito ao número de indivíduos, número de marcadores, cobertura do genoma, densidade, dentre outros aspectos. Por exemplo, a clonagem de genes a partir de mapas genéticos, normalmente exige mapas de altíssima densidade, com um grande número de indivíduos (>1000) e com distâncias de entre marcadores menores que 1 cM (Causse et al., 1994; Haanstra et al., 1999; Tai et al., 1999; Frary et al., 2000).

A construção do primeiro mapa genético de *Passiflora*, aqui relatado, abre a perspectiva para várias aplicações. Considerando que os acessos genitores (123 e 06) apresentam divergência para o caráter resistência à *Xanthomonas* sp. pv. *passiflorae*, agente causador de um das

principais doenças do maracujazeiro, a aplicação imediata dos mapas gerados consiste na busca de ligação de locos marcadores com os genes controladores da resistência (QRL's). O mapeamento com precisão destes QRL's, bem como a quantificação dos seus efeitos na manifestação fenotípica da moléstia, poderão gerar informações auxiliares ao desenvolvimento de variedades resistentes à essa bacteriose. Podem permitir, ainda, estudos do comportamento desses QRL's em diferentes locais, no sentido de verificar a interação dos mesmos com o ambiente e com diferentes isolados da bactéria.

Numa etapa mais avançada, o mapeamento dos QRL's pode permitir a clonagem das seqüências envolvidas com resistência, possibilitando comparações com outras seqüências já conhecidas, para estabelecer a homologia entre os genes envolvidos.

Além disso, os fragmentos amplificados podem servir como sondas em experimentos de hibridização *in situ* visando estabelecer a relação entre os grupos de ligação e respectivos cromossomos. Esta abordagem é relativamente fácil e depende da clonagem de um ou mais fragmentos atribuídos a cada um dos grupos de ligação, e sua posterior utilização com sonda a ser hibridizada contra metáfases mitóticas de *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.

5 CONCLUSÕES

- A estratégia “pseudo-testcross” aliada ao uso de marcadores RAPD se presta à construção de mapas de ligação de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.).
- Os mapas de ligação construídos para os acessos 123 e 06 de maracujá amarelo mostram uma distância média similar (12 cM) entre os marcadores RAPD.
- O tamanho estimado do genoma dos acessos 123 (1195,6 cM) e 06 (1293,3 cM) é semelhante e os mapas obtidos mostram-se moderadamente saturados (61%, em média).
- É descrito o primeiro mapa genético para a espécie *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, S.; TANKSLEY, S. D. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 17, p. 7980-7984, 1993.
- AL-JANABI, S. M.; HONEYCUTT, R. J.; MCCLELLAND, M.; SOBRAL, B. W. S. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208'. **Genetics**, v.134, p.1249-1260, 1993.
- BAILEY, N. T. J. **Introduction to the mathematical theory of genetic linkage**. London:Oxford University Press,1961. 421p.
- BARRENECHE, T.; BODENES, C.; LEXER, C.; TRONTIN, J. F.; FLUCH, S.; STREIFF, R.; PLOMION, C.; ROUSSEL, G.; STEINKELLNER, H.; BURG, K.; FAVRE, J. M.; GLOSSL, J.; KREMER, A. A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, n. 7, p. 1090-1103, 1998.
- BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In:PINHEIRO, J. B., CARNEIRO, I. F. **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000. p.63-223.

- BECKER, J.; VOS, P.; KUIPER, M.; SALAMINI, F.; HEUN, M. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. **Molecular General Genetics**, v. 249, p. 65-73, 1995.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.
- BRUCKNER, C. H. Auto-incompatibilidade em maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A. R. (Ed.) **Maracujá, produção e mercado**. Vitória da Conquista: UESB, 1994. p.6-18.
- BRUCKNER, C. H. Perspectivas do melhoramento genético do maracujazeiro. In: MANICA, I. (Ed.) **Maracujá: temas selecionados (1): melhoramento, morte prematura, polinização e taxonomia**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. p. 25-46.
- BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. Hibridação em maracujá. In: BORÉM, A. (Ed.) **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 1999. p. 379-399.
- BRUCKNER, C.H.; CASALI, V. W. D.; MORAES, C. F.; REGAZZI, A. J.; SILVA, E. A. M. Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Acta Horticulture**, n. 370, p. 45-57, 1995.
- BUETOW, K. H.; CHAKRAVARTI, A. Multipoint gene mapping using seriation. I. General methods. **American Journal Human Genetics**, v.41, p. 180-188, 1987a.

BUETOW, K. H.; CHAKRAVARTI, A. Multipoint gene mapping using seriation. I. Analysis of simulated and empirical data. **American Journal Human Genetics**, v.41, p. 189-201, 1987b.

CAETANO-ANNÓLES, G.; BASSAM, B. J.; GRESSHOFF, P. M. DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. **Plant Molecular Biology Report**, v. 4, n. 2, p. 294-307, 1991b.

CAETANO-ANNÓLES, G.; BASSAM, B. J.; GRESSHOFF, P. M. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers . **Biotechnology**, v. 9, p. 553-557, 1991a.

CAI, Q.; GUY, C. L.; MOORE, G. A. Extension of the linkage map in *Citrus* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, n. 5, p. 606-614, 1994.

CAMARGO, L. E. A. Mapeamento de QRL's: contribuições e perspectivas. In: PINHEIRO, J. B.; CARNEIRO, I. F. **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000. p.49-62.

CARLSON, J. E.; TULSIERAM, L. K.; GALUBITZ, J. C.; LUK, V. W. K.; KAUFFELDT, C.; RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F₁ progeny of conifers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 83, n. 2, p. 194-200, 1991.

CARRARO, A. F.; CUNHA, M. M. **Manual de exportação de frutas**. Brasília: MAARA, SDR, FRUPEX; IICA, 1994. 254p.

CARTER, T. C.; FALCONER, S. D. Stocks for detecting linkage in the mouse and the theory of their design. **Journal of Genetics**, v. 50, p. 307-323, 1951.

CAUSSE, M. A.; FULTON, T.M.; CHO, Y.G.; AHN, S. N.; CHUNWONGSE, J.; WU, K.; XIAO, J.; YU, Z.; RONALD, P.C.; HARRINGTON, S.E. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. **Genetics**, v. 138, n.4, p. 1251-1274, 1994.

CHENG Z. K.; YAN, H. H.; YU, H. X.; QIAN, Q.; YI, C. D.; GU, M. H.; ZHU, L. H. Fast assignment of DNA sequences to individual chromosome arms based on dosage effects from a set of rice telotrisomics. **Acta Botanica Sinica**, v. 42, n. 7, p. 708-711, 2000.

Chowdhury, M.A.; Slinkard, A. E. Linkage of random amplified polymorphic DNA, isozyme and morphological markers in grasspea (*Lathyrus sativus*). **Journal of Agricultural Science**, v. 133, n. 4, p. 389-395, 1999.

COE, H. E.; NEUFFER, M. G.; HOISINGTON, D.A. The genetics of corn. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J.W. (Ed) **Corn and corn improvement**, 1988. p. 81-237.

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

- CONNER, P. J.; BROWN, S.K.; WEEDEN, N.F. Randomly amplified polymorphic DNA-based genetic linkage maps of three apple cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 122, p. 350-359, 1997.
- CREIGHTON, H. B. ; MCCLINTOCK, B., A correlation of citological and genetical crossing-over in *Zea mays*. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, v.17, p. 492-497, 1931.
- CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. **Euphytica**, v.109, p. 25-32, 1999.
- CROUZILLAT, D.; LERCETEAU, E.; PETIARD, V.; MORERA, J.; RODRIGUEZ, H.; WALKER, D.; PHILLIPS, W.; RONNING, C.; SCHNELL, R.; OSEI, J.; FRITZ, P. *Theobroma cacao* L.: a genetic linkage map and quantitative trait loci analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, p. 205-214, 1996.
- CUNHA, M. A. P. Criação e seleção de variedades de maracujazeiro. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, Londrina, 1999. **Anais**, Londrina: IAPAR, 1999. p.74-75.
- DALBÓ, M. A.; YE, G. N.; WEEDEN, N. F.; STEINKELLNER, H.; SEFC, K. M.; REISCH, B. I. A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. **Genome**, v. 43, p. 333-340, 2000.

- DEBENER, T.; MATTIESCH, L. Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p. 891-899, 1999.
- DOERGE, R. Constructing genetic maps by rapid chain delineation. **Journal of Quantitative Trait Loci**, v.2, p. 121-132, 1996.
- DORNELAS, M. C., TAVARES, F. C. A., OLIVEIRA, J. C., VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* sp. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 106-110, 1995.
- DORNELAS, M. C., VIEIRA, M. L. C. Tissue-culture studies on species of passiflora. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 36, n. 2, p. 211-217, 1994.
- DRAYE, X.; LIN, Y. R.; QIAN, X.Y.; BOWERS, J. E.; BUROW, G. B.; MORRELL, P. L.; PETERSON, D. G.; PRESTING, G. G.; REN, S. X.; WING, R. A.; PATERSON, A. H. Toward integration of comparative genetic, physical, diversity, and cytomolecular maps for grasses and grains, using the sorghum genome as a foundation. **Plant Physiology**, v. 125, n. 3, p. 1325-1341, 2001.
- DUBCOVSKY J, TRANQUILLI G, KHAN IA, PFLUGER LA, SUAREZ E, ROUSSET M, DVORAK J. Comparisons of recombination frequencies in hybrids involving telocentric and bibrachial wheat chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, n.2, p. 308-314, 2000.
- DUVICK, D.N. Influence of morphology and sterility on breeding methodology. IN: FREY, K. J. **Plant breeding**. Ames: Iowa State University Press, 1967. p. 85-138.

- ECHE, C. S.; KIDWELL, K. K.; KNAPP, S. J.; OSBORN, T. C.; MCCOY, T. J. Linkage mapping in diploid alfalfa (*Medicago-sativa*). **Genome**, v. 37, n. 1, p. 61-71, 1994.
- EUJAYL, I.; BAUM, M. ; POWELL, W.; ERSKINE, W.; PEHU, E. A genetic linkage map of lentil (*Lens sp.*) based on RAPD and AFLP markers using recombinant inbred lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, n. 1-2, p. 83-89, 1998.
- FAJARDO D, ANGEL F, GRUM M, TOHME J, LOBO M, ROCA WM, SANCHEZ I. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. **Euphytica**, v.101, n.3, p.341-347, 1998.
- FALCONER, D. D.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**, London: Longman, 1996. 464p.
- FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, v.32, p. 1276-1277, 1997.
- FELSENSTEIN, J. A mathematically tractable family of genetic mapping functions with different amounts of interference. **Genetics**, v. 91, p. 769-775, 1979.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEM, 1996. 220p.
- FNP CONSULTORIA & COMERCIO. **Agrianual 2000**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo, 2000. 546p.

FRARY, A.; NESBITT, T. C.; FRARY, A.; GRANDILLO, S.; VAN DER KNAAP, E.; CONG, B.; LIU, J.P.; MELLER, J.; ELBER, R.; ALPERT, K. B.; TANKSLEY, S. D. fw2.2: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. **Science**, v. 289, n. 5476, p. 85-88, 2000.

FRARY, A.; PRESTING, G. G.; TANKSLEY, S. D. Molecular mapping of the centromeres of tomato chromosomes 7 and 9. **Molecular General Genetics**, v. 250, n. 3, p. 295-304, 1996.

FREGENE M, ANGEL F, GOMEZ R, RODRIGUEZ F, CHAVARRIAGA P, ROCA W, TOHME J, BONIERBALE . A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 431-441, 1997.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Biotecnologia na agricultura e agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. p.152-200.

GARDNER, E. J.; SNUSTAD, P. **Genética**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1986. 497p.

GARVIN, D. F.; WEEDEN, N. F. Genetic-linkage between isozyme, morphological, and DNA markers in tepary bean. **Journal of Heredity**, v. 85, n. 4, p. 273-278, 1994.

- GOMEZ, R.; ANGEL, F.; BONIERBALE, M. W.; RODRIGUEZ, F.; TOHME, J.; ROCA, W. M. Inheritance of random amplified polymorphic DNA markers in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Genome**, v. 39, p. 1039-1043. 1996.
- GRATTAPAGLIA, D; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v. 137, p.1121-1137, 1994.
- GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1998. 856p.
- GUERRA, M. S. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 140p.
- HAANSTRA, J. P. W.; WYE, C.; VERBAKEL, H.; MEIJER-DEKENS, F.; VAN DEN BERG, P.; ODINOT, P.; VAN HEUSDEN, A. W.; TANKSLEY, S.; LINDHOUT, P.; PELEMAN, J. An integrated high density RFLP-AFLP map of tomato based on two *Lycopersicon esculentum* x *L-pennellii* F-2 populations **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, n.1/2,p. 254-271, 1999.
- HALDANE, J. B. S. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. **Journal of Genetics**, v. 8, p. 299-309, 1919.
- HEMMAT, M.; WEEDEN, N. F.; MANGANARIS, A. G.; LAWSON, D. M. Molecular marker linkage map for apple. **Journal of Heredity**, v. 85, p. 4-11, 1994.

- HOLLINGSWORTH, W.O.; CHRISTIE, C. B.; NICHOLS M. A.; NEILSON, H.F. Detection of variation among and within asparagus hybrids using random amplified DNA (RAPD) markers. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 26, p. 1-9,1998.
- HULBERT, T.W.; LEGG, E. J.; LINCOLN, S. E.; LANDER, E. S.; MICHELMORE, R. W. Genetic analysis of the fungus, *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphisms. **Genetics**, v. 120, p. 947-958, 1988.
- JANSEN, R.C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. **Genetics**, v. 135, p. 205-211, 1993.
- JIANG, C.; LEWIS, M. E.; SINK, K. C. Combined RAPD and RFLP molecular linkage map of asparagus. **Genome**, v. 40, p. 69-76, 1997.
- JOSHI, S. P.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, V. S. Molecular markers in plant genome analysis. **Current Science**, v. 77, p. 230-240, 1999.
- KALO, P.; ENDRE, G.; ZIMANYI, L.; CSANADI, G.; KISS, G.B. Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 641-657, 2000.
- KARLIN, S. Theoretical aspects of genetic map functions in recombination processes. In: CHAKRAVARTI, A. (Ed) **Human population genetics: the Pittsburgh symposium**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1982. p.245-286.

- KEARSEY, M. J.; HYNE, V. QTL analysis: a simple marker regression approach. **Theoretical and Applied Genetics**, v.3 , p. 698-702. 1994.
- KELLER, B.; FEUILLET, C. Colinearity and gene density in grass genomes. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 6, p. 246-251. 2000.
- KIANIAN, S.F.; QUIROS, C.F.; Generation of a *Brassica oleracea* composite RFLP map: linkage arrangements among various populations and evolutionary implications. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 84, n. 5/6, p. 544-554, 1992.
- KILLIP, E. P. The American species of *Passifloraceae*. **Field Museum of Natural History. Botanical Series**, v. 19, p. 7-162, 1938.
- KIRKPATRICK, S.; GELATT, C. D.; VECCHI, M. P. Optimization by simulated annealing. **Science**, v. 220, p. 671-680, 1983.
- KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. **Annuaire of Eugenetics.**, v. 12, p. 172-175, 1944.
- KUBISIAK, T. C.; NELSON, C. D.; NANCE, W. L.; STINE, M. RAPD linkage mapping in a longleaf pine x slash pine F₁ family. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 90, n. 7/8, p. 1119-1127, 1995.
- LANDER , E.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v. 121, p. 185-199, 1989.

- LANDER, E. S.; WEINBERG, R.A. Genomics: journey to the century of biology. **Science**, v. 287, n. 5459, p. 1777-1782, 2000.
- LANDER, E.S., GREEN, P., ABRAHAMSON, J., BARLOW, A., DALY, M. J., LINCOLN, E. E., NEWBURG, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v.1, p. 174-181, 1987.
- LANGE, K.; BOEHNKE, M. How many polymorphic genes will it take to span the human genome? **American Journal Human Genetics**, v. 34, p. 842-845, 1982.
- LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advances in Agronomy**, v.55, p. 265-344, 1995.
- LEFEBVRE, V.; PALLOIX, A.; CARANTA, C.; POCHARD, E. Construction of an intraspecific integrated linkage map of pepper using molecular markers and doubled-haploid progenies. **Genome**, v. 38, p. 112-121, 1995.
- LEITÃO FILHO, H. F. ; ARANHA, C. **Botânica do maracujazeiro**. In: SIMPÓSIO DA CULTURA DO MARACUJÁ, 1, Campinas, 1974. Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1974. p. 1-13 .
- LEITE JÚNIOR, R. P.; WENDLAND, A.; SHIMAMOTO, R. T.; STENZEL, N. M. C. Avaliação do comportamento de espécies e progênies de *Passiflora* à bacteriose causada por *Xanthomonas* sp. pv. *Passiflora*. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, Londrina, 1999. **Anais**, Londrina: IAPAR, 1999. p.56-57.

LESPINASSE D, RODIER-GOUD M, GRIVET L, LECONTE A, LEGNATE H, SEGUIN M. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers .**Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, n. 1, p. 127-138, 2000.

LIMA, A. A.; BORGES, A. L.; SANTOS FILHO, H. P.; SANTOS, L. B.; FANCELLI, M.; SANCHES, N. F. **Instruções práticas para o cultivo do maracujazeiro**. Cruz das Almas: MAARA, EMBRAPA,CNPMF 1994. 49p.

LINCOLN, S., DALY, M.; LANDER, E. **Constructing genetic maps with MAPMAKER/E 3.0**. 3 ed. Cambridge: Whitehead Institute Technical Report,1992.170 p.

LIU, B. H. **Statistical genomics**, New York: CRC, 1998. 610p.

LIU, B. H.; KNAPP, S. J. GMEDEL, a program for Mendelian segregation and linkage analysis of individual or multiple progeny populations using log-likelihood ratios. **Journal of Heredity**, v. 8, p. 407-418, 1992.

LOPES, S. C. Citogenética do maracujá, *Passiflora* spp. In: SÃO JOSÉ, A. R. **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: Funep, 1991. p. 201-209.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 978p.

MALAVOLTA JR, V.A. Bacterioses do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, Jaboticabal, 1998. **Anais**. Jaboticabal: IAPAR, 1999. p.217-229.

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

MARKERT, C. L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzyme: tissues, ontogenetic, and species specific patterns. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, v.45, p. 753-763, 1959.

MARQUES, C. M.; ARAÚJO, J. A.; FERREIRA, J. G.; WHETTEN, R.; O'MALLEY, D. M.; LIU, B. H.; SEDEROFF, R. AFLP genetics maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, p. 727-737, 1998.

MARTIN, G. B.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; JULAPARK, C.; FRARY, A.; GANAL, M. W.; SPIVEY, R.; WU, T.; EARLE, E. D.; TANKSLEY Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science**, v. 262, p. 1432-1436, 1993.

MAYEDA, L. Y. Estudo citogenético em dez taxons do gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae). Piracicaba, 1997. 89p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- MAYEDA, L. Y.; VIEIRA, M. L.C. Estudo cariotípico de cinco espécies do gênero *Passiflora* (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Genética**, v.17, p. 160, 1994.
- MELETTI, L. M. M. Caracterização agrônômica de progênies de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). Piracicaba, 1998. 92p. Dissertação (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MELETTI, L. M. M.; MAIA, M. L. **Maracujá: produção de comercialização**. Campinas: IAC, 1999. 64p. (IAC Boletim Técnico, 181).
- MELETTI, L. M. M.; SANTOS, R. R.; MINAMI, KEIGO. Melhoramento do maracujazeiro-amarelo: obtenção do cultivar 'composto IAC-27'. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 3, p. 491-498, 2000.
- MENÉNDEZ, C. M.; HALL, A. E.; GEPTS, P. A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 1210-1217, 1997.
- MOORE, G.; DEVOS, K.M.; WANG, Z.; GALE, M.D. Cereal Genome Evolution: Grasses, line up and from a circle. **Current Biology**, v.5, n.7, p. 737-749, 1995.
- MURASHIGE, A. S.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, p. 1134-1137, 1980.
- NIKAIDO AM, UJINO T, IWATA H, YOSHIMURA K, YOSHIMURA H, SUYAMA Y, MURAI M, NAGASAKA K, TSUMURA Y. AFLP and CAPS linkage maps of *Cryptomeria japonica*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 825-831, 2000.
- OLIVEIRA, J. C. Melhoramento Genético de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. visando aumento da produtividade. Jaboticabal, 1980. 133p. Dissertação (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.
- OLIVEIRA, J. C.; FERREIRA, F. R. Melhoramento genético do maracujazeiro, In: SÃO JOSÉ, A. R.; FERREIRA, F. R.; VAZ, R. L. (Ed.) **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p.211-239.
- OLIVEIRA, J.C. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. (Ed.) **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto: L. Summa, 1987. p. 273-283.
- OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, Jaboticabal, 1998. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 1998. p.291-310.

OTONI, W. C.; CASALI, V. W. D.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R.
Isolamento de protoplastos de mesofilo de *Passiflora suberosa* L.:
influência da idade das plantas matrizes. **Revista Ceres**, v. 246, n.
43, p. 157-164, 1996.

OTONI, W.C. Potencial da biotecnologia no melhoramento de fruteiras.
In: BRUCKNER, C. H.; SALOMÃO, L . C. C.; PERREIRA, W. E.;
DIAS, J. M. M. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE
FRUTEÍRAS, 2., Viçosa, 2000. **Anais**. Viçosa: Editora UFV, 2000.
p.102-121.

PAL, N.; SIDHU, J. S.; SINGH, H.; SINGH, S.; DHALIWAL, H. S.
Construction of molecular linkage map in *Triticum monococcum*. **Crop
Improvement**, v. 25, p. 159-166, 1998.

PAN, Q.; LIU, Y. S.; BUDAI, H. O.; SELA, M.; CARMEL, G. L.; ZAMIR,
D.; FLUHR, R. Comparative genetics of nucleotide binding site-
leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of
two dicotyledons: Tomato and Arabidopsis. **Genetics**, v. 155, n. 1, p.
309-322, 2000.

PASSOS, I.R.S. Comportamento *in vitro* em *Vitis* spp e em *Passiflora
nitida*. Piracicaba, 1999. 112p. Dissertação (Doutorado). Escola
Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São
Paulo.

PATERNIANI, E.; MIRANDA FILHO, J.B. Melhoramento de populações.
In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G. P. **Melhoramento e produção do
milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 217-274.

PATERSON, A. H., TANKSLEY, S. D., SORRELLS, M. E. DNA markers in plant improvement. **Advances in Agronomy**, v. 46, p. 39-89, 1991.

PATERSON, A. H.; LIN, Y. R.; LI, Z. ; SCHERTZ, K. F.; DOEBLEY, S. R. PINSON, S. R. M.; LIU, S. C.; STANSEL, J. W.; IRVINE, J. E. Convergent domestication of cereal crops by independent mutations at corresponding genetic loci. **Science**, v. 269, p. 1714-1717, 1995.

PIZA JÚNIOR, C.T. A cultura do maracujá na região sudeste do Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, Jaboticabal, 1998. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 1998. p.20-48.

PLOMION, C.; O'MALLEY, D. M.; DUREL, C. E. Genome analysis in maritime pine (*Pinus pinaster*): comparison of two RAPD maps using selfed and open-pollinated seeds of the same individual. **Theoretical and Applied Genetics**, v.90, p. 1028-1034. 1995.

QUIROS, C. F. Solanacea: Tomato: *Lycopersicon esculentum*. <http://veghome.ucdavis.edu/classes/vc221/tomato/tomsum.html>. (12/julho/2001).

RAO, D. C.; MORTON, N.E.; LINDSTEN, J.; HULTEN, M.; YEE, S. A mapping function for man. **Humboldt Heredity**, v. 27, p. 99-104, 1977.

REGO, M. M.; BRUCKNER, C. H.; SILVA, E. A. M.; FINGER, F. L.; SIQUEIRA, D.L.; FERNANDES, A. A. Self-incompatibility in passion fruit: evidence of two locus genetic control. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 3/4, p. 564-568, 1999.

- RICK, C. M.; YODER, J. I. Classical and molecular genetics of tomato highlights and perspectives. **Annual Review of Genetics**, v. 22, p. 281-300, 1988.
- RITTER, E.; GEBHARDT, C.; SALAMINI, F. Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. **Genetics**, v. 125, p. 645-654, 1990.
- ROSSI, A. D. Comercialização do maracujá. In: RUGGIERO, C. SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, Jaboticabal, 1998. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 1998. p.279-287.
- RUGGIERO, C., SÃO JOSÉ, A. R., VOLPE, C. A., OLIVEIRA, J. C. de, DURIGAN, J. F., BAUMGARTNER, J. G., SILVA, J. R. NAKAMURA, K., FERREIRA, M. E., KAVATI, R., PEREIRA, V. de P. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília:MAARA, EMBRAPA, SPI, 1996. 64p. (Série Publicações Técnicas FRUPEX, 19).
- SACCO, J. C. **Flora ilustrada Catarinense**, Passifloráceas I, Itajaí: PASS, 1980. 131 p.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOEFFEL, S.; SHCARF, S.J.; HIGUHI, G.; HORN, G.T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487- 491, 1988.

- SALIBA-COLOMBANI, V.; CAUSSE, M.; GERVAIS, L.; PHILOUZE, J.
Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of
an intraspecific map of the tomato genome. **Genome**, v. 43, p. 29-40,
2000.
- SAX, K. The association of size differences with seed-coat pattern and
pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, v. 8, p.552-560,1923.
- SCANLON, M. J.; STINARD, P. S.; JAMES, M. G.; MYERS, A. M.;
ROBERTSON, D. S. Genetic-analysis of 63 mutations affecting maize
kernel development isolated from mutator stocks. **Genetics**, v. 136,
n.1, p. 281-294 , 1994.
- SCHUSTER, I.; ABDELNOOR, R. V.; MARIN, S. R. R.;CARVALHO, V. P.;
KIIHL,R.A.S.; SILVA, J.F.V.;SEDIYAMA, C. S.;BARROS,
E.G.;MOREIRA, M. A. Identification of a new major QTL associated
with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*).
Theoretical and Applied Genetics. v. 102, n. 1, p. 91-96, 2001.
- SEAH S.; SPIELMEYER, W.; JAHIER, J.; SIVASITHAMPARAM, K.;
LAGUDAH, E. S. Resistance gene analogs within an introgressed
chromosomal segment derived from *Triticum ventricosum* that confers
resistance to nematode and rust pathogens in wheat. **Molecular
Plant-Microbe Interactions**, v.13, n.3, p. 334-341, 2000.
- SEO B. S.; PETERSON P. A. A transposable element in diverse corn
lines, ubiquitous (uq)-allelism test. **Theoretical and Applied
Genetics**, v. 90, n.7/8, p. 1188-1197, 1995.

SEWELL, M.M.; SHERMAN, B. K.; NEALE, D.B. A consensus map for Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.). I. Construction and integration of individual linkage maps from two outbred three-generation pedigrees. **Genetics**, v. 151, p. 321-330, 1999.

SILVA, J. R. Situação da cultura do maracujazeiro na região central brasileira. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, Jaboticabal, 1998, **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 1998. p.18-19.

SIMONE, M.; MORGANTE, M.; LUCCHIN, M.; PARRINI, P.; MAROCCO, A. A first linkage map of *Cichorium intybus* L. using a one-way pseudo-testcross and PCR -derived markers. **Molecular Breeding**, v. 3, p. 415-425, 1997.

SOUZA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. **Maracujá: espécies, variedades, cultivo**. Piracicaba: FEALQ, 1997. 179 p.

STAUB, J. E, SERQUEN, F. C., GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience**, v. 31, n. 5, p. 729-740, 1996.

STENZEL, N. M. C.; SERA, T. Melhoramento genético de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Paraná. . In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, Londrina, 1999. **Anais**. Londrina: IAPAR, 1999. p.81.

SUITER, K.A.; WENDELL, J.F.; CASE, J.S. Linkage -1. **Journal of Heredity**, v. 74, p. 203 - 204, 1983.

- TAI, T.; DAHLBECK, D.; STALL, R. E.; PELEMAN, J.; STASKAWICZ, B. J. High-resolution genetic and physical mapping of the region containing the Bs2 resistance gene of pepper. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, n. 7/8, p. 1201-1206, 1999.
- TANKSLEY, S. D. Linkage relationships and chromosomal locations of enzyme-coding genes in pepper, capsicum-annuum. **Chromosoma**, v. 89, n. 5, p. 352-360, 1984.
- TANKSLEY, S. D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v. 27, p. 205-33, 1993.
- TANKSLEY, S. D.; GANAL, M. W.; MARTIN, G. B. Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. **Trends in Genetics**, v. 11, n. 2, p. 63-68, 1995.
- TANKSLEY, S. D.; GANAL, M. W.; PRINCE, J. P.; VICENTE, M. C.; BONIERBALE, M. W.; BROUN, P.; FULTON, T. M.; GIOVANNONI, J. J.; GRANDILLO, S.; MARTIN, G. B.; MESSEGUER, R.; MILLER, J. C.; MILLER, L.; PATERSON, A. H.; PINEDA, O.; Roder, M. S.; WING, R. A.; WU, W.; YOUNG, N. D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, v. 132, p. 1141-1160, 1992.
- TANKSLEY, S. D.; MILLER, J.; PATERSON, A.; BERNATSKY, R. **Molecular mapping of plant chromosomes**. In: GUSTAFSON J. P. AND APPELS R. (Ed.). New York: Plenum Press, 1988a. p. 157-173.

TANKSLEY, S.D.; BERNATZKY, R.; LAPITAN, N.L.; PRINCE, J.P.
Conservation of gene repertoire but not gene order in pepper and tomato. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 6419-6423, 1988b.

TEIXEIRA, C. G. Cultura do Maracujá . In: INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Maracujá: cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos**. Campinas: ITAL. 1994, p 3-142.

THODAY, J. M. Location of polygenes. **Nature**, v. 191, p. 368-370, 1961.

THOMPSON, E. A. Crossover counts and likelihood in multipoint linkage analysis. **IMA Journal Mathematical Applied Medicine Biology**, v. 4, p. 93-108, 1987.

VAN HEUSDEN AW, VAN OOIEN JW, VRIELINK-VAN GINKEL R, VERBEEK WHJ, WIETSMA WA, KIK C. A genetic map of an interspecific cross in *Allium* based on amplified fragment length polymorphism (AFLP (TM)) markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 118-126, 2000.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. London: Cambridge Press, 1996. 224p.

VERHAEGEN, D.; PLOMION, C. Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers. **Genome**, v. 39, p. 1051-1061, 1996.

- VIEIRA, M. L.C.; FUNGARO, M. H. P.; JUBIER, M. F.; LEJEUNE, B. Determination of taxonomic relationships among Brazilian taxa of *Stylosanthes* Sw., Leguminosae, using RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 3, p. 137-142, 1997.
- VIEIRA, M.L.C. Hibridação somática em plantas. **BIOtecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, p. 36-40, 1997.
- VIEIRA, M.L.C.; CUNHA, M. A. P.; BARBOSA, L. V. Avaliação Agronômica de híbridos somáticos de *Passiflora* spp. Obtidos por fusão de protoplastos. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, Londrina, 1999. **Anais**. Londrina: IAPAR, 1999. p.87-88.
- WEIR, B. **Genetic data analysis**. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 447p.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7213-7218, 1990.
- WENDLAND, A. Avaliação de espécies de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) à bacteriose e caracterização de *Xanthomonas* sp. pv. *passiflorae*. Londrina, 1997. 87p. Trabalho (Graduação). Universidade Estadual de Londrina.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 6531-6535, 1990.

YAO, Y.; BAN, M.; BRANDLE, J. A genetic linkage map for *Stevia rebaudiana*. **Genome**, v. 42, p. 657-661, 1999.

ZENG, Z. B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v. 136, p. 492-496, 1994.

ZENG, Z. B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping of quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, v.90, p. 10972-10976, 1993.