**MAPAS DE LIGAÇÃO AFLP E IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE
RESISTÊNCIA À *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* EM
MARACUJÁ-AMARELO**

RICARDO LOPES

Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Profa. Dra. **MARIA LÚCIA 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.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Abril - 2003

ERRATA

MAPAS DE LIGAÇÃO AFLP E IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* EM MARACUJÁ-AMARELO

página	item	linha	onde se lê	leia-se
31	2.8	2º Par. 3ª L.	...qualitativa ou vertical como raça-específica...	...qualitativa como vertical ou raça-específica...
31	2.8	2º Par. 4ª L.	...quantitativa ou horizontal como raça não-específica...	...quantitativa como horizontal ou raça não-específica...
34	3.1	1º Par. 7ª L.	...características de interesse...	...características de interesse comercial...
39	3.4.2	2º Par. 2ª L.	...37 °C...	...28 °C...
41	3.5.2	2º Par. 3ª L.	...ATTGGGTACGCAGTCTAC...	...AATTGGGTACGCAGTCTAC...
53	3.7.1	2º Par. 4ª L.	...parcial entre...	...individual entre...
56	3.7.2	3º Par. 6ª L.	X_1^*	x_1^*
92	4.4	1º Par. 7ª L.	...alelos alelos...	...quatro alelos...

página	item	fórmula	onde se lê	leia-se
39	3.4.2	(1)	$K = \frac{A x n^{1/3}}{3,49 x s}$	$K = \frac{A . n^{1/3}}{3,49 . s}$

página	item	figura	onde se lê	leia-se
44	3.5.5	Figura 2 – parte (C)	Iniciador <i>EcoRI</i> +G	Iniciador <i>MseI</i> +T
44	3.5.5	Figura 2 – parte (C)	Iniciador <i>MseI</i> +T	Iniciador <i>EcoRI</i> +G

página	item	tabela	onde se lê	leia-se
85	4.4	Tabela 11 linha 2ª	-1,825	3,742
		Tabela 11 linha 2	3,742	-1,825

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Lopes, Ricardo

Mapas de ligação AFLP e identificação de genes de resistência à *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em maracujá-amarelo / Ricardo Lopes. - - Piracicaba, 2003.

126 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.
Bibliografia.

1. Bacteriose vegetal 2. Genes 3. Genética vegetal 4. Mapeamento genético 5. Maracujá 6. Melhoramento genético vegetal 7. Podridão (Doença de planta)
8. Resistência genética vegetal I. Título

CDD 634.425

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

Aos Meus pais,

José Lopes Filho
Dalva da Silva Lopes

e à minha esposa,

Maria Teresa Gomes Lopes

Com amor,
Dedico

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), particularmente ao Departamento de Genética.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de estudo durante o curso e o auxílio financeiro a pesquisa.

À Profa Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira pela orientação, confiança, sugestões e apoio durante toda a etapa da realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelo ensinamento e sabedoria.

À Embrapa Amazônia Ocidental por permitir meu afastamento das atividades na empresa para conclusão de meu curso de doutorado após minha contratação.

À minha esposa, Maria Teresa Gomes Lopes, pelo companheirismo, incentivo, e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas pelo companheirismo, apoio e conhecimentos compartilhados.

Ao técnico do laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas Carlos Alberto de Oliveira pelo apoio e amizade.

Aos companheiros do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelo incentivo e apoio constante nessa nossa caminhada.

Aos funcionários do Departamento de Genética pelo apoio e amizade.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Importância da cultura.....	4
2.2 Aspectos botânicos e fitotécnicos.....	6
2.3 Melhoramento genético.....	8
2.4 Etiologia e importância da bacteriose do maracujazeiro.....	13
2.5 Marcadores moleculares e mapas genéticos.....	15
2.6 Construção de mapas de ligação de marcas moleculares.....	17
2.6.1 Fundamentos da ligação ("linkage").....	18
2.6.2 Genitores e delineamentos genéticos da população de mapeamento..	19
2.6.3 Procedimentos básicos para construção de mapas genéticos.....	23
2.7 Mapeamento de QTL.....	25
2.8 Mapeamento de genes de resistência.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	34

3.1 Obtenção e multiplicação da população de mapeamento.....	34
3.2 Extração de DNA da população de mapeamento.....	35
3.3 Quantificação das amostras de DNA.....	37
3.4 Inoculação das bactérias nas plantas e avaliação dos sintomas.....	37
3.4.1 Seleção do isolado bacteriano.....	37
3.4.2 Metodologia de inoculação e avaliação dos sintomas.....	38
3.5 Análise de marcadores AFLP.....	40
3.5.1 Digestão do DNA genômico.....	40
3.5.2 Preparo dos adaptadores.....	41
3.5.3 Ligação dos adaptadores aos fragmentos de restrição.....	41
3.5.4 Reações de amplificação.....	42
3.5.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	43
3.5.6 Revelação dos géis.....	46
3.5.7 Seleção das combinações de iniciadores.....	48
3.6 Construção dos mapas de ligação.....	48
3.7 Detecção e mapeamento de QRLs.....	53
3.7.1 Regressão linear múltipla.....	53
3.7.2 Mapeamento por intervalo composto.....	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1 Avaliação da resistência à bacteriose.....	58
4.2 Seleção das combinações de iniciadores.....	66
4.3 Mapas de ligação.....	73
4.4 Mapeamento de QRLs.....	84
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS DA PESQUISA.....	93
6 CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

LISTA DE FIGURAS

		Página
1	Aspecto do experimento instalado em casa de vegetação para inoculação e avaliação da resistência à bacteriose.....	38
2	Procedimentos para análise de marcadores AFLP.....	44
3	Variação na área foliar lesionada de plantas de <i>Passiflora edulis</i> Sims. <i>F. flavicarpa</i> Deg. aos 20 dias após inoculação com o isolado 18b (Nakatani, 2001) da bactéria <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> .	60
4	Distribuição da variável área foliar média lesionada (cm ²) de 117 indivíduos da população segregante (F ₁) inoculados com o isolado 18b (Nakatani, 2001) da bactéria <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i>	66
5	Parte de um gel AFLP corado com nitrato de prata.....	70
6	Tamanho dos fragmentos dos 237 locos AFLP polimórficos (segregação 1:1) entre os acessos de <i>Passiflora edulis</i> Sims f <i>flavicarpa</i> Deg. gerados pela combinação de enzimas <i>EcoRI/MseI</i> (A) e dos 66 gerados por <i>PstI/MseI</i> (B).....	72
7	Mapa de marcadores AFLP do acesso IAPAR-06 de <i>Passiflora edulis</i> Sims f <i>flavicarpa</i> Deg. grupos de ligação 1 a 3.....	77
	Mapa de marcadores AFLP do acesso IAPAR-06 de <i>Passiflora edulis</i> Sims f <i>flavicarpa</i> Deg. grupos de ligação 4 a 9.....	78
8	Mapa de marcadores AFLP do acesso IAPAR-123 de <i>Passiflora edulis</i> Sims f <i>flavicarpa</i> Deg. grupos de ligação 1 a 3.....	79
	Mapa de marcadores AFLP do acesso IAPAR-123 de <i>Passiflora edulis</i> Sims f <i>flavicarpa</i> Deg. grupos de ligação 4 a 9.....	80

9	Mapeamento do QRL a <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> no grupo de ligação 2 do acesso IAPAR-123.....	86
10	Ordem alternativa do grupo de ligação 2 do acesso IAPAR-123, a qual inclui o marcador PM023558r.....	88
11	Mapeamento do QRL a <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> no grupo de ligação 2 do acesso IAPAR-123 com a inclusão do marcador PM023558r.....	89

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Sequências dos adaptadores e dos iniciadores usados na avaliação das combinações de pré-amplificação e amplificação seletiva.....	45
2 Códigos atribuídos às 34 combinações de iniciadores AFLP usadas na amplificação seletiva da população segregante de maracujá-amarelo.....	49
3 Área foliar média lesionada (AFML) de 117 indivíduos F ₁ e seus genitores inoculados com o isolado 18b (Nakatani, 2001) de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i>	61
4 Estatísticas descritivas referentes à área foliar média lesionada (cm ²) dos 117 indivíduos da população segregante inoculados com o isolado 18b (Nakatani, 2001) da bactéria <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i>	65
5 Análise de variância da área foliar média lesionada (cm ²) dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123 e de 117 indivíduos F ₁ inoculados com o isolado 18b (Nakatani, 2001) da bactéria <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> (dados transformados $\sqrt{X}$).....	65
6 Polimorfismos de AFLP detectados entre os genitores IAPAR-06 e IAPAR-123. Dados obtidos a partir de 34 combinações de iniciadores para amplificação de fragmentos gerados por corte com as enzimas <i>EcoRI</i> / <i>MseI</i> e <i>PstI</i> / <i>MseI</i> , e três nucleotídeos seletivos.....	71

7	Marcadores AFLP e comprimento em centimorgans (cM) (Haldane) de cada grupo de ligação do mapa de <i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg., acesso IAPAR-06.....	75
8	Marcadores AFLP e comprimento em centimorgans (cM) de cada grupo de ligação do mapa de <i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg., acesso IAPAR-123.....	81
9	Características dos mapas de ligação dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123 construídos a partir de 303 locos AFLP usando a estratégia “duplo pseudocruzamento-teste”. As distâncias em centimorgans (cM) foram obtidas a partir da função de mapeamento de Haldane.....	83
10	Comprimento dos grupos de ligação dos mapas dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123 em centimorgans (cM) obtidos a partir das funções de mapeamento de Haldane e Kosambi.....	84
11	Resumo da análise de regressão múltipla para variável área foliar média lesionada (AFML) usando o processo “stepwise” para seleção de variáveis regressoras (marcadores).....	85
12	Diferenças entre as médias fenotípicas da área foliar média lesionada (AFML) dos genótipos marcadores ligados a alelos favoráveis de QRLs a <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> isolado 18b (Nakatani, 2001) e genótipos alternativos.....	91

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BSA – Albumina de soro bovino

CTAB – Cetyltrimethyl ammonium bromide

PCR – reação em cadeia da polimerase

EDTA – ácido etileno diamino tetracético

pb – pares de base

rpm – rotações por minuto

TRIS – tris-(hidroximetil)-aminometano

TEB – Tris 0,09 M, ácido bórico 0,09 M, EDTA 2 mM

TE – tampão Tris-EDTA.

MAPAS DE LIGAÇÃO AFLP E IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* EM MARACUJÁ-AMARELO

Autor: RICARDO LOPES

Orientadora: Profa. Dra. MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA

RESUMO

Uma população F_1 composta de 117 plantas derivada do cruzamento entre os acessos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg., $2n=18$) i.é, IAPAR-06 (genitor masculino, suscetível à *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) e IAPAR-123 (genitor feminino resistente) foi usada para a construção de mapas de ligação de AFLP e identificação de locos de resistência. A população de mapeamento foi inoculada, e a área foliar média lesionada foi avaliada. A combinação das enzimas de restrição *EcoRI*/*MseI* (E/M) e *PstI*/*MseI* (P/M) foram usadas em associação com um nucleotídeo seletivo no estágio de pré-amplificação, e três nucleotídeos na amplificação seletiva para a geração das marcas de AFLP. Locos que se ajustaram à segregação 1:1 foram analisados de acordo com a estratégia “duplo pseudocruzamento-teste”. A análise de QRLs foi realizada por regressão linear múltipla e pelo método de mapeamento por intervalo composto. O mapa de ligação do acesso IAPAR-06 foi construído usando 115 marcadores, dos quais 112 foram alocados em 9 grupos de ligação (GL) cobrindo 790,2 cM. O

comprimento dos grupos variou de 11,9 a 208,0 cM, e 35,7 % dos marcadores foram posicionados no mapa como acessórios. O mapa de ligação do acesso IAPAR-123 foi construído usando 140 marcadores, dos quais 138 foram alocados em 9 grupos de ligação cobrindo 473,2 cM. O comprimento dos grupos variou de 8,4 a 124,7 cM, e 61,6 % dos marcadores foram posicionados no mapa como acessórios. Em ambos os mapas, a distribuição dos marcadores AFLP não foi aleatória, pois houve a formação de "clusters". A análise de regressão linear múltipla revelou que dois marcadores apresentaram associações com QRLs. As marcas PM023558 (GL 2) e EM2378 (GI 9) explicaram 17,4 % e 3,9 % da variação fenotípica para área média de lesão, respectivamente. Ambos foram incluídos no mapa do acesso IAPAR-123 como marcadores acessórios. O mapeamento por intervalo composto identificou um QRL entre os marcadores do GL 2 (mapa IAPAR-123), EM161461 e EM01156 explicando 15,8 % da variação fenotípica, o qual corresponde ao QRL identificado pelo marcador PM023558 pela análise de regressão múltipla.

AFLP LINKAGE MAP AND IDENTIFICATION OF RESISTANCE GENE AGAINST *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* IN PASSION FRUIT

Author: RICARDO LOPES

Adviser: Prof(a). Dr(a). MARIA LUCIA CARNEIRO VIEIRA

SUMMARY

A F₁ population composed of 117 plants derived from a cross between two yellow of passion fruit clones (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg., 2n=18) i.e., IAPAR-06 (male parent, susceptible to *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) and IAPAR-123 (female and resistant parent) was used for the construction of AFLP-based genetic linkage maps and for the identification of resistance loci. The mapping population was inoculated, and the mean diseased leaf area was evaluated. The combination of the restriction enzymes *EcoRI*/*MseI* (E/M) and *PstI*/*MseI* (P/M) was used in association with one selective nucleotide in the pre-amplification stage and three nucleotides in the selective amplification for the AFLP markers generation. Loci that fitted to a 1:1 segregation were analyzed according to the two-way pseudo-testcross mapping strategy. The quantitative resistance loci (QRLs) analysis was performed by linear multiple regression and composite interval mapping. The IAPAR-06 linkage map was constructed using 115 markers, of which 112 were located on 9 linkage groups (LG) covering 790.2 cM. The length of the groups ranged from 11.9 to 208.0 cM, and 35.7 % of the markers were positioned on the map as accessories. The

linkage map of the clone IAPAR-123 was constructed using 140 markers, of which 138 were located on 9 linkage groups covering 473.2 cM. The length of the groups ranged from 8.4 to 124.7 cM, and 61.6 % of the markers were positioned on the map as accessories. In both maps, the distribution of the AFLP markers was not at random as the formation of clusters occurred. The multiple linear regression analysis revealed that two markers did show associations with QRLs. The markers PM023558 (LG 2) and EM23478 (LG 9) explained 17.4 % and 3.9 % of phenotypic variation for the mean diseased leaf area, respectively. Both were included on the IAPAR-123 map as accessory markers. The composite interval mapping identified one QRL between the LG 2-markers EM161461 and EM01156 (IAPAR-123 map), explaining 15,8 % of phenotypic variation, which corresponds to the QRL identified by the marker PM023558 by the multiple linear regression analysis.

1 INTRODUÇÃO

O maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) está entre as principais frutas produzidas no Brasil. O país é o maior produtor mundial, seguido da Colômbia, do Peru e do Equador. A produção mundial é de 350.000 toneladas, sendo que a produção brasileira responde por aproximadamente 57 % desta quantia (Cunha & Cardoso, 1998). Esses países produzem frutos da variedade *flavicarpa*, de casca amarela, principalmente para a indústria, e juntos, eles abastecem a maior parte do mercado mundial de suco de maracujá. Na África e na Austrália predomina o maracujá-roxo que é destinado para o mercado local na forma de produto fresco ou suco, ou para exportação para a Europa na forma “in natura” (Souza et al., 2002).

O cultivo comercial de maracujá no Brasil pode ser considerado recente (Meletti & Bruckner, 2001), e há diversos problemas no seu sistema de comercialização e produção (Aguilar & Santos, 2001). Verifica-se baixa produtividade dos pomares decorrente de práticas de cultivo inadequadas e problemas fitossanitários, especialmente doenças do sistema radicular e da parte aérea (Ruggiero et al., 1996). A falta de variedades que associem alta produtividade, qualidade e homogeneidade dos frutos e tolerância ou resistência genética às principais doenças que afetam a cultura tem sido limitante para elevar a qualidade e a produtividade dos pomares brasileiros (Meletti et al., 2000).

Entre as principais doenças da parte aérea destaca-se a bacteriose causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. Doença de severos danos, difícil controle e de ocorrência generalizada no Brasil (Oliveira & Ruggiero, 1998). As variedades usadas comercialmente são suscetíveis ao patógeno, e a incorporação da

resistência genética é a alternativa mais promissora para o controle dessa doença, pois não implica no aumento do custo de produção e em danos ambientais. Apesar da falta de informações sobre o controle genético da resistência à bacteriose no maracujá-amarelo, as primeiras avaliações de populações segregantes para a doença indicam que a herança da resistência é quantitativa (Vieira et al., 2002).

A grande maioria das características de importância agrônômica, como produção, resistência, altura de plantas, dentre outras, resulta de uma ação conjunta de vários genes cuja expressão sofre influência do ambiente. O padrão de variação fenotípica dessas características é contínuo, ou seja, não existem classes distintas como no caso das características qualitativas. Por essas razões, são denominadas de quantitativas. O termo “Quantitative Trait Loci”, ou QTL (Geldermann, 1975) tem sido usado para denominar regiões cromossômicas (locos) que controlam caracteres quantitativos. No caso de locos que controlam a resistência a doenças de natureza quantitativa tem sido usado o termo “Quantitative Resistance Loci” ou QRL (Young, 1996).

Com advento dos marcadores moleculares baseados na técnica da PCR (“Polymerase Chain Reaction”), principalmente o RAPD (Williams et al., 1990) e o AFLP (Vos et al., 1995), tornou-se possível construir mapas genéticos de alta cobertura genômica para praticamente todas as espécies. Esses mapas passaram a ser usados como base para o mapeamento de QTLs, tomando-se um recurso poderoso no estudo da herança de caracteres quantitativos e criando novas perspectivas para aperfeiçoar os métodos de seleção usados no melhoramento através da “seleção assistida por marcadores” (SAM).

O mapeamento de QTLs consiste não apenas na sua localização física no genoma, mediante alguma escala apropriada, mas também na quantificação e caracterização de seus efeitos permitindo estudos sobre (i) o tipo de ação gênica envolvido no controle genético da característica, (ii) as interações epistáticas, pleiotrópicas e, também, (iii) sobre a decomposição da interação genótipos por ambientes ao nível de cada QTL (veja Bearzoti, 2000). O mapeamento de genes de resistência tem contribuído para o entendimento das interações patógeno x

hospedeiro e para o aumento da eficiência dos programas de seleção visando o desenvolvimento de variedades resistentes a doenças (Camargo, 2001).

Este trabalho foi desenvolvido frente às possibilidades do uso de mapas moleculares em estudos de genética e melhoramento do maracujazeiro, e da importância atual da bacteriose causada por *X. campestris* pv. *passiflorae* para a cultura. Nossos objetivos foram construir mapas de ligação para maracujá-amarelo usando marcadores AFLP e identificar possíveis QRLs relacionados à resistência a essa doença.

A população de mapeamento (F_1) foi obtida por Carneiro et al. (2002) e originou-se do cruzamento entre os acessos 06 e 123 que mostram, respectivamente, susceptibilidade e resistência à *X. campestris* pv. *passiflorae*. Estes genitores pertencem à coleção de germoplasma de *Passiflora* do IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da cultura

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá. O suco da fruta concentrado ocupa o segundo lugar na pauta das exportações brasileiras de sucos de frutas que movimenta um mercado mundial de 5,0 bilhões de dólares/ano. O grande mercado comprador do suco de maracujá brasileiro é a Europa que absorve cerca 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; Leite et al., 1994; Ruggiero et al., 1996).

A cadeia produtiva de maracujá tem apresentado importância crescente na economia brasileira, criando empregos no meio rural (produção) e urbano (indústria) e gerando divisas por meio da exportação de suco que já alcançou US\$ 23 milhões em receita em 1987 (Leite et al., 1994). Os mercados de suco e de fruta fresca têm crescido, e a produção, embora estagnada nos últimos anos, é substancialmente maior àquela de décadas anteriores (Aguilar & Santos, 2001).

O destino da produção varia de acordo com a região, porém verifica-se ao longo das últimas duas décadas uma inversão: o mercado da fruta fresca que absorvia, aproximadamente, 30 % da produção nacional hoje absorve mais da metade (Ruggiero & Oliveira, 1998). De acordo com estimativas da AFRUVEC (Associação dos Fruticultores da Região de Vera Cruz), baseadas na safra 1995/96, aproximadamente 70 % da produção paulista de maracujá foram destinados ao consumo “in natura” e o restante à indústria de processamento. Já, na região de Araguari-MG, onde 65 % do suco de maracujá

engarrafado e vendido no país são produzidos, a situação é inversa e, aproximadamente, 35 % da produção são destinados ao mercado da fruta fresca (Silva, 1998).

A área cultivada no país chegou a alcançar 44.462 ha em 1996 diminuindo para 35.637 em 1999. Nestes anos, a produção foi de 409.497 e 317.146 toneladas, respectivamente. Embora a cultura esteja presente em todas as regiões do país, a produção mostra uma alta concentração regional, principalmente, no sudeste e nordeste. Os principais estados produtores são Bahia (21,16 %), São Paulo (18,65 %), Sergipe (10,97 %), Minas Gerais (7,58 %) e Pará (7,20 %) (FNP Consultoria & Comércio, 2002).

No estado de São Paulo, entre os anos 1992 e 1999, a área colhida foi 3.785 ha e a produção de 63.057 toneladas, em média. A área cultivada alcançou os extremos de 4.706 ha em 1996 e 3.212 ha em 1992. Em 1999, foram cultivados 3.934 ha, e produzidas 59.155 toneladas (FNP Consultoria & Comércio, 2002).

É importante destacar que tem sido comum, em praticamente todas as regiões, o caráter itinerante da cultura: surgem os primeiros plantios, ocorre enorme ascensão e, num período variando de 3 a 5 anos, eles praticamente desaparecem (Ruggiero et al., 1996; Silva, 1998). Isto se deve (i) a problemas sanitários, que diminuem a longevidade dos pomares e a produtividade, contribuindo para aumentar os custos de produção, (ii) à falta de variedades adaptadas a condições regionais com aptidão para o mercado de fruta fresca e, também, (iii) à falta de planejamento no dimensionamento dos plantios e para a comercialização da produção.

Entre as doenças de maior importância para a cultura pode-se citar, as que atacam o sistema radicular, murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f. *passiflorae*), morte prematura (precoce ou súbita) - sem etiologia definida, e podridão do colo (*Phytophthora cinnamomi*), e aquelas da parte aérea, bacteriose (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) e verrugose (*Cladosporium herbarum*

Link) e também algumas viroses, com destaque para o vírus do endurecimento do fruto (PWV) (Ruggiero et al., 1996; Kitajima & Rezende, 2001).

A produtividade dos pomares brasileiros de maracujá é bastante variável, estando a média nacional em torno de 10 a 12 t/ha/ano, embora existam pomares com produção acima de 40 t/ha/ano em plantações de vida útil de 2 anos, sendo baixa quando comparada à de outros países produtores, como por exemplo, o Havaí com 45 t/ha (Ruggiero et al., 1996; Oliveira & Ruggiero, 1998).

Contudo, do ponto de vista financeiro, mesmo com um custo de produção alto quando comparado ao de outras culturas, as perspectivas de rentabilidade do cultivo de maracujá são boas, principalmente nos sistemas produtivos mais eficientes. Os sistemas de produção e comercialização do maracujá ainda requerem melhorias passando pela ampliação e conquista de novos mercados, aumento da qualidade dos produtos e pela redução do custo de produção da matéria prima (Aguar & Santos, 2001).

2.2 Aspectos botânicos e fitotécnicos

O maracujá-amarelo pertence à família *Passifloraceae*, gênero *Passiflora* L. O termo maracujazeiro é usado para referir-se a várias espécies deste gênero (Bruckner et al., 2002). A família *Passifloraceae* apresenta 18 gêneros e 630 espécies, 95 % delas nativas da América do Sul e as demais da América do Norte, Índia, África, Austrália e das Ilhas Galápagos. O gênero *Passiflora* é composto de 24 subgêneros e 465 espécies, dentre as quais estão as de maior importância comercial (Vanderplank, 1996). É originário da América do Sul e tem seu principal centro de distribuição na região Centro-Norte do Brasil onde são encontradas de 100 a 200 espécies (Lopes, 1991). Muitas são cultivadas pelas suas propriedades alimentícias, ornamentais ou medicinais, mas principalmente pela qualidade de seus frutos (Meletti & Bruckner, 2001).

A espécie de maior interesse comercial é o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.), cultivado em aproximadamente 95 % dos pomares brasileiros (Ruggiero et al., 1996). A preferência por essa espécie é devido à qualidade de seus frutos, ao vigor e à produtividade (Bruckner et al., 2002). Outras espécies exploradas no Brasil, de menor importância comercial e cultivo bastante regionalizado, são o maracujá-roxo (*Passiflora edulis*), o maracujá-doce (*Passiflora alata*), o maracujá-melão (*Passiflora quadrangularis*), o maracujá-tubarão (*Passiflora cincinnata*) e o maracujá-suspiro (*Passiflora nitida*) (Inglez de Souza & Meletti, 1997; Piza Júnior, 1998; Pereira et al., 1998).

De acordo com a revisão sobre os taxons cultivados de *Passiflora*, apresentada por Carvalho-Okano & Vieira (2001), o maracujá-amarelo é originário do Brasil e o roxo da Austrália. Esses autores ressaltam que as formas com fruto roxo e amarelo são categorias infra-específicas e, com base no Código Internacional de Nomenclatura Botânica, a maneira correta de denominá-los é *Passiflora edulis* f. *edulis* e *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, respectivamente. A cor do fruto apresenta herança tipicamente monogênica com ausência de dominância, sendo verificada na F₁ a coloração roxo-avermelhada (Nakasone et al., 1967). Além desta característica, existem algumas diferenças morfológicas entre as formas, porém, do ponto de vista do melhoramento genético, se tem interesse no maracujá-amarelo por apresentar maior vigor, produtividade, tamanho de frutos e rendimento de suco, suco mais ácido e resistência ao *Fusarium*.

Segundo Carvalho-Okano & Vieira (2001), a identidade taxonômica das formas amarelo e roxo parece ser mantida pela barreira reprodutiva entre as plantas, uma vez que as flores do maracujá-roxo abrem pela manhã e fecham pelo meio-dia e as do maracujá-amarelo abrem por volta do meio dia e fecham à noite (Akamine & Girolame, 1959). No entanto, há autores que relatam a ocorrência da antese do maracujá-roxo pela tarde, juntamente com o maracujá-amarelo (Oliveira, 1987; Meletti et al., 1992; Bruckner et al., 1995).

Devido à dificuldade de acesso a sementes selecionadas, a maior parte dos produtores ainda retira suas sementes das matrizes dos seus próprios pomares. Essa prática de seleção é inadequada levando à alta proporção de frutos com baixa qualidade nos pomares. Os frutos de maior tamanho, classificados como A3, tipo de melhor cotação comercial, correspondem de 10 a 30 % da safra, isto conforme a variedade, os tratos culturais, a idade da planta e o manejo (Oliveira & Ruggiero, 1998).

A falta de variedades de maracujá com características definidas e os problemas fitossanitários têm sido responsáveis pela redução da vida útil dos pomares e pelo caráter nômade da cultura, fatores que têm elevado o custo de produção. Diversos patógenos, alguns dos quais sem controle químico eficiente, têm causado prejuízos à cultura. Entre eles estão os que atacam o sistema radicular, a bacteriose e as viroses. Por isso, os principais objetivos do melhoramento de maracujá-amarelo são aumento da produtividade, da qualidade dos frutos e a resistência a doenças (Meletti & Bruckner, 2001).

Variedades adequadas ao mercado da fruta fresca devem produzir frutos grandes e ovais a fim de conseguir boa classificação comercial e melhor preço. Além disso, os frutos devem ter boa aparência, serem resistentes ao transporte e à perda de qualidade durante o armazenamento. Para destino industrial deve-se dar enfoque ao maior rendimento de suco, mais acidez, coloração constante e alto teor de sólidos solúveis totais (Oliveira et al., 1994). Contudo, a situação atual do mercado indica a necessidade do desenvolvimento de variedades com dupla aptidão, atendendo às exigências do mercado da fruta fresca e da indústria, possibilitando ao produtor optar de acordo com a conveniência do momento.

2.3 Melhoramento genético

A grande variabilidade genética existente no germoplasma de *Passiflora*, o ciclo relativamente curto e o crescente interesse pela cultura são

fatores que tornam atraente e promissor o melhoramento genético do maracujazeiro (Nascimento et al., 2001). A referência ao germoplasma de *Passiflora* inclui notadamente aquelas espécies compatíveis com o grupo das cultivadas, todas com $2n = 18$ (Ferreira, 1998).

A diversidade existente entre e dentro de espécies do gênero *Passiflora* tem sido estudada e caracterizada com o objetivo de aproveitá-la nos programas de melhoramento. A variabilidade observada, principalmente para características físicas e físico-químicas do fruto, produtividade e resistência a pragas e doenças, indica a possibilidade de obter-se progresso genético na seleção.

O maracujá-amarelo é uma espécie alógama, cuja polinização cruzada é condicionada pelo fenômeno de auto-incompatibilidade do tipo homomórfica esporofítica (Bruckner et al., 1995). Há evidências que a auto-incompatibilidade do maracujá-amarelo é controlada por dois genes (Rego et al., 1999). No entanto, Falleiro (2003), estudando progênies obtidas de cruzamento entre plantas de mesmo fenótipo, mas cujo cruzamento era viável dependendo de que planta fornecia o pólen, sugeriu que há um gene de efeito gametofítico (G), associado ao sistema esporofítico (S). A compatibilidade ocorre, neste caso, quando uma planta homozigótica para G recebe pólen de uma planta heterozigótica, de mesmo genótipo com relação ao gene S, sendo o cruzamento recíproco incompatível.

Por ser uma planta alógama, vários são os métodos de melhoramento aplicáveis ao maracujazeiro, como o aumento da frequência dos genes favoráveis ou a exploração do vigor híbrido ou heterose. A frequência de genes favoráveis pode ser aumentada pela seleção massal ou pela seleção com teste de progênies (Bruckner et al., 2002) e o vigor híbrido explorado por meio de híbridos, variedades sintéticas ou compostos, como os obtidos por Meletti (1998) e Meletti et al. (2000).

De acordo com Oliveira (1980), a seleção massal é eficiente para produção, formato do fruto, teor de suco, teor de sólidos solúveis totais e vigor vegetativo. Cunha (1996) propôs que a seleção massal fosse feita na primeira colheita, com base no vigor vegetativo e na produção pendente, e as sementes fossem coletadas na

segunda e terceira colheitas de plantas selecionadas, polinizadas manualmente com mistura de pólen das igualmente selecionadas, praticando, portanto seleção nos dois sexos, e levando a maior ganho genético.

A seleção massal, realizada por produtores ou empresas que exploram a cultura, resultou no surgimento de populações selecionadas que são identificadas por vários nomes populares em diferentes regiões geográficas (Inglez de Souza & Meletti, 1997). Na região Sudeste, existem duas populações de amplo cultivo que apresentam características muito interessantes, conhecidas por “Maguary” e “Sul-Brasil” (Piza Júnior, 1998).

O trabalho de seleção da população “Maguary” teve início em 1986 pelas equipes técnicas das empresas Bioplanta e Maguary. O material hoje propagado apresenta plantas muito vigorosas, com razoável tolerância à bacteriose e antracnose, produtividade média de 73 kg/planta (variando de 28 a 126 kg), frutos com peso médio de 145 g (variando de 28 a 450 g) e polpa de coloração amarela forte a alaranjada, rendimento de suco da ordem de 42 %, com um teor médio anual de 14,5° Brix e acidez média anual de 3,5 %. Contudo, os frutos são pouco atraentes para o mercado da fruta fresca devido ao seu tamanho e coloração púrpura da casca, comum na maioria dos casos (Piza Júnior, 1998).

A população conhecida como “Sul-Brasil” é oriunda do trabalho de seleção iniciado em 1980 por um produtor do município de Rancharia, SP, e hoje é mantida pelos cooperados da Cooperativa Agrícola Sul-Brasil de Marília, SP. A produtividade é de 4 a 5 caixas/ano, os frutos são grandes, mas com casca grossa, em média mostra comprimento de 10 cm, largura de 7 cm e peso de 300 g; alcança até a classificação A4, que corresponde a 36 frutos por caixa tipo “K” (49,5 cm de comprimento, 22 a 24 cm de largura e 35,5 de altura, com capacidade para 13 kg); o rendimento em suco varia de 19 a 38 % e o Brix de 10° a 16° (Piza Júnior, 1998).

O Instituto Agronômico de Campinas (IAC) lançou no mercado em 1998 o composto denominado “IAC-27”, primeira variedade de origem controlada (Meletti et al., 2000). A população base foi obtida a partir da seleção massal de 21 progênies de pomares comerciais e bancos de germoplasma. Os melhores indivíduos dessa

população foram cruzados manualmente e posteriormente submetidos a sucessivos ciclos de seleção recorrente e retrocruzamentos para um genitor com boas características de fruto. Oito híbridos promissores foram avaliados e pela mistura de sementes dos 3 melhores híbridos foi obtido o composto “IAC-27”. Na avaliação destes híbridos, a produtividade média foi de 40 a 50 t/ha/ano (usando polinização manual), os frutos foram classificados como 2A e 3A, com dimensões externas médias de 8,8 cm de comprimento e 7,3 cm de largura, peso de 170 a 218 g, rendimento de polpa de 51 % e média de 15° Brix.

Linhagens endogâmicas de maracujazeiro poderão ser obtidas por cruzamento de plantas irmãs, retrocruzamentos ou autopolinização no estágio de botão (Bruckner et al., 1995). Para isto, são necessárias duas flores da mesma planta. Protege-se a flor doadora de pólen pela manhã, e à tarde abre-se o botão a ser polinizado, em cujo estigma se deposita o pólen coletado na flor em antese. As linhagens poderão ser mantidas por autofecundações no estágio de botão ou por propagação vegetativa. Bruckner et al. (2002) ressaltam que embora híbridos de maracujazeiro possam ser obtidos a partir de linhagens auto-incompatíveis, eles necessitam ter suficiente diversidade de alelos S para que ocorra boa frutificação. Híbridos simples, oriundos de duas linhagens homozigóticas para alelos S, não terão interesse comercial por serem auto-incompatíveis e, portanto improdutivos. Híbridos duplos seriam facilmente produzidos a partir de híbridos simples auto-incompatíveis, mas teriam também insuficiente diversidade de alelos S (Bruckner, 1994). A semente híbrida poderia ser produzida a partir de linhagem auto-incompatível, interplantada com linhagem com maior diversidade de alelos S. Nesse caso, a semente seria coletada apenas na linhagem auto-incompatível, dando origem a híbrido com suficiente diversidade de alelos S (Bruckner et al., 2002).

Um projeto de desenvolvimento de variedades e híbridos intra e interespecíficos de maracujazeiro, resistentes a doenças, está sendo desenvolvido por pesquisadores de instituições de pesquisa de diferentes estados. Um programa de melhoramento intravarietal vem sendo desenvolvido na Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, BA), onde populações de maracujá-amarelo e maracujá-

roxo têm sido melhoradas por seleção massal estratificada modificada e seleção entre e dentro de progênies de meios-irmãos. Nesse sentido, também estão sendo desenvolvidos trabalhos no IAPAR (Londrina, PR) e na Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária (ES) por meio da introdução, avaliação e seleção de plantas visando obter variedades melhoradas (Cunha & Cardoso, 1998).

A avaliação de espécies silvestres e de híbridos interespecíficos tem sido feita visando à identificação de porta-enxertos e o desenvolvimento de variedades resistentes a doenças. Cunha & Cardoso (1998) relatam os trabalhos desenvolvidos na FCAV/UNESP (Jaboticabal, SP) buscando transferir genes de resistência à morte precoce de *P. alata* para *P. edulis*, na Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA, PE) onde estão sendo pesquisadas fontes de resistência a *Fusarium* e virose para o desenvolvimento de cultivares intra e interespecíficos e para uso como porta-enxertos e também na Universidade Estadual da Bahia (Vitória da Conquista, BA) onde o comportamento de oito espécies de *Passiflora* está sendo avaliado com relação à morte prematura visando identificar porta-enxertos para maracujá-amarelo resistentes a esta enfermidade.

Híbridos interespecíficos têm sido obtidos na tentativa de introgressão de resistência genética de espécies silvestres para *P. edulis* f. *falvicarpa* (Oliveira & Ruggiero, 1998). No caso da fusariose, os híbridos interespecíficos têm apresentado suscetibilidade à doença, mostrando também falta de adaptação, suscetibilidade a doenças da parte aérea e baixo vigor. Com relação à morte prematura, o seu comportamento não é diferente e ainda existem problemas de infertilidade devido à incompatibilidade. Ainda estão em avaliação híbridos de *P. edulis* x *P. alata*, que apresentaram alta frequência de plantas resistentes. A transferência de resistência à morte precoce a partir de *P. setacea* tem se mostrado a mais promissora, porém tem-se esbarrado na esterilidade masculina dos híbridos e há dificuldades na avaliação da resistência.

Como alternativas para transpor barreiras de incompatibilidade sexual interespecífica entre as espécies de *Passiflora*, tem sido usada a hibridação somática (Dornelas et al., 1995; Vieira, 1997; Vieira & Dornelas, 1996; Otoni,

2000). Os híbridos somáticos desenvolvidos na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz estão sendo avaliados para o uso como porta-enxertos. Também tem sido estudada a possibilidade de obter genótipos resistentes através da transformação genética (Takahashi et al., 2002).

Na última década, tiveram início na ESALQ/USP trabalhos visando o mapeamento de genes que controlam características agronômicas de interesse para a cultura. Dentre estes, destacam-se: (i) resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, (ii) componentes de produção e (iii) características físico-químicas dos frutos.

Esses trabalhos servirão de base para a seleção assistida por marcadores moleculares os quais poderão, inclusive, ser usados na identificação de alelos S envolvidos no sistema de incompatibilidade.

2.4 Etiologia e importância da bacteriose do maracujazeiro

A bacteriose do maracujazeiro, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, de ocorrência generalizada nos estados do Sul e Sudeste, tornou-se fator limitante ao desenvolvimento da cultura nestas regiões. No Brasil, esta doença foi constatada pela primeira vez em 1968, na região de Araraquara, SP (Pereira, 1969) e já tendo sido relatada em todas as regiões produtoras de maracujá do Brasil (Kuroda, 1981; Teixeira, 1994).

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, 1994).

As variedades comerciais de maracujá disponíveis não apresentam nível de resistência satisfatório à bacteriose, sendo em grande parte suscetíveis. A principal recomendação de controle é a utilização de mudas e sementes sadias, no entanto, a ampla disseminação nas regiões onde se cultiva comercialmente o maracujazeiro

constitui-se num entrave para a obtenção de material de propagação sadio (Malavolta Junior, 1998).

Inicialmente, tentou-se contornar o problema por meio de controle com antibióticos, mas tal estratégia não se mostrou eficiente (São José, 1998). O controle químico tem sido realizado de maneira preventiva, o que tem elevado o custo de produção além dos impactos ambientais negativos que causa. O desenvolvimento de variedades resistentes é apontado como a medida mais efetiva e promissora no controle da doença.

Existem relatos da resistência à bacteriose em espécies do gênero *Passiflora* como *P. alata*, *P. molissima*, *P. cincinnata*, *P. foetida* e *P. suberosa*, no entanto, estas espécies não têm valor comercial imediato (Neto et al., 1984; Oliveira, 1987; Wendland, 1997; Oliveira & Ruggiero, 1998).

Com a intenção de aproveitar a variabilidade do germoplasma silvestre de *Passiflora*, foram realizados cruzamentos interespecíficos entre a espécie cultivada e espécies silvestres (Oliveira, 1987). Todavia, essa alternativa é bastante limitada em função de barreiras de compatibilidade que existem entre as espécies de *Passiflora*, o que resulta na produção de poucas plantas híbridas com baixa ou nenhuma fertilidade, comprometendo assim seu aproveitamento em programas de melhoramento.

A hibridação somática, via fusão de protoplastos, tem sido estudada como alternativa para a introgressão de genes a partir de espécies exóticas (Dornelas et al., 1995; Vieira, 1997). Esta técnica, por sua vez, além de ser laboriosa, necessita um estudo detalhado que envolve a caracterização morfológica, estudo do comportamento meiótico e avaliações de natureza agronômica dos híbridos para delinear o seu potencial de aproveitamento em programas de melhoramento genético (Barbosa & Vieira, 1997; Vieira, 1997).

Os relatos da existência de resistência genética a bacteriose dentro da espécie *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg (Kuroda, 1981; Neto et al., 1984; Oliveira, 1987; Oliveira et al., 1988; Wendland, 1997; Piza Junior, 1998; Quadros et al., 2002) apontam para a possibilidade do desenvolvimento de

variedades resistentes a partir do melhoramento intraespecífico. Este procedimento não apresenta nenhum tipo de restrição de natureza biológica (compatibilidade, fertilidade) ou técnica (como no caso da transgenia), e por isso é a alternativa mais viável em curto prazo. Para tanto, as fontes de resistência devem ser caracterizadas e sua herança estudada visando estabelecer as estratégias de melhoramento a serem adotadas.

Wendland (1997), avaliou a resistência a *X. campestris* pv. *passiflorae* em diferentes acessos de maracujá-amarelo e verificou variações no grau de resistência desses acessos. Também, é relatada a existência de razoável grau de tolerância à bacteriose na população “Maguary” (Piza Júnior, 1998). A variabilidade genética para resistência à bacteriose observada entre acessos e dentro de populações de maracujá-amarelo abre perspectivas para o melhoramento intraespecífico. Porém, para definir as estratégias de melhoramento e explorar de maneira eficiente a variabilidade genética, se faz necessário caracterizar a herança da resistência. O mapeamento de QRLs, usando marcas de DNA e populações segregantes, poderá auxiliar na introdução de diferentes genes de resistência em populações sob seleção, facilitando e acelerando o lançamento de variedades resistentes à enfermidade. Deve-se também considerar que existe variabilidade genética entre isolados do patógeno (Gonçalves & Rosato, 2000; Nakatani, 2001) e isto tem implicações para o desenvolvimento de variedades resistentes.

2.5 Marcadores moleculares e mapas genéticos

Marcadores moleculares revelam polimorfismos de DNA entre indivíduos geneticamente relacionados. Um loco molecular que apresenta segregação mendeliana é considerado um “marcador genético”. Há várias técnicas disponíveis, cada uma usando uma estratégia particular para detectar polimorfismos de DNA. Os marcadores RFLP e VNTR detectam polimorfismos por hibridação de DAN com sondas específicas enquanto marcadores como RAPD, SSR e AFLP revelam polimorfismos por amplificação de fragmentos a partir de reação em cadeia da

polimerase (PCR) (Mullis & Faloona, 1987). Os detalhes técnicos e a base genética desses marcadores são apresentados por Ferreira & Grattapaglia (1996) e Fungaro & Vieira (2001).

Os marcadores genéticos podem ser separados em dois grupos, os **codominantes**, como o RFLP (Grodzicker et al., 1974) e os SSR (Litt & Luty, 1989), e **dominantes**, como o RAPD (Williams et al., 1990) e o AFLP (Vos et al., 1995). No caso dos dominantes, os alelos de um mesmo loco são revelados pela presença ou ausência de uma banda que, por sua vez, resulta da amplificação de um fragmento de determinado tamanho que é visualizado no gel. No entanto, não é possível saber se o loco amplificado está em homozigose ou heterozigose. Sendo assim, marcadores dominantes, ao contrário dos codominantes, não permitem a distinção entre genótipos homozigóticos e heterozigóticos os quais constituem apenas uma classe, isto é, a que apresenta o alelo amplificado. Os indivíduos nos quais o alelo não é amplificado constituem a outra classe, considerada homozigótica para ausência da banda, qualquer que seja o motivo pelo qual o fragmento não foi amplificado (Lopes et al., 2003).

O fato do marcador ser dominante ou codominante apresenta aspectos que devem ser considerados de acordo com o tipo de população a ser analisada para o mapeamento. Considerando-se uma geração de retrocruzamento, apenas duas classes são possíveis i.é: *Mm* cujo fenótipo molecular corresponde à presença da banda e *mm*, que corresponde à ausência da banda. Tanto as marcas dominantes como as codominantes permitem que os respectivos fenótipos moleculares sejam distinguidos no gel. No entanto, no caso de uma população F_2 , ocorrem 3 classes genóticas i.é, *MM*, *Mm* e *mm*. Usando-se marcadores dominantes não é possível distinguir os genótipos *MM* e *Mm*, pois ambos resultam no mesmo fenótipo molecular, ou seja, a presença da banda no gel. A informação incompleta nesse caso tem implicações desfavoráveis para o mapeamento (Jiang & Zeng, 1997)

O RAPD (Williams et al., 1990) e o AFLP (Vos et al., 1995) são métodos sensíveis, rápidos, relativamente mais simples e baratos, e que revelam vários locos dispersos pelo genoma sem exigir conhecimento prévio da informação genética sobre

(i) as seqüências-alvo, como ocorre com os marcadores microssatélites que também são derivados da PCR, ou sobre (ii) as sondas usadas para hibridização, como no caso dos RFLPs. Contudo, deve-se considerar que a combinação de diferentes tipos de marcadores disponíveis propicia a construção de mapas mais representativos do genoma, isso porque, devido a particularidades das técnicas, existe uma localização preferencial dos marcadores ao longo do genoma.

A técnica AFLP detecta um maior número de locos, comparativamente às demais, possibilita ampla cobertura do genoma e apresenta um baixo custo por informação ou loco (Mueller & Wolfenbarger, 1999). A utilização de enzimas de restrição, combinada com condições adequadas à hibridização dos iniciadores durante as reações de amplificação, agrega a robustez da técnica de RFLP com a praticidade da PCR. Marcadores AFLPs reúnem a capacidade exploratória dos polimorfismos dos RFLPs (presença ou ausência de sítios de restrição) com as vantagens da PCR. Devido a essas características, o uso de marcadores RAPD vem gradativamente sendo substituído pelos AFLPs.

Marcadores AFLP têm sido extensivamente usados na construção de mapas de ligação em plantas (Simone et al., 1997; Debener e Mattiesch, 1999; Marques et al., 1998; Barcaccia et al., 1999; Bert et al., 1999; Remington et al., 1999; Lespinasse et al., 2000; Testolin et al., 2000; Strommer et al., 2002) e análise de QTLs que controlam resistência a doenças (Cervera et al., 1996; Voorrips et al., 1997; Jin et al., 1998; Van der Voort et al., 1999; Xu et al., 1999; Xu & Corban, 2000; Flament et al., 2001; Mignouna et al., 2002), tolerância a sais (Quarrie et al., 1997) ou outras características quantitativas (Lebrun et al., 2002; Crespel et al., 2002).

2.6 Construção de mapas de ligação de marcas moleculares

Os mapas genéticos representam regiões do genoma organizadas por grupos de ligação ("linkage groups"), os quais são construídos a partir da atribuição a cada grupo de marcadores que apresentam ligação física entre si, sendo esta calculada pela frequência de recombinação observada entre as marcas em

populações segregantes. Marcas que apresentam ligação física localizam-se no mesmo cromossomo. Sendo assim, os grupos de ligação representam o conjunto haplóide de cromossomos da espécie. É preciso distinguir os conceitos de **mapa genético** (conjunto dos grupos de ligação) e **mapa físico** (conjunto de informações derivadas das técnicas de seqüenciamento) e salientar que, a exemplo do que ocorre para o homem, para algumas espécies de plantas ambos os mapas já estão integrados (*Arabidopsis* e arroz, por exemplo).

Entre as principais aplicações dos mapas genéticos pode-se destacar:

(1) a localização de genes de interesse que controlam características de importância agrônômica, tanto de herança qualitativa como quantitativa, sendo esta a base para a seleção assistida por marcadores (Young, 1996; Tanksley, 1993; Liu, 1998; Pinheiro & Carneiro, 2000);

(2) o mapeamento comparativo (Jones et al., 2002; Ahn & Tanksley, 1993; Keller & Feuillet, 2000; Lamoureux et al., 2002) que tem possibilitado maior entendimento da organização e evolução do genoma das espécies;

(3) a clonagem posicional de genes (*positional cloning*), uma estratégia que permite a clonagem sem a necessidade à priori de se conhecer o gene ou seus produtos, mas apenas a sua posição no genoma (Young, 1990; Collins 1992; Martin et al., 1993);

(4) a sua atribuição aos cromossomos da espécie por diferentes estratégias (linhas de adição e substituição; FISH);

(5) a sua integração com os mapas físicos.

2.6.1 Fundamentos da ligação ("linkage")

A ligação entre locos gênicos e os fundamentos do mapeamento genético são conhecidos desde o início do século passado. Estudos de segregação genética em *Drosophila* demonstraram que ligação gênica tem base física e que a frequência de recombinação entre genes ligados é proporcional à distância entre eles (Sturtevant, 1913). Embora a frequência de recombinação esteja associada à distância física entre

os locos, esta relação varia entre organismos e ao longo do genoma de um mesmo organismo (Liu, 1998). Isto é muito importante, principalmente, quando se tem interesse na localização física do gene, por exemplo, para fins de clonagem. Em situações nas quais se pretende identificar genótipos específicos em populações segregantes, como no caso da seleção assistida por marcadores, a **frequência de recombinação**, independente da distância física entre os genes, é o parâmetro de interesse.

Na segregação de genes ligados, são observados desvios das proporções genotípicas e fenotípicas esperadas, sendo os que tipos iguais aos genitores (comumente chamados de *parentais*) são observados em maior frequência do que os recombinantes. Considera-se que dois genes estão ligados quando a probabilidade de ocorrência de recombinação entre eles é menor que 0,5. Do contrário, assume-se que são independentes.

Seguindo esses princípios, há quase um século, foi construído o primeiro mapa genético de *Drosophila* (Sturtevant, 1913). Entretanto, somente a partir do surgimento das técnicas de análise de DNA, foi possível obter um número praticamente ilimitado de marcadores genéticos dispersos pelo genoma, e o mapeamento genético foi difundido e explorado para praticamente todas as espécies (Botstein et al., 1980).

A construção de um mapa genético exige a obtenção de uma população segregante, a análise dos indivíduos desta população com algum tipo de marcador genético, a separação das marcas em grupos de ligação, a determinação da ordem dos locos dentro do seu grupo e as estimativas das distâncias entre as marcas (Staub et al., 1996).

2.6.2 Genitores e delineamentos genéticos da população de mapeamento

A escolha dos genitores da população segregante (população de mapeamento) e do delineamento genético mais apropriado são de suma importância para o sucesso do mapeamento. Por população segregante entende-se uma amostra

de indivíduos na qual locos gênicos estejam segregando, incluindo locos de marcadores genéticos e, se for o caso, locos que controlam características de interesse e que serão identificados. O desequilíbrio de ligação entre os locos segregantes constitui-se na premissa fundamental e mais importante do mapeamento. O desequilíbrio de ligação é máximo quando essas populações são oriundas de cruzamentos controlados, sendo que o máximo de informação genética ocorre quando se usam marcadores codominantes e a geração F_2 (Mather, 1938).

Os genitores usados para gerar a população segregante devem ser tão contrastantes quanto possível. Este contraste ou divergência genética garante que um maior número de locos deve mostrar polimorfismo entre os genitores e portanto deve segregar na população de mapeamento. No caso de se usar os mapas visando à localização de QTLs, os genitores devem também ser divergentes para a característica em estudo. A resolução máxima de um mapa é pré-determinada pelo número de indivíduos da população, sendo o nível de resolução alcançado função do número de marcadores segregantes analisados nesses indivíduos (Coelho, 2000).

Inicialmente, a análise de ligação usando marcas moleculares em plantas foi aplicada em populações derivadas da geração F_1 proveniente do cruzamento de plantas diplóides e completamente homozigóticas, i.é, retrocruzamentos, linhas puras recombinantes, F_2 e duplo haplóides. Isto porque as principais culturas de importância agrícola são espécies autógamas, ou que não apresentam severa depressão endogâmica quando submetidas a autofecundações, além do que a introgressão de genes mapeados pode ser feita por sucessivos ciclos de retrocruzamento (Maliepaard et al., 1997). Porém, nas espécies que apresentam forte depressão endogâmica, auto-incompatibilidade, ou ainda, longo período juvenil, a obtenção de plantas em completa homozigose é inviável. Assim, para espécies que apresentam uma ou mais dessas características, como as florestais e a maioria das fruteiras, o mapeamento tem sido realizado usando populações segregantes derivadas do cruzamento de genitores heterozigóticos (Ritter et al., 1990; Grattapaglia & Sederoff, 1994; Marques et al., 1998; Testolin et al., 2001; Seefelder et al., 2000; Carneiro et al., 2002; Debener & Mattiesch, 1999).

As diferenças na análise de ligação entre progênies obtidas a partir de linhas puras ou de genitores heterozigóticos está no número de alelos segregando por loco em cada genitor e na fase de ligação desses locos. No caso de populações derivadas de linhas puras diplóides, somente dois alelos segregam e alelos de um mesmo genitor permanecem em fase de associação na geração F_1 . Já no caso de genitores diplóides heterozigóticos, podem segregar até 4 alelos por loco, podendo o número de alelos variar entre locos (Ex., quatro alelos segregando no loco M e três no loco N: $M_1M_2 \times M_3M_4$, $N_1N_2 \times N_1N_3$), além do que a fase de ligação é desconhecida (Maliepaard et al., 1997).

Uma alternativa para o mapeamento genético usando progênies de genitores heterozigóticos é a estratégia denominada “duplo pseudocruzamento-teste” (Grattapaglia & Sederoff, 1994). Esta denominação se deve ao fato que, a partir da análise de um conjunto de locos segregantes na população de mapeamento ou, em de uma amostra de indivíduos desta população, são selecionados “à posteriori” locos que segregam na proporção 1:1, como em um cruzamento-teste clássico. Esses locos são analisados em conjuntos separados constituídos por locos em heterozigose em um ou outro genitor, e para cada qual é construído um mapa genético individual.

A estratégia do “duplo pseudocruzamento-teste” é aplicada para qualquer tipo de marcador e apresenta como característica favorável o fato de que as marcas dominantes são tão informativas quanto as codominantes, pois permitem identificar ambas as classes genotípicas (homozigota e heterozigota) que ocorrem na progênie segregante. (Carlson et al., 1991; Hemmat et al., 1994; Crouzillat et al., 1996). A construção de mapas associando o uso de marcadores dominantes e a estratégia do “duplo pseudocruzamento-teste” tem sido utilizada em espécies florestais, frutíferas e ornamentais, como em *Eucalyptus* (Grattapaglia et al., 1995; Verhaegen et al., 1997; Marques et al., 1998), *Pinus* (Kubisiak et al., 1995), kiwi (Testolin et al., 2001), maçã (Conner et al., 1998), maracujá (Carneiro et al., 2002), lírio (Abe et al., 2002) e rosa (Deberne & Mattiesch, 1999).

Uma modificação nessa estratégia foi proposta por Atienza et al. (2002) devido ao fato da estratégia “duplo pseudocruzamento-teste” apresentar dois

inconvenientes, principalmente no caso de cruzamentos interespecíficos. O primeiro deles está relacionado ao nível de heterozigosidade dos genitores e o outro à baixa frequência de marcadores biparentais. Um dos genitores pode apresentar nível de heterozigosidade inferior ao outro, e assim os mapas dos genitores terão variação no comprimento. Yin et al. (2001), usando marcadores RAPD e a estratégia “duplo pseudocruzamento-teste” para construir mapas a partir do cruzamento interespecífico de *Populus*, verificaram que o mapa obtido para um dos genitores foi muito maior do que o outro. Por outro lado, a baixa frequência de marcadores biparentais dificulta a construção de um único mapa integrado para os genitores. A proposta dos autores consiste em usar dois genitores de uma mesma progênie (“full-sib”), e por isso denominaram-na de “offspring cross”: dois genitores heterozigóticos são cruzados e da sua progênie são selecionados dois indivíduos para gerar a população de mapeamento, para os quais é esperado o mesmo nível de heterozigosidade. A estratégia mantém as vantagens do “duplo pseudocruzamento-teste” usando marcadores dominantes, gerando um número elevado de marcas monoparentais (configuração “pseudocruzamento-teste”) e uma alta frequência de alelos biparentais (locos em heterozigose em ambos os genitores). Isto deverá permitir a construção de um mapa integrado dos genitores.

A integração de mapas genéticos individuais i.é, de cada genitor, ou apenas a identificação dos grupos de ligação homólogos, depende de “marcadores ponte” que devem segregar em ambos genitores. Para a integração de grupos homólogos devem existir pelo menos dois marcadores biparentais segregando em cada grupo ligação, os quais serão usados como ponte (Atienza et al., 2002). Alguns programas computacionais para construção de mapas genéticos, como o “JoinMap” (Van Ooijen & Voorrips, 2001) analisam locos segregando de acordo com diferentes delineamentos genéticos (RC_1 , RC_2 e F_2) e permitem a construção de mapas integrados.

2.6.3 Procedimentos básicos para construção de mapas de ligação

Na construção de mapas de ligação é analisada, geralmente, a segregação de centenas de marcadores em mais de uma centena de indivíduos. Para tanto, diversas metodologias foram desenvolvidas e implementadas em programas computacionais como “Mapmaker” (Lander et al., 1987), “Gmendel” (Liu e Knapp, 1992) e “JoinMap” (Van Ooijen & Voorrips, 2001).

De posse dos dados referentes aos genótipos dos indivíduos da população de mapeamento para todos os locos marcadores, deve-se primeiro analisá-los, individualmente, submetendo-os ao teste de aderência à segregação mendeliana, de acordo com o delineamento genético da população. Geralmente, é usado o teste qui-quadrado. Por se tratarem de testes múltiplos, recomenda-se que o nível de significância não seja considerado para cada loco individualmente, e que o nível de significância global seja controlado usando critérios como o de “Bonferroni” e o FDR (Bearzoti, 2000; Silva & Vencovsky, 2002).

As marcas que se mostram adequadas ao modelo de segregação são então submetidas à análise de ligação aos pares para compor os grupos de ligação. Teoricamente, marcadores com frequência de recombinação inferior a 0,50 estão em um mesmo cromossomo e, portanto, no mesmo grupo de ligação. Com uma boa cobertura do genoma, espera-se que o número de grupos de ligação seja equivalente ao número de cromossomos do conjunto haplóide da espécie.

Estabelecidos os grupos de ligação, a ordem dos marcadores deve ser determinada dentro de cada grupo com a respectiva distância entre eles, isto usando procedimentos de “análise multiponto”. Análises de ligação multiponto requerem que a frequência de todas as possíveis classes recombinantes seja calculada (Lathrop et al., 1985). Classes recombinantes representam 2^{n-1} classes de alelos que podem ocorrer em n locos considerando todos os eventos recombinantes possíveis. Um dos procedimentos de análise multiponto, conhecido como análise dos três pontos (“three-point mapping”), consiste na divisão do conjunto de n locos a serem ordenados em

subconjuntos de três. As frequências de classes recombinantes são usadas em testes multipontos, e são feitas comparações entre as ordens alternativas (Doerge, 1993).

Idealmente, deveriam ser avaliadas e comparadas todas as possíveis ordens de n locos para que a mais provável fosse encontrada. No entanto, como o número de locos geralmente é grande isto se torna impraticável, uma vez que para n locos são possíveis $n!/2$ ordens. Por exemplo, com 30 marcadores são possíveis $1,3236 \times 10^{32}$ ordens (Doerge, 1993). Diante disto, foram desenvolvidos métodos para que a ordem mais provável possa ser obtida sem que seja necessária a avaliação de todas as possíveis ordens. Entre esses métodos estão “anelamento simulado” (Kirkpatrick et al., 1983), “seriação” (Buetow & Chakravarti, 1987), “ramos e conexões” (Thompson, 1987) e “delineação rápida em cadeia” (Doerge, 1996).

Um outro aspecto a ser considerado em um mapa genético é a escala em que ele é representado. A frequência de recombinação (c) (a qual é freqüentemente usada como escala nos mapas de ligação), relacionada diretamente com a principal aplicação dos mapas genéticos i.é, a predição de descendentes, apresenta o inconveniente de não ser aditiva. Assim, considerando-se a ordem de três locos quaisquer como sendo **A_B_C**, não é possível obter-se a distância entre **A_C** simplesmente pela soma das distâncias entre **A_B** e **B_C**. Para superar este inconveniente foi proposto o uso da unidade Morgan (**M**), que representa a distância entre dois locos ao longo da qual é esperada a ocorrência de um gameta recombinante por geração (Weir, 1996). É comum se trabalhar com o centésimo dessa unidade, ou seja, centimorgans (**cM**). Sendo assim, 1 cM corresponde a um segmento cromossômico onde ocorre, em média, 0,01 ou 1% de recombinação (c) que corresponde a metade da frequência de células com “crossing over” ou permuta.

Como o interesse prático é prever a frequência de recombinação entre dois locos quaisquer a partir da distância entre eles, são usadas funções de mapeamento para estabelecer esta relação. Diversas funções de mapeamento foram desenvolvidas, as mais conhecidas são a de Kosambi (1944) e a de Haldane (1919), sendo esta última a mais usada (Bearzoti, 2000). Essas funções distinguem-se pelo fato de que a teoria de Kosambi admite a possibilidade de interferência na ocorrência

de recombinação entre regiões próximas, e a de Haldane considera que a recombinação é independente, ou seja, não pressupõe interferência. A adequação dos modelos pode ser verificada comparando as frequências observadas com as esperadas, substituindo as probabilidades de recombinação por suas estimativas. Cabe ressaltar que não existe uma relação linear entre as distâncias de mapa (cM) e as distâncias físicas (pb), podendo ocorrer variação na razão “número de pb/centiMorgan” de até 1.000 X entre diferentes regiões do genoma. Além disto, as regiões distais mostram-se com maior tendência à recombinação enquanto nas regiões centroméricas a permuta é suprimida (Lee, 1995).

Por fim, cabe comentar que existem diferentes estratégias para atribuição dos grupos de ligação aos cromossomos da espécie. Como exemplo, pode-se mencionar o uso de:

- (i) translocações (Weber & Helentjaris, 1989);
- (ii) linhas de adição ou substituição como utilizado em cereais (Werner et al., 1992);
- (iii) monossômicos, trissômicos e outras aneuploidias (Helentjaris et al., 1986; McCouch et al., 1988; Young et al., 1987; Satovic et al., 1996; Werner et al., 1992);
- (iv) genes atribuídos a cromossomos específicos (Fukui et al., 1992);
- (v) hibridação “in situ” (Haper & Sauders, 1981);
- (vi) hibridação fluorescente “in situ” (Trask, 1991).

2.7 Mapeamento de QTL

A idéia de utilizar marcadores genéticos na identificação e mapeamento de locos envolvidos no controle genético de caracteres quantitativos foi apresentada no início do século passado (Sax, 1923). Já os fundamentos da teoria do mapeamento de QTLs foram apresentados e passaram a ser mais bem compreendidos a partir do trabalho de Thoday (1961).

Se um loco envolvido no controle de um caráter de herança complexa estiver fisicamente ligado a um gene de herança simples, os efeitos fenotípicos deste loco podem ser indiretamente estudados com base nos efeitos do gene vizinho (Thoday, 1961). Contudo, na busca de marcadores genéticos ligados a locos de interesse, é necessário dispor de marcas distribuídas satisfatoriamente pelo genoma. Na época, a reduzida disponibilidade de marcadores genéticos representou o maior entrave para o avanço dessa linha de trabalho.

Com o desenvolvimento das técnicas que revelam marcadores de DNA tornou-se praticamente ilimitado o número de marcas moleculares (locos) para qualquer espécie. Isto trouxe a necessidade de metodologias mais adequadas e informativas para o estudo indireto de QTL a partir de marcadores genéticos. Assim, diversos métodos de mapeamento foram desenvolvidos (Lander & Botstein, 1989; Haley & Knott, 1992; Jansen, 1992,1993; Jansen & Stam 1994; Kearsey & Hyne, 1994; Wu & Li, 1994; Zeng, 1993, 1994; Hyne & Kearsey, 1995; Kao et al., 1999) e encontram-se traduzidos em linguagem computacional nos “softwares”: “QTL Cartographer” (Basten et al., 1999), “MAPMAKER/QTL” (Paterson et al., 1988) e “MapQTL” (Van Ooijen & Maliepaard, 1996), entre outros.

A capacidade de detecção de um QTL é função da magnitude do seu efeito sobre o caráter, do tamanho da população segregante avaliada, da frequência de recombinação entre a marca e o QTL, bem como da herdabilidade do caráter (Paterson et al., 1991; Tanksley, 1993).

O mapeamento de um QTL consiste na sua localização no genoma mediante uma escala apropriada e na quantificação e caracterização de seus efeitos (Bearzoti, 2000). Para tanto, o desequilíbrio de ligação entre os alelos do loco marcador e os alelos do QTL é explorado em populações segregantes oriundas de cruzamentos controlados entre genitores com fenótipos contrastantes em relação ao caráter de interesse e às marcas.

A análise baseada em cada marcador, isoladamente, é a maneira mais simples de se verificar se há associação entre um loco marcador e um QTL (Tanksley, 1993). A metodologia baseada em um único loco consiste na comparação estatística

do valor médio do caráter para as distintas classes genotípicas do marcador (MM , Mm e mm no caso de marcadores codominantes ou M_{-} e mm para dominantes), não sendo necessário, portanto, se dispor de um mapa genético. Frente a um resultado significativo, admite-se a existência de ligação entre o loco marcador e o QTL, porém não é possível estimar com precisão sua localização e seu efeito. Por isso, nesta situação, é adequado dizer que o QTL foi detectado ao invés de se usar o termo “mapeado”.

Lander & Botstein (1989) propuseram um método de mapeamento usando o princípio da máxima verossimilhança para verificar a possível presença de um QTL na região entre um par de marcas, sendo estas adjacentes em um grupo de ligação. Esta metodologia, denominada de **mapeamento por intervalo**, possui maior poder de detecção e maior precisão na estimativa dos parâmetros associados ao QTL do que a análise de marcas individuais. Suas vantagens, frente à análise de marcas individuais, são mais pronunciadas quando se dispõe de marcadores espaçados de 20 a 35 cM (Tanksley, 1993). Condição em que é provável a ocorrência de recombinação entre o loco marcador e o QTL, sendo este efeito compensado na análise de intervalo. No entanto, ressalta o autor que em intervalos inferiores a 20 cM, as estimativas feitas por intervalo são semelhantes às de marcas individuais, e também que, com distâncias superiores a 35 cM, mesmo a análise de intervalo é imprecisa na detecção de um QTL.

O mapeamento por intervalo apresenta como inconveniente o fato da análise de um intervalo estar sujeita à detecção de QTL falso positivo, isto por ignorar possíveis QTLs em intervalos adjacentes ligados ao intervalo em questão (Doerge, 1993). Outra consequência é que toda a variação genética devida a QTLs fora do intervalo é residual, o que pode diminuir a precisão das estimativas e o poder dos testes (Bearzoti, 2000).

Para contornar os inconvenientes apresentados pelo mapeamento por intervalo, surgiram as propostas de mapeamento por intervalo composto. Jansen (1992, 1993) e Zeng (1993, 1994) propuseram o uso de modelos baseados em regressão linear múltipla, nos quais os efeitos de QTLs fora do intervalo analisado são

eliminados, aumentando a precisão e o poder de detecção de um QTL neste intervalo. Entretanto, no mapeamento por intervalo composto, o processo de estimação e o teste de hipótese para um QTL no intervalo $M_L M_{i+1}$ podem sofrer interferência na presença de um outro QTL nos segmentos $M_{i-1} M_i$ ou $M_{i+1} M_{i+2}$ (Bearzoti, 2000). Ressalte-se que em mapas densos, não é usual a presença de QTLs em intervalos adjacentes.

Uma metodologia com enfoque multivariado, que estende o **mapeamento por intervalo composto** para análise de mais de uma característica simultaneamente, foi apresentada por Jiang & Zeng (1995). Na presença de correlação entre caracteres, o enfoque multivariado pode aumentar o poder de detecção e também a precisão na estimação dos efeitos de QTL. A metodologia gera ainda informações sobre (i) interação QTL x ambiente (tratando diferentes ambientes como caracteres diferentes no modelo), (ii) expressão do QTL em diferentes estádios de desenvolvimento e (iii) natureza da correlação genética (ligação ou pleiotropia), entre outras (Bearzoti, 2000).

Kao et al. (1999) propôs um modelo mais complexo que considera múltiplos intervalos simultaneamente, sendo por isso denominado de **mapeamento por intervalo múltiplo**. O avanço desta metodologia está na incorporação da estimativa da epistasia no modelo. O mapeamento por intervalo múltiplo apresenta como vantagens a maior eficiência e precisão na identificação de QTLs, identificação e entendimento dos padrões epistáticos, possibilitando agregar os efeitos epistáticos ao ganho genético por meio da seleção assistida por marcadores.

2.8 Mapeamento de genes de resistência

A busca por variedades resistentes é o método ideal para o controle de doenças de plantas comparativamente aos demais métodos. Isto se deve ao baixo custo da semente de alta qualidade genética, acessibilidade ao agricultor, impacto ambiental mínimo, e garantia ao consumidor de um produto livre de resíduos nocivos à saúde.

O sucesso no desenvolvimento de variedades resistentes depende da identificação de fontes de resistência (ou genes), de estudos da herança da resistência, e das interações que existem entre o patógeno, a planta e o ambiente. O mapeamento de genes de resistência usando marcadores de DNA tem dado grande contribuição ao entendimento desses fatores em diversos patossistemas, tanto no caso da resistência qualitativa como quantitativa (Camargo, 2001; Young, 1996; Kumar, 1999).

Na fase de pré-melhoramento, os marcadores são usados para determinar:

- (1) o número de genes envolvidos na resistência;
- (2) a magnitude e efeito destes genes;
- (3) a existência de raça-especificidade,
- (4) a existência de interações epistáticas, genótipo por ambiente e genótipo por estágio de desenvolvimento.

Essas informações são a base para a definição das estratégias de seleção a serem adotadas. No programa de melhoramento propriamente dito, os marcadores são usados na seleção assistida (ou seleção indireta), para monitorar a introgressão de genes em retrocruzamentos, permitindo a seleção precoce (antes da avaliação fenotípica), e acompanhar a piramidação de genes de resistência tanto qualitativa como quantitativa.

Os genótipos usados como fonte resistência em programas de melhoramento, geralmente, são mal adaptados, e o processo de transferência dos genes de resistência nos materiais elite requer retrocruzamentos sucessivos para eliminação de locos indesejados oriundos do genitor doador e a recuperação do genoma elite.

Marcadores moleculares fortemente ligados aos genes que se deseja introgridir são usados para monitorar sua presença nas gerações de retrocruzamento. Ao mesmo tempo, várias outras marcas podem ser usadas para o cálculo de índices de similaridade, auxiliando na seleção de indivíduos mais semelhantes ao genitor recorrente ao longo das gerações de retrocruzamento. Marcadores moleculares têm sido usados em retrocruzamentos para a introgressão

de resistência a vírus em tomateiro (Young & Tanksley, 1989), resistência múltipla a fungos em feijoeiro (Santos et al., 2001) e resistência à bacteriose em arroz (Chen et al., 2000).

Retrocruzamentos assistidos por marcadores moleculares podem ser reduzidos a duas gerações, no mínimo (Hospital et al., 1992), podendo se chegar a quatro (Openshaw et al., 1994). Simulações computacionais têm sugerido que o genoma do genitor recorrente pode ser reconstituído em apenas três gerações (Benchimol et al., 2001). Isto pode significar a redução de um a quatro anos na obtenção do produto final.

A piramidação de genes de resistência consiste na combinação ou introdução de diferentes genes em uma única variedade. É uma estratégia de melhoramento que tem sido adotada para aumentar a durabilidade e o espectro de resistência a doenças (Liu et al., 2000). Durante a fase de intercruzamento visando a piramidação de genes pelas estratégias convencionais, múltiplas inoculações são realizadas. Isto nem sempre é possível ou ainda pode levar a erros na avaliação dos sintomas, pois é comum que a avaliação de um gene interfira na habilidade de se avaliar o efeito de outro. O monitoramento da introgressão de genes de resistência nas fases de intercruzamento por marcas fortemente ligadas a esses genes evita a necessidade de inoculações múltiplas. O uso de marcadores de DNA para assistir a piramidação de genes de resistência é ilustrado nos trabalhos de Alzate-Marin et al. (2001) visando obter cultivares de feijão do tipo carioca resistente à mancha angular, antracnose e ferrugem e de Liu et al. (2000) no qual genes de resistência ao míldio foram incorporados em um cultivar elite de trigo.

A piramidação de genes de resistência não é restrita apenas a genes de herança monogênica, pois QRLs de efeito maior podem ser tratados como fatores mendelianos, ou seja, individualmente. O uso de marcas de DNA também possibilita o acompanhamento de alelos de genes de resistência presentes em genitores suscetíveis, propiciando a obtenção de progênies transgressivas.

O uso da seleção indireta consiste na seleção baseada no genótipo dos indivíduos sem a necessidade de avaliação fenotípica da resistência. Isto é muito

interessante quando a avaliação da resistência é de difícil mensuração ou muito influenciada pelo ambiente. Esta estratégia tem sido preconizada para o melhoramento da soja visando resistência ao nematóide do cisto (NCS), doença controlada por múltiplos locos e múltiplos alelos por loco, pois o trabalho de avaliação é extremamente tedioso. Concibido et al. (1996) identificaram um marcador associado ao NCS que explica 35 % de resistência à raça 1, 50 % da resistência à raça 2 e 54 % da resistência à raça 6. Baseados na seleção assistida por uma marca, os autores obtiveram 90 % de precisão na seleção de indivíduos resistentes em uma população $F_{5,6}$.

A resistência dita **parcial** foi inicialmente tratada como raça-não-específica, ajustando-se ao conceito de resistência horizontal. Ainda hoje alguns autores tratam a resistência **qualitativa ou vertical** como raça-específica e **resistência quantitativa ou horizontal** como raça não-específica. Van der Plank (1963) presumiu que os genes envolvidos no controle genético da resistência quantitativa tinham o mesmo efeito para todas as raças do patógeno. Posteriormente, observou-se que pequenas, mas significativas, interações variedades $\times$ isolados ocorriam pela existência de interações entre genes de pequeno efeito com raças do patógeno, assim como ocorre na resistência vertical.

A partir do uso de marcadores genéticos para o mapeamento de QRLs, a relação entre resistência parcial e raça-especificidade tornou-se mais clara. A análise da contribuição individual de QRLs demonstrou que o efeito dos mesmos varia de acordo com a raça do patógeno. Locos de resistência parcial que apresentam raça-especificidade estão descritos em diversos trabalhos de mapeamento de QRLs, como para a resistência à antracnose em feijão (Geffroy et al., 2000), *Phytophthora* em batata (Leonards-Shippers et al., 1994), nematóide do cisto em soja (Schuster, 1999), ferrugem em cevada (Qi et al., 1999) e murcha bacteriana em tomateiro (Danesh e Young, 1994).

Leonards-Shippers et al. (1994) mapearam QRLs para resistência a duas raças de *Phytophthora* em batata: sete QRLs foram específicos para uma das raças, sete para a outra, e quatro não específicos. No caso da murcha bacteriana em

tomateiro, o mapeamento de QRLs para resistência a três raças do patógeno mostrou haver dois QRLs de efeito maior. Um deles apresentou alta raça-especificidade e o outro não mostrou diferença entre as três raças (Danesh & Young, 1994). Schuster (1999) estudou a ligação entre genes de resistência a três raças de NCS e demonstrou que um QRL de efeito maior tem efeito similar em duas das raças, no entanto, para uma terceira raça este QRL é de menor efeito.

A interação genótipo por ambiente é um importante componente no controle genético de caracteres quantitativos, incluindo a resistência. Bubeck et al. (1993), avaliaram em três ambientes uma população de milho derivada do cruzamento entre as linhagens ADENT x B73rhm1, segregando para resistência à cercospora. No total, nove regiões cromossômicas apresentaram associação significativa com a resistência. No entanto, apenas o efeito de uma dessas regiões, que inclui duas marcas de RFLP, foi significativo nos três locais de avaliação. Outra grande região cromossômica, incluindo sete marcas de RFLP, apresentou efeito significativo em dois locais, e as demais regiões, em apenas um dos locais.

Existem diversos modelos em genética quantitativa para o estudo da interação genótipo x ambiente, no entanto, a vantagem do uso de marcadores genéticos se deve à possibilidade de individualizar o efeito de cada QRL, e assim avaliar o efeito do ambiente sobre este QRL individualmente. Isto permite identificar QRLs de efeito maior que sejam estáveis em diferentes condições ambientais, os quais podem ser usados em programas de melhoramento assistidos por marcadores visando ao desenvolvimento de variedades com resistência estável em diversos ambientes.

Em geral, a ação coletiva de genes de resistência explica apenas parte da variação fenotípica observada em uma população segregando para resistência. A variação não explicada é atribuída a erros experimentais e a regiões não identificadas devido à saturação insuficiente do genoma, sendo a contribuição da epistasia na variação fenotípica geralmente desconsiderada (Camargo, 2000). Recentes estudos de mapeamento de QTLs têm revelado ocorrer considerável efeito epistático sobre

caracteres quantitativos (Eshed & Zamir, 1996; Li et al., 1997; Yu et al., 1997; Cao et al., 2001; Zhang et al., 2001).

A importância das interações epistáticas como componentes significativos no controle genético da resistência podem ser ilustradas pelo estudo da resistência ao vírus do mosaico da cana em milho (Xia et al., 1999) e a *Phytophthora* em pimenta (Lefebvre & Palloix, 1996). Metodologias recentes de mapeamento permitem identificar e quantificar as interações epistáticas, as quais podem ser capitalizadas nos ganhos genéticos por seleção.

O mapeamento de QRLs também tem contribuído para esclarecer a hipótese de que genes de resistência quantitativa seriam versões derrotadas de genes de resistência qualitativa, ou seja, alelos de genes de resistência qualitativa com fenótipos intermediários (Young, 1996). Esta questão é uma alusão a exemplos conhecidos em outras características nas quais alelos mutantes apresentam fenótipos intermediários. Em arroz, três QRLs conferindo resistência à brusone foram mapeados em uma região na qual foi localizado previamente um gene de resistência qualitativa a mesma doença (Yu et al., 1991). Em batata, a localização de QRLs conferindo resistência à *Phytophthora* também coincidiu com a localização de um dos genes de resistência qualitativa já conhecidos (Leonards-Shippers et al., 1992). No entanto, evidências que genes de resistência parcial são versões derrotadas de genes de resistência qualitativa só serão obtidas a partir do mapeamento de alta resolução e da clonagem de QRLs.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e multiplicação da população de mapeamento

A população de mapeamento foi composta de 117 plantas F₁ obtidas a partir do cruzamento dos acessos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) 'IAPAR 123' (genitor feminino) e 'IAPAR 06' (genitor masculino), oriundos da coleção de *Passiflora* do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR – Londrina, PR). O acesso IAPAR-123, que é proveniente da seleção "Maguary", apresenta resistência à bacteriose causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* além de outras características de interesse, como teor de sólidos solúveis totais, acidez e rendimento de suco. O acesso IAPAR-06 é uma introdução de Marrocos que apresenta características agronômicas inferiores às do IAPAR-123 e susceptibilidade à bacteriose (Wendland, 1997). Devido as suas origens diferentes, mostram contraste para características morfológicas e para marcas de DNA (Carneiro, 2001).

As sementes obtidas a partir do cruzamento entre os acessos IAPAR-06 e IAPAR-123 foram semeadas em bandejas de isopor utilizando substrato "Plantmax". Aproximadamente 60 dias após a semeadura, as plântulas foram transferidas para sacos plásticos de 20 x 26 cm utilizando como substrato uma mistura de terra, esterco curtido e areia (50:25:25) e mantidas em casa de vegetação.

Seis meses após o transplante, foi iniciada a clonagem dos indivíduos da população de mapeamento por meio de estaquia. Estacas, contendo pelo menos uma folha, foram retiradas e colocadas para enraizar em copos de plásticos de 300 mL contendo substrato "Plantmax". Após o enraizamento e

início da brotação das estacas (em torno de 60 dias), estas foram transferidas para sacos plásticos de 20 x 26 cm contendo como substrato uma mistura de terra, areia e esterco curtido (50:25:25), e mantidas em casa de vegetação.

3.2 Extração de DNA das plantas da população de mapeamento

A extração do DNA da população de mapeamento e dos genitores foi realizada a partir de folhas frescas. Foi usado o método CTAB, descrito por Murray & Thompson (1980), com modificações.

De cada planta foram pesados aproximadamente 0,3 gramas de tecido foliar, os quais foram congelados em N líquido e macerados em almofariz de porcelana com auxílio de um bastão. O macerado foi transferido para tubos “eppendorfs” de 2 mL contendo 1 mL de tampão CTAB e 10 µL de β-mercaptoetanol (1 %) previamente aquecidos a 65 °C em banho-maria por 15 minutos. O macerado foi homogeneizado com o tampão e mantido por 30 minutos em banho-maria a 65 °C. Durante este período, a cada 5 minutos foi feita uma homogeneização por inversão dos tubos.

Em seguida, foram acrescentados, a cada amostra, 700 µL de clorofórmio:octanol (24:1) e feita uma homogeneização por suaves inversões dos tubos durante 5 minutos. O material foi então submetido à centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante (aproximadamente 700 µL) foi retirado com o auxílio de uma micropipeta e colocado em novos tubos “eppendorfs”. Igual volume de clorofórmio:octanol (24:1) foi adicionado, e o material mantido novamente em banho-maria (65 °C, 30 minutos), sendo homogeneizado a intervalos de 5 minutos por inversões dos tubos, e então submetido à centrifugação a 14.000 rpm durante 15 minutos.

Das amostras submetidas à centrifugação, foi retirada a fração superior (700-800 µL de sobrenadante) e colocada em novos tubos “eppendorfs” (2 mL), nos quais foram adicionados 520 µL de isopropanol. Em seguida, os tubos foram colocados em refrigerador por 30 minutos para favorecer a precipitação do DNA e,

posteriormente, centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa (isopropanol) foi descartada, e a parede interior dos tubos seca com uma espátula envolvida com lenço de papel para eliminação dos resíduos. Os tubos foram mantidos abertos para a secagem do precipitado.

Para lavagem do DNA precipitado, foi adicionado 1 mL da solução contendo etanol 76 % e acetato de amônio 10 mM. Os tubos sofreram inversões suaves, e o precipitado foi mantido em imersão por 30 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos, a solução de lavagem descartada e os resíduos eliminados limpando-se a parte interna dos tubos. Ao precipitado lavado adicionaram-se 200 µL de TE (Tris:EDTA), e os tubos foram mantidos à temperatura ambiente para re-suspensão do DNA.

Ao DNA re-suspendido em TE foram adicionados 200 µL de fenol, a mistura foi homogeneizada cuidadosamente por inversões dos tubos e então submetida à centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi retirado e colocado em novos tubos “eppendorfs” (2 mL) aos quais foram adicionados 200 µL de clorofórmio. A homogeneização foi feita por inversão cuidadosa dos tubos que foram submetidos à centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em novos “eppendorfs” de 2 mL. O DNA foi precipitado pela adição de 100 µL de acetato (7,5 M) e 750 µL de etanol absoluto. Os tubos foram mantidos em refrigerador por 15 minutos para favorecer a precipitação do DNA, e então centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os resíduos eliminados limpando-se a parte interna dos tubos. Adicionaram-se então 500 µL de etanol 70 % onde o DNA foi mantido imerso por 20 minutos, e então centrifugado (10.000 rpm, 10 minutos). O etanol foi descartado e limpou-se o interior dos tubos. Para secagem do DNA, os tubos foram mantidos abertos por 15 a 20 minutos. O DNA foi re-suspendido em 50 µL de TE.

3.3 Quantificação das amostras de DNA

A concentração do DNA genômico foi estimada em gel de agarose 0,8 % (p/v) por comparações visuais de sua fluorescência com aquelas de concentrações conhecidas de DNA do fago lambda. Para isso, as amostras foram diluídas na proporção de 1:10 (DNA/TE), a 10 µL dessa diluição foram acrescentados 4 µL de bromofenol e realizada a eletroforese sob voltagem constante (2,5 V/cm) por cerca de 3 horas. Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídeo (10 mg/mL) durante 15 minutos e posteriormente fotografados sob luz UV usando equipamento de fotodocumentação (Geldoc - Bio Rad).

3.4 Inoculação da bactéria nas plantas e avaliação dos sintomas

3.4.1 Seleção do isolado bacteriano

O isolado usado para a inoculação foi selecionado a partir de uma coleção de 50 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* oriundos de diferentes regiões do estado de São Paulo. Essa coleção foi organizada por NAKATANI (2001) e originou-se do agrupamento dos isolados quanto à similaridade genética, feita com base em marcadores RAPD, e da avaliação da agressividade de isolados representantes de cada agrupamento, quando inoculados em plantas de maracujá-amarelo.

Três desses isolados, entre os geneticamente mais distantes, foram submetidos a uma avaliação preliminar de agressividade fazendo-se uma inoculação nos genitores. Assim, foi selecionado para inocular a população de mapeamento o isolado denominado 18b, coletado no município de São Miguel do Arcanjo, SP, por ser este o mais agressivo e provocar maior amplitude de sintomas quanto à área foliar lesionada nos genitores.

3.4.2 Metodologia de inoculação e avaliação dos sintomas

As inoculações foram realizadas em casa de vegetação revestida com plástico para manutenção de condições favoráveis de umidade e temperatura ao desenvolvimento da bactéria (Figura 1). O método empregado foi o de corte com tesoura previamente imersa em suspensão bacteriana (Barbosa, 1995), sendo o corte padronizado em 3 cm. O experimento foi realizado em blocos casualizados com três repetições, cada parcela foi representada por uma planta na qual foram inoculadas três folhas.

Figura 1 - Aspecto do experimento instalado em casa de vegetação para inoculação e avaliação da resistência à bacteriose.

Vinte dias após a inoculação, foi feita a avaliação da área foliar lesionada. As folhas inoculadas foram coletadas e coladas (esticadas) em folhas de papel. A área lesionada foi desenhada manualmente em retrofilme para escrita manual, copiada em papel, recortada, e a área foi determinada utilizando-se um medidor de área foliar Li-Cor (Li-3100, Nebraska, EUA). Cada lesão foi medida três vezes, sendo

tomada a média para estimar o seu tamanho. O parâmetro avaliado foi o tamanho médio de lesão das três folhas inoculadas.

A bactéria foi multiplicada em meio Nutriente Ágar (NA) (10 g peptona, 3 g extrato de carne, 20 g ágar, 1000 mL água) a 37 °C por 48 h antes da inoculação e a suspensão bacteriana obtida a partir da lavagem com água esterilizada das colônias formadas. A padronização da suspensão bacteriana foi feita em espectrofotômetro a 600 nm para O.D 0,3 A. Utilizou-se uma concentração aproximada de 10^8 unidades formadoras de colônia/mL (UFC/mL) para inoculação da bactéria nas plantas, conforme descrito por Wendland (1997).

Os dados foram agrupados em classes e as frequências descritas de forma gráfica e aritmética. O número de classes para agrupar os dados foi definido de acordo com critério baseado na normalidade dos dados (Scott, 1979). O número de classes (K) foi determinado por meio da expressão:

$$K = \frac{Ax n^{1/5}}{3,49xs} \quad (1)$$

na qual: A = amplitude total;
 s = desvio padrão;
 n = tamanho do amostra.

A amplitude de classe (c) foi determinada pela expressão $c = A/(K-1)$.

O limite inferior (LI) da primeira classe foi obtido por $LI = \text{menor valor} - (c/2)$ enquanto o limite superior foi obtido somando-se ao limite inferior o valor de amplitude de classe.

Como limite inferior da segunda classe foi considerado o limite superior da primeira classe. Assim, adicionando a este valor a amplitude de classe, foi obtido o limite superior da segunda classe e, de maneira análoga, foram obtidos os limites das demais classes.

Estabelecidos esses limites, os dados foram agrupados e dispostos em um histograma.

A normalidade dos dados fenotípicos e dos erros a eles associados foi verificada usando o teste de “Lilliefors”. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias ao teste de “Duncan”. As análises foram realizadas usando o programa computacional SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas).

3.5 Análise dos marcadores AFLP

O protocolo usado foi obtido a partir de uma compilação de protocolos disponíveis na literatura, sendo estes derivados dos procedimentos propostos originalmente por Vos et al. (1995).

3.5.1 Digestão do DNA genômico

Duas combinações de enzimas foram utilizadas na digestão do DNA genômico, *EcoRI/MseI* e *PstI/MseI*.

As reações de digestão com a combinação das enzimas *EcoRI/MseI* foram realizadas utilizando-se 300 ng de DNA genômico, 5,0 µL do tampão “One Phor All” 10X (OPA; Amersham), 0,5 µL de solução BSA (Albumina de Soro Bovino) (10 µg/µL), 0,5 µL da enzima *MseI* (10 unidades/µL, New England Biolabs) e 0,5 µL da enzima *EcoRI* (10 unidades/µL, Gibco) em volume final de 50 µL. As reações foram realizadas a 37 °C por três horas, sendo as amostras suavemente agitadas a intervalos de uma hora. Após a restrição, as enzimas foram inativadas a 70 °C por 15 minutos.

Na digestão com a combinação das enzimas *PstI/MseI*, foram utilizados 300 ng de DNA genômico, 5,0 µL do tampão React1 10X (Gibco), 0,5 µL de solução BSA (10 µg/µL), 0,5 µL da enzima *PstI* (10 unidades/µL; Gibco) e 0,5 µL da enzima *EcoRI* (10 unidades/µL; Gibco) em volume final de 50 µL. As condições de reação e inativação foram as mesmas descritas para a combinação *EcoRI/MseI*.

Para verificar a eficiência da digestão, 10 μL da reação foram submetidos à eletroforese (2,5 V/cm) em gel de agarose 1 % por três horas, em TEB 1X (0,09 M Tris/ 0,09 M Ácido Bórico/ 2 mM EDTA). Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídeo (10 mg/mL) durante 15 minutos e posteriormente fotografados sob luz UV.

3.5.2 Preparo dos adaptadores

Os adaptadores sintetizados (Invitrogen) foram recebidos na forma de fita simples e para serem ligados às extremidades coesivas dos fragmentos gerados por restrição foi necessária a sua preparação em fita dupla. Os adaptadores foram preparados em quantidade suficiente para ligações de 120 amostras.

Para o preparo do adaptador *EcoRI* foram utilizados: 3,4 μL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *EcoRI* oligo1 (seqüência CTCGTAGACTGCGTACC), 3,0 μL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *EcoRI* oligo2 (seqüência ATTTGGTACGCAGTCTAC), 6,0 μL do tampão OPA 10X (“One Phor All”, Amersham) e 107,6 μL de água ultrapura. No preparo do adaptador *MseI* foram utilizados: 32,0 μL (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *MseI* oligo1 (seqüência GACGATGAGTCCTGAG), 28,0 μL (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *MseI* oligo2 (seqüência TACTCAGGACTCAT), 7,0 μL do tampão OPA (“Open Phor All”, Amersham) e 53,0 μL de água ultrapura. A reação de união das fitas foi realizada em termociclador a partir de um programa composto de 10 minutos a 65 °C, 10 minutos a 37 °C e 10 minutos a 25 °C. Os adaptadores preparados foram armazenados a –20 °C.

3.5.3 Ligação dos adaptadores aos fragmentos de restrição

Nas reações de ligação foram utilizados 2,0 μL do tampão T4 DNA ligase 5X (Invitrogen), 1,0 μL do adaptador da enzima de corte raro (*EcoRI* ou *PstI*), 1,0 μL do adaptador da enzima de corte freqüente (*MseI*), 1,0 μL da enzima T4 DNA ligase (1 unidade/ μL , Invitrogen), 5,0 μL de água ultrapura e 40 μL da reação de digestão

(item 3.5.1). As reações foram realizadas a 20 °C por três horas, sendo suavemente agitadas a intervalos de uma hora, e as amostras armazenadas a -20 °C.

3.5.4 Reações de amplificação

Os fragmentos obtidos a partir da digestão do DNA genômico foram submetidos a dois programas de amplificação. No primeiro programa, denominado de **pré-amplificação**, foram utilizados iniciadores com um nucleotídeo adicional (nucleotídeo seletivo) no terminal 3'. No segundo programa de amplificação, denominado de **amplificação seletiva**, foram utilizados iniciadores com três nucleotídeos adicionais no terminal 3', sendo o primeiro nucleotídeo correspondente aquele utilizado na pré-amplificação. Foram usados os termocicladores PTC-100 (MJ Research) e PCR-Express (Hybaid). Um esquema geral das etapas da análise de marcadores AFLP é apresentado na Figura 2.

As seqüências dos iniciadores usados nas reações de pré-amplificação e na amplificação seletiva são apresentadas na Tabela 1. Os iniciadores complementares às seqüências dos sítios da enzima *EcoRI* são representados por E+N, sendo N o nucleotídeo seletivo adicionado no terminal 3' do iniciador e os iniciadores das enzimas *MseI* e *PstI* são representados por M+N e P+N, respectivamente. As três combinações de iniciadores, E+A/M+C, E+T/M+G e P+A/M+C, foram usadas.

Nas reações de pré-amplificação foram utilizados 3,0 µL da amostra de DNA (digerido/ligado, item 2.3), 0,5 µL do iniciador da enzima de corte raro (E+A, E+C ou P+A) (50 ng/µL), 0,5 µL do iniciador da enzima de corte freqüente (M+C ou M+G) (50 ng/µL), 4,0 µL de dNTP 2,5 mM (Gibco), 2,0 µL do tampão "Mg Free Buffer" 10X (Promega), 1,2 µL MgCl₂ 25 mM, 0,6 µL de *Taq* DNA polimerase (5,0 unidades/µL; Promega) e 8,2 µL de água ultrapura. O programa da PCR na pré-amplificação foi composto de 26 ciclos de amplificação após desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos. Cada ciclo foi constituído de 1 minuto a 94 °C (desnaturação), 1 minuto a 56 °C (anelamento) e 1 minuto a 72 °C (extensão). O ciclo final foi seguido de uma

extensão para ação da *Taq* polimerase por 5 minutos a 72 °C. Os produtos da pré-amplificação foram diluídos acrescentando-se 80 µL de água ultrapura, e armazenados a -20 °C.

Nas reações de amplificação foram utilizados 1,5 µL do produto da pré-amplificação diluído, 0,5 µL do iniciador das enzimas de corte raro (E+NNN ou P+NNN) (50 ng/µL), 0,6 µL do iniciador M+NNN (50 ng/µL), 1,6 µL de dNTP 2,5 mM (Gibco), 2,0 µL do tampão da *Taq* polimerase 10X (Promega), 1,2 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,32 µL de *Taq* DNA polimerase (5 unidades/µL, Promega) e 12,28 µL de água ultrapura. O programa da PCR na amplificação seletiva consistiu de desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, 12 ciclos compostos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C (-0,7 °C por ciclo) e 1 minuto a 72 °C seguidos de 23 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 56 °C e 1 minuto a 72 °C. O ciclo final foi seguido de 2 minutos a 72 °C. Quando as reações não foram imediatamente usadas, o armazenamento foi feito a -20 °C.

3.5.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida [acrilamida/bisacrilamida (19:1) 6 %, uréia 7.5 M, tampão 1X TEB] de 0,5 mm de espessura. Foi usado o sistema de gel de seqüenciamento "Sequi-Gen GT" (Biorad), com dimensões 38 x 50 cm e fonte de 3.000 V. Foram utilizados pentes formadores de parede de 65 poços com capacidade de aproximadamente 15 µL.

Para o preparo de 1 litro da solução matriz dos géis de poliacrilamida foram utilizados: 420,4 g de uréia, 200 mL de TEB 5X, 150 mL de acrilamida/bisacrilamida 40 % (19:1), sendo o volume final ajustado para 1 L com água ultrapura. A solução matriz foi filtrada (Millipore, 0,2 µm) e armazenada em frascos âmbar, envoltos em papel alumínio, e mantida em refrigerador.

Figura 2 - Procedimentos para análise de marcadores AFLP. **A.** Digestão do DNA genômico usando as enzimas *EcoRI* (corte raro) e *MseI* (corte frequente). **B.** Ligação dos adaptadores às extremidades coesivas dos fragmentos gerados pela digestão. **C.** Pré-amplificação usando guanina como nucleotídeo seletivo no iniciador *EcoRI* e timina no *MseI*. **D.** Amplificação seletiva usando três nucleotídeos seletivos em ambos iniciadores.

Tabela 1. Sequências dos adaptadores e dos iniciadores usados na avaliação das combinações de pré-amplificação e amplificação seletiva.

Enzima		Sequência
<i>EcoRI</i>	adaptador	5'- CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
	iniciadores da pré-amplificação	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3' 5'-GACTGCGTACCAATTCT-3'
	iniciadores da amplificação seletiva (Extensões ANN: AAA, AAC, AAG, ACA, ACC, ACG, ACT, AGA, AGC e AGG. Extensões TNN: TAC, TAT, TTA e TAG)	5'-GACTGCGTACCAATTCANN-3' 5'-GACTGCGTACCAATTCTNN-3'
<i>MseI</i>	adaptador	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
	iniciadores da pré-amplificação	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAAG-3'
	iniciadores da amplificação seletiva (Extensões CNN: CAA, CAC, CAG, CAT, CGC, CGT, CTA, CTC, CTG e CTT. Extensões GNN: GCG, GCA, GCT, GGT, GGA, GGC e GCC)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACNN-3' 5'-GATGAGTCCTGAGTAAGNN-3'
<i>PstI</i>	adaptador	5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3' 3'-CATCTGACGCATGT-5'
	iniciador da pré-amplificação	5'-GACTGCGTACATGCAGA-3'
	iniciador da amplificação seletiva (Extensões ANN: AAA, AAC, AAG, ACA, ACC, ACG, ACT, AGA, AGC e AGG).	5'-GACTGCGTACATGCAGANN-3'

As placas usadas na montagem do gel foram cuidadosamente limpas utilizando-se etanol 95 %. Na placa maior, foram aplicados 2 mL de REPEL (Amersham). O produto foi cuidadosamente espalhado utilizando-se lenços de papel com movimentos circulares, aguardou-se, pelo menos cinco minutos para secagem do produto e o excesso foi retirado com lenço de papel umedecido com água. Para o

tratamento da placa menor, foram misturados em um tubo (1,5 mL) 995 μ L de etanol 95 %, 5 μ L de ácido acético glacial e 5 μ L de BIND (Amersham). Em seguida, o produto foi aplicado sobre a placa menor e cuidadosamente espalhado com lenços de papel e movimentos circulares. Aguardou-se a secagem do produto durante pelo menos 5 minutos e o excesso foi retirado com lenço de papel umedecido com etanol 95 %.

Para o preparo do gel utilizaram-se 120 mL da matriz, 120 μ L de TEMED e 800 μ L de persulfato 10 %. O TEMED e o persulfato foram adicionados imediatamente antes da aplicação da matriz entre as placas.

Ao produto da amplificação seletiva (20 μ L) foram adicionados 10 μ L de tampão formamida (formamida 98 %, EDTA 10 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,002 %, p/v e xileno cianol 0,002 %, p/v). Para desnaturação, as amostras foram submetidas por 5 minutos à temperatura de 95 °C em termociclador e, imediatamente, colocadas em gelo e então aplicadas no gel. Para eletroforese, 14 μ L da amostra desnaturada foram usados.

Para ser submetido à eletroforese, o gel permaneceu por pelo menos 1 hora em processo de polimerização. Na parte superior da cuba foi utilizado TEB 1X e na parte inferior TEB 1X, acetato de sódio 0,375 M. Antes da aplicação, foi realizada uma “pré-corrida” conduzida sob potência constante de 80 W durante uma hora para aquecimento e limpeza do gel. Após a eletroforese, os poços foram cuidadosamente limpos, usando-se uma agulha acoplada a uma seringa, e então carregados com as amostras desnaturadas. Após a aplicação das amostras, procedeu-se a eletroforese sob potência constante de 80 W durante 4 horas e 30 minutos.

3.5.6 Revelação dos géis

Para revelação dos géis, usou-se o método de coloração com nitrato de prata segundo o protocolo proposto por Creste et. al. (2001). Após a eletroforese, as

placas foram cuidadosamente separadas, e o gel aderido à placa menor foi submetido à revelação dentro de bandejas plásticas.

Inicialmente, o gel foi imerso em 2 L de solução para fixação (etanol 10 % e ácido acético 1 %) e mantido sob lenta agitação durante 10 minutos. Após a fixação, o gel foi lavado sob agitação em 2 L de água ultrapura durante um minuto e, então, submetido a um pré-tratamento pela imersão em solução de oxidação (ácido nítrico 1,5 %) durante três minutos.

Retirado da solução de oxidação, o gel foi lavado em 2 L de água ultrapura sob agitação durante um minuto e, em seguida, imerso em 1,5 L da solução para impregnação da prata (AgNO_3 0,2 %) por 20 minutos sob agitação.

Da impregnação, o gel passou por duas lavagens de 30 segundos em 2 L de água ultrapura sob agitação. O gel foi então imerso em 1 L de solução para revelação (Na_2CO_3 3 % e formaldeído 0,02 %) mantendo-se a agitação lenta e constante. Quando começaram a surgir as primeiras bandas e a solução de revelação apresentava-se saturada (escura), o gel foi transferido para 1 L de nova solução de revelação, sempre sob agitação lenta e constante.

Após obter o padrão de revelação desejado, o gel foi transferido para uma bandeja com 2 L de solução bloqueadora (ácido acético glacial 5 %) e mantido cinco minutos sob lenta agitação. Em seguida, foi feita a lavagem final em 2 L de água ultrapura sob agitação durante um minuto.

Os géis foram mantidos à temperatura ambiente para secar, e registrados usando-se um “scanner” (“Hewlett Packard Scanjet 4C”). A leitura das bandas foi realizada diretamente nos géis os quais foram colocados sobre um transiluminador de luz branca.

As soluções de fixação e de nitrato de prata foram utilizadas para três revelações e as soluções de oxidação e fixação para cinco revelações. As soluções foram armazenadas em frascos âmbar. Para o armazenamento e descarte, o nitrato de prata da solução de impregnação foi precipitado usando-se 10 g de cloreto de sódio.

3.5.7 Seleção das combinações de iniciadores

Um total de 174 combinações de iniciadores foi avaliado na amplificação seletiva, sendo 90 combinações E+ANN/M+CNN, 28 combinações E+TNN/M+GNN e 56 combinações P+ANN/M+CNN. Nesta avaliação inicial, foi utilizado o DNA dos genitores e de dois indivíduos da progênie. Das combinações avaliadas, 34 foram analisadas na população segregante (20 combinações E+ANN/M+CNN, quatro combinações E+TNN/M+GNN e 10 combinações P+ANN/M+CNN).

Para identificação das combinações, adotou-se um código no qual os dois primeiros caracteres são as letras que correspondem às enzimas de restrição (*EcoRI* = R, *PstI* = P e *MseI* = M), o terceiro e o quarto caracteres são números que identificam as combinações de acordo com a variação nas extensões dos iniciadores (Tabela 2). O código de identificação dos locos AFLP é composto pelos quatro caracteres que identificam a combinação, seguidos do tamanho do fragmento do loco em pares de base.

3.6 Construção dos mapas de ligação

A construção dos mapas foi baseada na análise de uma amostra de 117 indivíduos F_1 oriundos do cruzamento entre os acessos IAPAR-06 e IAPAR-123. Esta amostra foi analisada com 34 combinações de iniciadores durante a amplificação seletiva (20 E+A/M+C, 4 E+T/M+G e 10 P+A/M+C).

Foram observados locos segregando na proporção 1:1 (presença: ausência da banda), estando estes em homozigose em um genitor (banda ausente) e em heterozigose no outro (banda presente), e locos segregando na proporção 3:1 (presença: ausência da banda), estando estes em heterozigose em ambos genitores, estando a banda presente em ambos. Para a construção do mapa foram usados apenas os locos apresentando segregação 1:1.

Tabela 2. Códigos atribuídos às 34 combinações de iniciadores AFLP usadas na amplificação seletiva da população segregante de maracujá-amarelo.

Combinação de iniciadores		Código	Combinação de iniciadores		Código
<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>		<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>	
E+AAA	M+CGC	EM01	E+AGA	M+CAG	EM19
E+AAA	M+CTA	EM02	E+TAC	M+GGT	EM20
E+AAC	M+CAA	EM03	E+TAG	M+GCT	EM21
E+AAC	M+CGT	EM04	E+TAT	M+GGC	EM22
E+AAG	M+CAA	EM05	E+TTA	M+GGT	EM23
E+AAG	M+CAC	EM06	E+AGA	M+CAA	EM24
E+ACC	M+CTC	EM07			
E+ACC	M+CTG	EM08	<i>PstI</i>	<i>MseI</i>	
E+ACC	M+CTT	EM09	P+ACA	M+CAC	PM01
E+ACG	M+CGC	EM10	P+ACA	M+CAG	PM02
E+ACG	M+CTT	EM11	P+ACC	M+CAC	PM03
E+ACT	M+CGC	EM12	P+ACT	M+CAG	PM04
E+AGG	M+CAA	EM13	P+AGC	M+CGT	PM05
E+AGG	M+CAG	EM14	P+AAC	M+CTA	PM06
E+AGG	M+CTT	EM15	P+ACG	M+CTG	PM07
E+ACA	M+CAA	EM16	P+AGC	M+CTA	PM08
E+ACA	M+CAC	EM17	P+AGA	M+CAC	PM09
E+ACA	M+CTC	EM18	P+AAA	M+CAC	PM10

Para verificar a ocorrência de distorção de segregação, os locos foram submetidos ao teste de aderência de “qui-quadrado” (χ^2). Por se tratar de um procedimento de testes múltiplos, embora seja definido o nível de significância individual i.é., de cada teste, deve-se considerar o nível de significância conjunto, pois se adotando um nível de significância α para cada teste individual, a probabilidade de rejeitar pelo menos uma hipótese nula verdadeira será $^*\alpha = 1 -$ a probabilidade de não rejeitar nenhuma hipótese nula verdadeira, i. é, $^*\alpha = 1 - (1 - \alpha)^t$. Dessa maneira, o nível de significância conjunto cresce à

medida que aumenta o número de testes realizados (Silva & Vencovsky, 2002). O nível de significância representa a probabilidade de se cometer um erro Tipo I (rejeitar uma hipótese nula verdadeira). No caso, a hipótese de nulidade é a de segregação 1:1. Assim, cometer um erro Tipo I implica em admitir a existência de distorção na segregação de um loco que, na realidade, não apresenta distorção.

Para estabelecer o ponto de corte considerando o nível de significância conjunto do teste (α) foi usado o critério da “razão de falsas descobertas” (FDR “false discovery rate”) proposto por Benjamin & Hocheberg (1995). Esta razão é definida como sendo a proporção de hipóteses nulas (H_0) verdadeiras, entre as hipóteses nulas rejeitadas, ou seja, a proporção de erros devidos à falsa rejeição de H_0 , também chamada “proporção de falsos positivos” (Silva & Vencovsky, 2002).

Para determinar o ponto de corte, considerando o critério FDR, foram obtidos para cada loco, individualmente, o valor da estatística χ^2 e o correspondente valor de P (probabilidade sob H_0 , de se obter um valor igual ou superior ao χ^2 calculado com base na amostra). Os valores de P foram ordenados em ordem crescente e a posição do teste individual no “rank” de probabilidades representado pela letra i . Foi adotado como ponto de corte o nível $\alpha = 0,05$ para o conjunto dos t testes, o valor de i a partir do qual foi rejeitada a hipótese H_0 (e de todos os i com P valores iguais ou inferiores) foi determinado a partir da definição:

$$\alpha^* \geq \frac{t P_i}{i} \quad (2)$$

Os locos que apresentaram distorção das proporções mendelianas no “teste de aderência” foram excluídos da construção.

Assim, como proposto por Grattapaglia & Sederoff (1994), de acordo com a estratégia que denominaram de “duplo pseudocruzamento-teste”, os locos segregando na proporção 1:1 foram separados em dois conjuntos, um composto dos

locos em heterozigose no genitor IAPAR-123 e outro dos locos em heterozigose no genitor IAPAR-06. A partir de cada conjunto, foi construído um mapa de cada genitor.

As análises foram realizadas usando-se o programa "Mapmaker" PC versão 3.0 (Lander et al., 1987). Os genótipos das progênies foram codificados atribuindo-se as letras *H* e *A* para representar a condição heterozigótica e homozigótica, respectivamente. Nos géis, *H* corresponde à presença de banda e *A*, à ausência de banda.

Para determinar marcas ligadas em fase de repulsão, o conjunto de dados foi duplicado e re-codificado, ou seja, os genótipos *H* do conjunto original foram codificados como *A* no conjunto duplicado, e vice-versa. No código usado para identificar o loco no conjunto original, acrescentou-se a letra *a*, para indicar acoplamento. No conjunto duplicado, acrescentou-se a letra *r*, para indicar repulsão. Com este artifício, todo grupo de ligação formado terá um grupo espelho constituído pelos mesmos marcadores, a diferença entre esses grupos é a fase de ligação inversa dos locos, ou seja, estando o loco 1 em acoplamento e o 2 em repulsão em determinado grupo, no seu grupo espelho o loco 1 estará em repulsão e o loco 2 em acoplamento. Assim, na construção dos mapas foram eliminados os grupos espelhos.

A separação dos locos nos grupos de ligação foi feita através do comando "group". A atribuição dos locos aos grupos é baseada em testes de ligação considerando os locos dois a dois, utilizando a propriedade transitiva, ou seja, se o loco 1 está ligado ao loco 2 e, por sua vez, o loco 2 está ligado ao loco 3, então os locos 1 e 3 estão ligados. No teste de ligação foi usada a razão 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 interpretação, essa razão é colocada no logaritmo com base 10, sendo este termo definido como "LOD score". Como critérios para determinar a ligação foi usado "LOD score" $> 4,0$ e frequência de recombinação inferior a 0,30. Assim, só foram considerados ligados locos em que a ligação foi no mínimo 10.000 vezes mais provável do que a segregação independente.

Após a determinação dos grupos, foi determinada para cada grupo de ligação a ordem linear dos locos. Para encontrar a ordem mais provável foi usado o comando “order” adotando-se como critério de ordenação “LOD score” > 3,0. O procedimento do comando consiste primeiro em determinar a ordem mais provável de um subconjunto de locos (no “default” do programa são cinco locos) considerados mais informativos (maior valor “LOD score”). Em seguida, as marcas remanescentes para os quais é encontrada uma única posição no mapa são adicionadas uma a uma até que só restem marcas que não possam ser atribuídas, de acordo com os critérios estabelecidos.

Para confirmação da ordem obtida pelo comando “order”, foi usado o comando “ripple”. Com este comando, é estabelecida uma janela (“default”: cinco locos) dentro da qual são feitas trocas entre marcas vizinhas se comparando a probabilidade das diferentes ordens possíveis. Foi usado como critério de confirmação da ordem valor de “LOD score” > 2,0, ou seja, a ordem foi admitida como correta quando esta se apresentou no mínimo 100 vezes mais provável que as ordens alternativas.

Após obter a ordem dos grupos de ligação, usando os comandos “order” e “ripple”, foi feita uma tentativa de adicionar marcas não ordenadas usando o comando “try”. Através deste comando, é possível verificar as possíveis posições dos locos não ordenados no mapa e testar cada inclusão. A ordem, considerando as inclusões, foi então submetida à confirmação usando o comando “ripple” (“LOD score” > 2,0).

As marcas não ordenadas no mapa (“framework”), de acordo com os critérios estabelecidos, foram adicionadas como **marcadores acessórios** usando o comando “place”, que são apresentados ao lado dos marcadores aos quais sua ligação é mais provável.

A função de mapeamento de “Haldane” foi usada para converter as frequências de recombinação em distâncias de mapa que foram expressas em centimorgans:

$$\lambda = -\frac{1}{2} \ln(1 - 2r) \quad (3)$$

sendo, λ = número médio de pontos de permuta no seguimento e r = frequência de recombinação.

Para identificar possíveis erros na identificação dos genótipos foi usada a função “error detection”.

3.7 Detecção e mapeamento de QRLs

3.7.1 Regressão linear múltipla

A análise de **regressão linear múltipla** foi realizada usando as marcas como variáveis independentes e as características fenotípicas como variáveis dependentes conforme procedimentos descritos por Edwards et al. (1987). O coeficiente de determinação parcial foi usado para estimar a proporção da variação fenotípica explicada pelos marcadores. Apenas marcas que não apresentaram distorção da segregação foram incluídas nas análises.

A seleção das marcas que entraram no modelo de regressão (variáveis regressoras) foi feita pelo procedimento “Stepwise” (Draper & Smith, 1981). Por este procedimento, o modelo de regressão é iniciado pela marca com maior valor de F parcial entre os significativos. Seleciona-se entre os demais marcadores candidatos a entrar no modelo, o que tem o valor mais alto de F parcial, na presença do primeiro marcador. Se, no modelo formado, os marcadores apresentarem teste F significativo eles permanecem, caso contrário, são retirados do modelo. O processo é repetido até que todos os marcadores candidatos a entrar no modelo sejam avaliados, e o modelo final seja composto por marcadores com F parcial significativo. Foi adotado o nível de significância de 0,05 tanto para os marcadores entrarem, como para permanecerem no modelo. Dessa forma, foram incluídos no modelo final apenas os marcadores com evidência de ligação a algum QRL evitando-se a redundância de informação entre eles.

Para realizar as análises, considera-se que o fenótipo dos indivíduos pode ser descrito pelo seguinte modelo:

$$y_i = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_{ji} + e_i \quad (4)$$

em que:

y_i : valor da característica analisada para o indivíduo i ;

b_0 : intercepto do modelo;

b_j : coeficiente de regressão parcial do marcador j ;

x_{ij} : variável "dummy", que assume os valores 0 e 1 de acordo com genótipo da marca j para o indivíduo i .

e_i : erro do modelo;

As análises foram realizadas usando o pacote estatístico SAS ("Statistical Analysis System Software") (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

3.7.2 Mapeamento por intervalo composto

Na análise de **mapeamento por intervalo composto** foram usados os mapas de ligação dos genitores IAPAR-06 e IAPAR-123. Convém salientar que os marcadores acessórios não são usualmente considerados nas análises, mas somente os ordenados no "framework" (mapa referência). O procedimento "Stepwise" foi usado para seleção das variáveis regressoras, e o nível de significância de 5 % tanto para as marcas entrarem como para permanecerem. Para determinar o ponto de corte para declarar a presença de um QRL em uma determinada posição foi empregada a técnica de **baralhamento de dados** (Churchil & Doerge, 1994) usando 1.000 permutações e nível de significância de 5 %. Segundo Zeng (1994), o fenótipo de um indivíduo, dado o seu genótipo e considerando as marcas M_j e M_{j+1} flanqueando um determinado intervalo, pode ser representado pelo modelo:

$$y_i / (M_j M_{j+1})_i = b_0 + b^* x_i^* + \sum_{l \neq j, j+1}^k b_l x_{il} + e_i \quad (5)$$

em que:

y_i : valor da característica analisada no indivíduo i ;

$(M_j M_{j+1})$: genótipo do indivíduo i para os marcadores j e $j + 1$;

b_0 : intercepto do modelo;

b^* : efeito do QTL localizado entre os marcadores j e $j + 1$;

x_i^* : variável “dummy”, que assume os valores 0 ou 1 com probabilidades que são função de r_1 (frequência de recombinação entre uma das marcas e o eventual QTL no intervalo) e do genótipo de y_i com relação aos marcadores j e $j + 1$;

b_l : coeficiente de regressão parcial do valor da característica y para o marcador l ;

x_{ij} : variável “dummy”, que assume os valores 0 ou 1 dependendo do genótipo do marcador l no para o indivíduo i ;

e_i : erro do modelo;

Portanto, nesse modelo, x_i^* refere-se ao possível QTL localizado entre os marcadores j e $j + 1$ e x_{ij} aos marcadores selecionados para o controle do “background” genético.

Considerando o delineamento genético retrocruzamento, a função “densidade de probabilidade” do indivíduo i é dada por:

$$f[y_i (M_j M_{j+1})] = P_i(x_i^* = 1) f(\mu_{qq}) + P_i(x_i^* = 0) f(\mu_{qq}) \quad (6)$$

em que:

$f(\mu_{Qq})$ e $f(\mu_{qq})$ são densidades normais com médias μ_{Qq} e μ_{qq} ,

respectivamente, sendo:

$$\mu_{Qq} = b_0 + b^* + \sum_{l \neq j, j+1}^k b_l x_{li} \quad (7)$$

e

$$\mu_{qq} = b_0 + \sum_{l \neq j, j+1}^k b_l x_{li} \quad (8)$$

A partir da definição da função densidade de probabilidade dos indivíduos amostrados, é obtida a função de máxima verossimilhança:

$$L(y; r_1, b_0, b_1, \dots, b^*, \dots, b_k, \sigma^2) = \prod_{i=1}^n f(Y_i | (M_j, M_{j+1})_i) \quad (9)$$

Para uma posição fixa do QTL dentro do intervalo, a partir das equações de máxima verossimilhança obtêm-se:

$$\hat{b}^* = (y - X\hat{B})\hat{P} / \hat{c} \quad (10)$$

$$\hat{B} = (X'X)^{-1} X'(y - \hat{P}\hat{b}^*) \quad (11)$$

$$\hat{\sigma}^2 = [(y - X\hat{B})'(y - X\hat{B}) - \hat{c}\hat{b}^{*2}] / n \quad (12)$$

nas quais y é o vetor de observações; $\hat{B}$ é o vetor de parâmetros relativo às marcas fora do intervalo considerado e incluindo a constante; X é a matriz de incidência destas marcas; $\hat{P}$ é um vetor com elementos $\hat{P}_i$ especificando para cada indivíduo, a probabilidade de $X_i^* = 1$;

$$\hat{P}_i = P_i[X_i^* = 1]f(\hat{\mu}_{qq}, \hat{\sigma}^2)_i / \{P_i[X_i^* = 1]f(\hat{\mu}_{qq}, \hat{\sigma}^2)_i + P_i[X_i^* = 0]f(\hat{\mu}_{qq}, \hat{\sigma}^2)_i\} \quad (13)$$

e

$$\hat{c} = \sum_{i=1}^n \hat{P}_i \quad (14)$$

Para uma posição fixa do eventual QTL dentro do intervalo considerado, com chutes iniciais de μ_{qq} e μ_{qq} , é usado um algoritmo que alterna passos de esperança no cálculo de $\hat{P}_i$ e maximização usando as soluções de máxima verossimilhança, sendo assim obtidas as estimativas dos parâmetros para o eventual QTL.

A hipótese a ser testada é:

$$H_0: b^* = 0 \text{ e } H_1: b^* \neq 0 \quad (15)$$

Para cada posição dentro do intervalo é calculado o valor do “LOD score”, o qual é obtido por:

$$LOD = -\log_{10} \frac{L(b^* = 0, \hat{B}, \hat{\sigma}_2^2)}{L(b^*, \hat{B}, \hat{\sigma}_2^2)} \quad (16)$$

A distribuição dos valores do “LOD score” ao longo dos grupos de ligação foi apresentada de forma gráfica. As análises foram realizadas usando o programa “QTL Cartographer” (versão 2.0, Windows).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da resistência à bacteriose

Observou-se variação na área foliar lesionada entre os indivíduos da população segregante. Uma amostra de folhas de diferentes indivíduos está mostrada na Figura 3, e os resultados referentes à avaliação fenotípica da área foliar média lesionada (AFML) dos 117 indivíduos dessa população e de seus genitores são apresentados na Tabela 3. Na Tabela 4, estão as estatísticas descritivas referentes a esses dados.

Os dados fenotípicos foram distribuídos em 8 classes (Figura 4). De acordo com o teste “Lilliefors”, tanto os dados fenotípicos como os erros a eles associados não apresentaram distribuição normal. Sendo assim, os dados foram transformados ($\sqrt{x}$) para serem submetidos à análise de variância (Tabela 5) e ao teste de médias (Tabela 3). A distribuição fenotípica dos dados sugere que o caráter tenha controle genético oligogênico.

O coeficiente de variação dos dados originais foi de 27,36 % e dos dados transformados 13,16 %. O erro experimental na avaliação fenotípica da AFML foi favorecido pela dificuldade encontrada para padronizar o tipo de folha para a inoculação (idade, tamanho, forma, textura e posição na planta), o que se presume ter influência no tamanho da área foliar lesionada. Outro aspecto a ser considerado é que, em alguns casos, a folha inoculada entrou em senescência apresentando clorose, o que prejudicou a delimitação correta da área lesionada. Em caso de dúvida, essas folhas foram descartadas. Ocorreu também queda de folhas e morte de plantas, e por isso não foi possível usar um número balanceado de observações para

obtenção das médias dos indivíduos da população segregante. Foram perdidas 71 observações das 351 possíveis (117 indivíduos X 3 repetições). O uso de um maior número de repetições, na condução de novos experimentos deverá, em análises futuras, melhorar as estimativas das médias das progênies.

A variação na AFML das progênies que pode ser verificada tanto nas estatísticas descritivas da análise fenotípica como na análise gráfica da distribuição das médias, associada à significância do efeito de progênies na ANAVA e às diferenças significativas indicadas no teste de médias, demonstraram a existência de variação e segregação genética nas progênies, sendo possível, portanto, a identificação de genes de resistência a partir da análise de mapeamento.

Embora a literatura relate a ocorrência de variação para a resistência à bacteriose em maracujá-amarelo (Kuroda, 1981; Wendland, 1997; Piza Junior, 1998; Quadros et al., 2002), não havia sido, até então, estudada a segregação desse caráter em progênies obtidas de cruzamentos controlados, o que é fundamental para entender a natureza genética da resistência e para a definição de estratégias de melhoramento. Os resultados aqui obtidos são pioneiros e informativos. Contudo, é necessário que outras populações segregantes, obtidas de diferentes fontes de resistência, sejam também estudadas para gerar um conhecimento mais amplo do controle genético da resistência à bacteriose, e a fim de explorá-lo de maneira eficiente no desenvolvimento de variedades resistentes. Ressalte-se também a importância do estudo de diferentes isolados da bactéria, pois como foi demonstrado em análises da diversidade genética de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* (Gonçalves & Rosato, 2000; Nakatani, 2001), existe variabilidade genética, inclusive para a agressividade dos isolados, o que sugere a possibilidade de ocorrência de interações patógeno X hospedeiro, as quais podem ser importantes na definição das estratégias de melhoramento.

Figura 3 - Variação na área foliar lesionada de plantas de *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. aos 20 dias após a inoculação com o isolado 18b (Nakatani, 2001) da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*.

Tabela 3. Área foliar média lesionada (AFML) de 117 indivíduos F_1 e seus genitores inoculados com o isolado 18b (Nakatani, 2001) de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*.

Indivíduo	AFML	Teste Duncan*
6(4)	25,12	a
III(11)	24,36	a
17(25)	23,97	ab
8(11)	23,77	ab
17(21)	23,62	ab
11(1)	23,41	ab
21(5)	22,91	abc
17(2)	22,78	abc
1(3)	20,60	bcd
3(6)	20,57	bcd
17(32)	19,75	cde
IAPAR-06	19,47	def
12(21)	19,35	def
5(5)	19,34	def
17(17)	18,29	defg
3(7)	17,85	defgh
12(10)	17,60	defghi
12(8)	17,50	defghi
9(4)	16,56	efghij
12(23)	16,40	efghijk
13(2)	16,05	fghijkl
3(4)	15,98	fghijklm
XV(13)	15,82	ghijklmn
III(2)	15,81	ghijklmn
8(8)	15,50	ghijklmno
17(13)	15,22	ghijklmnop
3(10)	14,38	hijklmnopq
17(36)	14,17	ijklmnopqr
17(42)	14,16	ijklmnopqr
5(3)	14,13	ijklmnopqr

Tabela 3. Área foliar média lesionada (AFML) de 117 indivíduos F_1 e seus genitores inoculados com o isolado 18b (Nakatani, 2001) de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*.

Indivíduo	AFML	Teste Duncan
17(27)	14,05	ijklmnopqrs
5(4)	14,00	ijklmnopqrst
III(7)	13,87	ijklmnopqrstu
17(22)	13,56	ijklmnopqrstuv
21(1)	13,52	ijklmnopqrstuv
III(13)	13,48	ijklmnopqrstuv
8(2)	13,41	ijklmnopqrstuv
21(4)	13,30	ijklmnopqrstuvx
XV(8)	13,26	ijklmnopqrstuvx
8(1)	13,07	ijklmnopqrstuvxz
6(8)	12,96	ijklmnopqrstuvxza
17(43)	12,91	ijklmnopqrstuvxza
III(16)	12,78	klmnopqrstuvxzaB
3(5)	12,75	klmnopqrstuvxzaB
5(8)	12,63	lmnopqrstuvxzaABC
17(1)	12,61	lmnopqrstuvxzaABC
17(39)	12,56	lmnopqrstuvxzaABCD
12(13)	12,49	lmnopqrstuvxzaABCDE
III(8)	12,34	lmnopqrstuvxzaBCDEF
4(1)	12,30	mnpqrstuvxzaABCDEFG
10(1)	12,26	nopqrstuvxzaABCDEFG
III(3)	12,18	nopqrstuvxzaABCDEFGH
9(2)	12,11	nopqrstuvxzaABCDEFGHI
17(18)	12,09	nopqrstuvxzaABCDEFGHI
14(1)	12,08	opqrstuvxzaABCDEFGHI
13(9)	12,04	opqrstuvxzaABCDEFGHIJ
17(34)	12,03	opqrstuvxzaABCDEFGHIJ
17(28)	11,98	opqrstuvxzaABCDEFGHIJ
17(37)	11,96	opqrstuvxzaABCDEFGHIJ
17(30)	11,77	opqrstuvxzaABCDEFGHIJK

Tabela 3. Área foliar média lesionada (AFML) de 117 indivíduos F_1 e seus genitores inoculados com o isolado 18b (Nakatani, 2001) de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*.

Indivíduo	AFML	Teste Duncan
3(12)	11,71	pqrstuvxzABCDEFGHijkl
18(6)	11,64	pqrstuvxzABCDEFGHijkl
18(3)	11,34	qrstuvxzABCDEFGHijkl
2(3)	11,28	qrstuvxzABCDEFGHijklm
12(11)	11,28	qrstuvxzABCDEFGHijklm
4(3)	11,15	qrstuvxzABCDEFGHijklmn
2(1)	11,13	qrstuvxzABCDEFGHijklmn
5(1)	10,85	qrstuvxzABCDEFGHijklmno
4(7)	10,77	qrstuvxzABCDEFGHijklmnop
12(14)	10,74	qrstuvxzABCDEFGHijklmnop
6(3)	10,70	qrstuvxzABCDEFGHijklmnop
XV(9)	10,67	qrstuvxzABCDEFGHijklmnop
12(19)	10,62	qrstuvxzABCDEFGHijklmnopq
12(3)	10,46	rstuvxzABCDEFGHijklmnopq
17(26)	10,29	stuvxzABCDEFGHijklmnopqr
XV(2)	10,24	tuvxzABCDEFGHijklmnopqr
17(11)	10,13	uvxzABCDEFGHijklmnopqr
12(5)	10,12	uvxzABCDEFGHijklmnopqr
8(12)	10,11	uvxzABCDEFGHijklmnopqr
16(5)	10,03	vxzABCDEFGHijklmnopqr
1(1)	9,99	vxzABCDEFGHijklmnopqrs
5(2)	9,96	vxzABCDEFGHijklmnopqrs
4(5)	9,89	vxzABCDEFGHijklmnopqrs
18(1)	9,83	vxzABCDEFGHijklmnopqrs
8(7)	9,82	vxzABCDEFGHijklmnopqrs
10(5)	9,59	xzABCDEFGHijklmnopqrs
12(7)	9,27	zABCDEFGHijklmnopqrs
13(7)	9,27	zABCDEFGHijklmnopqrs
6(1)	9,22	ABCDEFGHijklmnopqrs
16(1)	9,19	ABCDEFGHijklmnopqrs

Tabela 3. Área foliar média lesionada (AFML) de 117 indivíduos F_1 e seus genitores inoculados com o isolado 18b (Nakatani, 2001) de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*.

Indivíduo	AFML	Teste Duncan
12(4)	9,06	BCDEFGHIJKLMNOPQRS
2(4)	9,03	BCDEFGHIJKLMNOPQRS
8(4)	8,91	CDEFGHIJKLMNOPQRS
III(4)	8,87	CDEFGHIJKLMNOPQRST
2(7)	8,77	DEFGHIJKLMNOPQRST
13(6)	8,76	DEFGHIJKLMNOPQRST
12(2)	8,71	EFGHIJKLMNOPQRST
17(38)	8,65	FGHIJKLMNOPQRST
17(20)	8,58	FGHIJKLMNOPQRST
2(5)	8,56	FGHIJKLMNOPQRST
17(16)	8,48	GHIJKLMNOPQRST
III(17)	8,42	HIJKLMNOPQRSTU
4(2)	8,37	HIJKLMNOPQRSTU
9(3)	8,31	IJKLMNOPQRSTU
10(3)	8,23	JJKLMNOPQRSTU
17(41)	8,10	KLMNOPQRSTU
2(6)	7,92	LMNOPQRSTU
17(3)	7,54	MNOPQRSTU
III(18)	7,48	NOPQRSTU
12(22)	7,32	OPQRSTUV
8(10)	7,01	PQRSTUV
20(1)	6,85	QRSTUV
8(9)	6,67	RSTUV
10(2)	6,59	RSTUV
13(3)	6,26	STUV
12(15)	5,22	TUV
XV(7)	4,82	UV
IAPAR-123	3,89	VX
16(4)	1,14	X

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5 %.

Tabela 4. Estatísticas descritivas referentes à área foliar média lesionada (cm²) dos 117 indivíduos da população segregante inoculados com o isolado 18b (Nakatani, 2001) da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*.

Estatística	Repetição			Média	Experimento
	1	2	3		
Máximo	28,45	31,82	26,94	25,12	31,82
Mínimo	0,96	1,98	0,48	1,14	0,48
Média	12,97	13,01	11,20	12,40	12,36
Desvio Padrão	5,45	5,43	4,39	4,57	5,15

Tabela 5. Análise de variância da área foliar média lesionada (cm²) dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123 e de 117 indivíduos F₁ inoculados com o isolado 18b (Nakatani, 2001) da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* (dados transformados $\sqrt{X}$).

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrado	Quadrado médio	F	Significância
Repetição	2	2,60	1,30		
Tratamento	118	116,58	0,99	4,74	< 0,00001
Resíduo	163	33,95	0,21		

CV(%)=13,28

Figura 4 - Distribuição da variável área foliar média lesionada (cm²) de 117 indivíduos da população segregante (F₁) inoculados com o isolado 18b (Nakatani, 2001) da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*.

4.2 Seleção das combinações de iniciadores

Na avaliação das combinações de iniciadores usados para gerar os padrões de AFLP, foi utilizado o DNA dos genitores e de dois indivíduos F₁. Os locos em que o fragmento foi amplificado em apenas um dos genitores foram considerados polimórficos. Na maioria dos casos, pelo pequeno tamanho da amostra, não foi possível inferir se o loco polimórfico amplificado apresentava-se em heterozigose ou homozigose no genitor.

A escolha das combinações de iniciadores foi baseada no número de locos polimórficos e na qualidade dos locos quanto à nitidez das bandas. Procurou-se, dentro do possível, usar combinações sem repetir um mesmo iniciador.

Foram testadas 174 combinações de iniciadores na amplificação seletiva, sendo 90 combinações E+ANN/M+CNN, 28 combinações E+TNN/M+GNN e 56 combinações P+ANN/M+CNN. Todas as combinações apresentaram marcas polimórficas, e isto se deve ao grande número de fragmentos amplificados e visualizados no gel por combinação de iniciadores, associado ao nível de heterozigose dos genitores.

Considerando as 174 combinações, foram amplificados cerca de 10.200 fragmentos (locos), uma média de aproximadamente 60 fragmentos por combinação de iniciadores. No total, 1.355 locos (~13 %) apresentaram-se polimórficos, em média, aproximadamente 8 por combinação de iniciadores. Usando as 90 combinações E+ANN/M+CNN foram amplificados, aproximadamente, 4.800 fragmentos, dos quais 672 (~14 %) foram identificados como polimórficos. O número de fragmentos amplificados por combinação variou de 23 a 113 (em média, 54 fragmentos/combinação). A partir das 28 combinações E+TNN/M+GNN foram amplificados 1.965 locos entre os quais foram identificados 236 (~12 %) polimórficos. O número de fragmentos amplificados por combinação variou de 52 a 92 (em média, 70 fragmentos/combinação). Pelas 56 combinações P+ANN/M+CNN foram amplificados cerca de 3.400 fragmentos e identificados 447 (~13 %) locos polimórficos. O número de fragmentos amplificados por combinação variou de 29 a 103 (em média, 61 fragmentos/combinação). Esses resultados indicam que o polimorfismo entre as combinações de enzimas testadas é semelhante.

Cabe ressaltar que o número de locos amplificados é referente àqueles fragmentos que puderam ser separados individualmente, sendo o número real superior ao considerado. Isto porque, na parte superior dos géis de AFLP, em algumas combinações, ocorrem sobreposições de fragmentos de grande tamanho (> 800 bases), o que não permite que eles sejam analisados. Por isso, muitos dos fragmentos amplificados foram desconsiderados. Contudo, houve combinações em que as bandas de alto peso molecular apresentaram separação adequada para análise genotípica. Aproximadamente, 10 % dos fragmentos analisados mostraram tamanho superior a 800 bases. Para obter maior separação das bandas de alto peso,

visualizadas na parte superior do gel, acetado de sódio 0,375 M foi adicionado ao TEB da parte inferior da cuba de eletroforese, por isso o uso do acetato de sódio promove um gradiente de migração, tornando a migração dos fragmentos mais lenta na parte inferior do gel. Assim, a duração da eletroforese, que nos testes iniciais era de 4 horas, passou a ser realizada por 4 horas 30 minutos, o que melhorou a separação dos fragmentos maiores, sem que fragmentos de menor tamanho fossem perdidos na parte inferior do gel.

Carneiro et al. (2001) analisaram os genitores IAPAR-06 e IAPAR-123 e uma amostra de seis indivíduos da geração F_1 para cada um dos 380 iniciadores RAPD analisados; destes, 113 (29,7 %) apresentaram locos polimórficos. Os autores identificaram 3.428 fragmentos amplificados, em média 9 por iniciador. O número de locos amplificados por reação de AFLP foi, em média, mais de 6 vezes superior ao número de fragmentos amplificados por iniciador aleatório (RAPD). Costa et al. (2000) usaram marcadores RAPD e AFLP para a construção de um mapa genético de *Pinus pinaster* e concluíram que a técnica AFLP teve custo, por marcador, três vezes inferior à metodologia de RAPD. Além disso, o tempo gasto para obtenção dos marcadores AFLP foi duas vezes inferior à obtenção dos RAPDs. Por estas características, os AFLPs têm sido preferidos na construção de mapas genéticos.

Das 174 combinações, 34 foram analisadas em toda a população segregante (20 combinações E+ANN/M+CNN, 4 combinações E+TNN/M+GNN e 10 combinações P+ANN/M+CNN) (Tabela 6). A partir dessas 34 combinações foram amplificados 419 locos polimórficos; isto significa, aproximadamente, 12 locos polimórficos por combinação sendo 327 *EcoRI/MseI* (~14 locos/combinação) e 92 *PstI/MseI* (~9 locos/combinação). Entre as 24 combinações usando as enzimas *EcoRI* e *MseI*, o número de locos polimórficos (1:1 e 3:1) variou de 7 a 24 e, entre as combinações de *PstI* com *MseI*, variou de 3 a 15. Entre os locos amplificados, 77 e 88 % deles, oriundos, respectivamente, das combinações *EcoRI/MseI* e *PstI/MseI*, tiveram seu peso molecular variando entre 50 e 500 bases (Figura 6). O tamanho dos fragmentos amplificados é função da frequência dos sítios de restrição das enzimas usadas para a digestão do DNA. Usando enzimas de corte frequente (sítios de

restrição de 4 pb) associadas a enzimas de corte raro (sítios de restrição de 6 pb) espera-se que a maior parte das bandas tenha tamanho variando de 50 a 800 bases (Vos et al., 1995; Lopes et al., 2003). A Figura 6 mostra parte da imagem de um gel AFLP corado com nitrato de prata: à direita do marcador de peso molecular (50 – 800 pb) estão os genitores IAPAR-06 e IAPAR-123, as outras amostras são indivíduos da população segregante.

Dos 419 locos polimórficos, detectados pelas 34 combinações de enzimas e considerando os 117 indivíduos F_1 , 303 segregaram na proporção 1:1 (alelos monoparentais), sendo 144 (47,5 %) presentes no genitor IAPAR-06 e 159 (52,5 %) no IAPAR-123, e 116 segregando na proporção 3:1 (alelos biparentais). Considerando apenas os locos monoparentais (segregação 1:1), a média foi de 8,91 locos polimórficos/combinação. Para locos biparentais (segregação 3:1), a média foi de 3,4 locos polimórficos/combinação (Tabela 6).

A heterozigosidade dos acessos foi comparada considerando os locos polimórficos monoparentais (303 locos com segregação 1:1). No acesso IAPAR-06 o nível de heterozigosidade foi de 47,52 % (144/303) e no acesso IAPAR-123 foi de 52,47 % (159/303). Estas estimativas corroboram os resultados obtidos por Carneiro et al. (2001) que usaram 269 locos RAPD monoparentais: os autores encontraram níveis de heterozigosidade de 45 % no acesso IAPAR-06 e 54 % no acesso IAPAR-123. O nível de heterozigosidade é um dos fatores que influencia na diferença do comprimento de mapas de ligação obtidos de plantas individuais quando é usada a estratégia “duplo pseudocruzamento-teste” (Atienza et al., 2002). Altos níveis de heterozigosidade são esperados em espécies auto-incompatíveis (Hemmat et al., 1994; Crouzillat et al., 1996) e perenes (ciclo longo) (Carlson et al., 1991; Kubiasiak et al., 1995).

Figura 5 - Parte da imagem de um gel AFLP corado com nitrato de prata. Na linha central foi usado um marcador 50 pb, as duas linhas à direita marcador correspondem aos genitores de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* IAPAR-06 e IAPAR-123, respectivamente, as demais representam indivíduos F₁.

Tabela 6. Polimorfismos de AFLP detectados entre os genitores IAPAR-06 e IAPAR-123. Dados obtidos a partir de 34 combinações de iniciadores para amplificação de fragmentos gerados por corte com as enzimas *EcoRI/MseI* e *PstI/MseI*, e três nucleotídeos arbitrários na amplificação seletiva.

Combinação de iniciadores	Número de locos polimórficos				
	Segregação 1:1		Total	Segregação 3:1	Total
	IAPAR-06	IAPAR-123			
EM01	8	5	13	2	15
EM02	5	6	11	5	16
EM03	3	6	9	4	13
EM04	4	5	9	2	11
EM05	3	2	5	4	9
EM06	3	6	9	5	14
EM07	6	3	9	1	10
EM08	5	3	8	3	11
EM09	4	4	8	6	14
EM10	2	4	6	1	7
EM11	3	3	6	1	7
EM12	1	4	5	2	7
EM13	7	6	13	5	18
EM14	3	4	7	4	11
EM15	5	8	13	3	16
EM16	8	8	16	8	24
EM17	3	6	9	5	14
EM18	7	3	10	6	16
EM19	5	5	10	3	13
EM20	5	4	9	5	14
EM21	6	7	13	7	20
EM22	8	7	15	2	17
EM23	3	4	7	3	10
EM24	8	9	17	3	20
Total EM	115	122	237	90	327
Média EM	4,79	5,08	9,88	3,75	13,63
PM01	3	3	6	2	8
PM02	5	4	9	6	15
PM03	1	4	5	6	11
PM04	5	4	9	6	15
PM05	1	1	2	1	3
PM06	3	7	10	2	12
PM07	1	3	4	2	6
PM08	3	4	7	0	7
PM09	5	2	7	1	8
PM10	3	5	8	0	8
Total PM	29	37	66	26	92
Média PM	2,9	3,7	6,6	2,6	9,2
Total Geral	144	159	303	116	419
Média Geral	4,24	4,68	8,91	3,41	12,32

Figura 6 - Tamanho dos fragmentos dos 237 locos AFLP polimórficos (segregação 1:1) entre os acessos de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. gerados pela combinação de enzimas *EcoRI/MseI* (A) e dos 66 gerados por *PstI/MseI* (B).

4.3 Mapas de ligação

Entre os locos polimórficos, aqueles que não apresentaram qualidade de revelação suficiente para a identificação genotípica, ou para os quais se dispunha dos genótipos de menos do que 100 indivíduos foram eliminados das análises. Por isso, restaram 263 locos monoparentais, sendo 118 do genitor IAPAR-06 e 145 do IAPAR-123. Estes locos foram submetidos ao teste χ^2 . De acordo com o critério FRD, a hipótese H_0 foi rejeitada para 8 locos (3 %) i.é, estes locos apresentaram segregação distorcida. A proporção de locos com distorção na segregação foi semelhante em ambos genitores. No acesso IAPAR-123,5 (3,5 %) dos 145 locos apresentaram distorção de segregação enquanto no acesso IAPAR-06, 3 em 118 (2,5 %).

Se usado apenas o nível de significância individual, $\alpha = 0,05$, teriam sido considerados com desvios da segregação 20 (~17 %) locos do acesso IAPAR-06 e 8 (5,5 %) locos do IAPAR-123. Entretanto, quando se aplicou o critério FDR, foram incluídos mais 18 locos do acesso IAPAR-06 e 3 locos do IAPAR-123 na construção dos mapas. Portanto, esses locos não seriam incluídos se o critério para declarar a segregação distorcida fosse apenas o nível de significância para o teste individual do χ^2 de 0,05. Critérios que controlam o nível de significância global são recomendados para evitar que seja cometido o erro do tipo I quando são realizados testes múltiplos (Bearzoti, 2000; Silva & Vencovsky, 2002). No caso, isto corresponde a rejeitar erroneamente um loco que apresenta o padrão de segregação testado em H_0 . Carneiro et al. (2002) analisando 269 marcadores RAPD e usando o nível de significância individual de 0,05, encontraram aproximadamente 5,0 % de locos com distorção de segregação no genitor IAPAR-06 e 5,4 % no genitor IAPAR-123. A proporção de locos RAPD com distorção, no caso do acesso IAPAR-123, foi semelhante, mas quanto ao acesso IAPAR-06, foi inferior as encontradas no presente trabalho.

Distorções da segregação esperada de locos AFLP têm sido observadas em inúmeras espécies. Esta proporção é inerente à espécie e aos genótipos usados para gerar a população segregante. Em kiwi, foram relatadas taxas de distorção que

variaram de 4 a 10 % (Testolin et al., 2001), em *Populus*, taxas de 7 % (Wu et al., 2000) e em *Cryptomeria japonica*, taxas superiores a 40 % (Nikaido et al., 1999; Nikaido et al., 2000). Essa distorção pode ser de natureza biológica ou experimental (Liu, 1998; Vogl & Xu, 2000). A distorção de natureza biológica é causada pela proximidade física dos locos marcadores com regiões ou genes que afetam a formação dos gametas antes da fertilização ou, a viabilidade dos genótipos após a fertilização (pós-zigótica) (Vogl & Xu, 2000). Exemplos desses fatores biológicos são o knob heterocromático no cromossomo 10 em milho (Grant, 1975 citado por Vogl e Xu, 2000) e genes que afetam a proporção de sexos em *Drosophila* e em ratos (alelos-*t*) (Hartl & Clark, 1997). Dentre as causas experimentais incluem-se o uso de pequenas populações e erros de identificação genotípica (Liu, 1998; Vogl & Xu, 2000).

Locos que apresentam distorção da segregação mendeliana afetam os testes estatísticos usados para detectar a ligação podendo gerar falsos positivos. Assim, recomenda-se que esses locos não sejam incluídos na construção dos mapas de ligação (Bearzoti, 2000; Liu, 1998).

Analisando os 18 locos que mostraram desvios significativos na taxa de segregação pelo teste χ^2 individual (ao nível de confiança de 0,05), e que foram incluídos no mapa do acesso IAPAR-06 usando o critério FDR, verificou-se que 10 (56 %) foram locados no grupo 1, e 6 (33 %) no grupo 2. Observou-se valores semelhantes de χ^2 para os locos com proximidade física. Isso indica que a distorção não foi um problema individual dos locos, mas sim de todos aqueles localizados nessas regiões, e que os desvios das taxas de segregação não foram devidos a erros de genotipagem sugerindo que os desvios sejam de natureza biológica.

De acordo com o critério FDR, os locos apresentando distorção foram eliminados da construção do mapa. Sendo assim, 115 locos foram usados para gerar o mapa do acesso IAPAR-06 e 140 para gerar o mapa do IAPAR-123.

No mapa do acesso IAPAR-06 (Figura 7), 112 marcadores foram agrupados e 3 (2,6 %) segregaram independentemente. Dos marcadores agrupados, 72 (64,3 %) foram ordenados com “LOD score” > 2,0 e 40 (35,7 %) foram alocados no mapa como acessórios. Os grupos de ligação foram constituídos de 3 a 36

marcadores e o número de marcadores ordenados por grupo de ligação variou de 3 a 16. O comprimento do menor grupo foi de 11,9 cM e o do maior de 208,9 cM. O comprimento total do mapa, correspondente à soma do comprimento de cada um dos 9 grupos, foi de 790,2 cM (Haldane) (Tabela 7).

Tabela 7. Marcadores AFLP e comprimento em centimorgans (cM) (Haldane) de cada grupo de ligação do mapa de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., acesso IAPAR-06.

Grupo de ligação	Número de marcadores agrupados	Número de marcadores ordenados	Número de marcadores acessórios (%)	Comprimento (cM)
1	36	16	20 (55,6)	208,9
2	16	10	6 (37,5)	156,9
3	20	12	8 (40,0)	108,9
4	14	11	3 (21,5)	104,2
5	9	7	2 (22,2)	93,5
6	6	5	1 (16,7)	66,2
7	5	5	0	30,9
8	3	3	0	13,4
9	3	3	0	11,9
Total	112	72	40 (35,7)	790,2

Embora distribuídos em 9 grupos de ligação, aproximadamente 63 % dos marcadores concentraram-se nos três maiores grupos, enquanto nos 3 menores agruparam-se apenas 10 % das marcas. Isso demonstra que a distribuição dos marcadores AFLP não ocorreu de forma aleatória nos grupos de ligação, o que pode ser estendido para os cromossomos do maracujá ($2n = 18$). Foi observada a co-segregação de 2 (1,8 %) dos marcadores agrupados (EM161447r no grupo 1 e PM08161r no grupo 6).

Carneiro et al. (2001) verificaram que as marcas de RAPD também não apresentam distribuição aleatória no genoma do maracujá. De 96 RAPDs monoparentais do acesso IAPAR-06, 81 % foram atribuídos a 5 grupos de ligação que corresponderam a 76 % do comprimento do mapa, composto de 9 grupos. Os autores

também verificaram a co-segregação de 2 marcadores (2,1 %) no mapa desse acesso, proporção semelhante à co-segregação de marcadores AFLP (1,8 %).

Mapa de ligação do acesso IAPAR-123

No mapa do acesso IAPAR-123 (Figura 8), 138 marcadores foram agrupados e dois (1,4 %) segregaram independentemente. Dos marcadores agrupados, 53 (38,4 %) foram ordenados com $LOD > 2,0$ e 85 (61,6 %) foram alocados no mapa como acessórios. Os grupos de ligação foram constituídos de 8 a 23 marcas, e o número de marcadores ordenados por grupo de ligação variou de 3 a 9. O comprimento do menor grupo foi de 8,4 cM e o do maior de 124,7 cM. O comprimento total do mapa, correspondente à soma do comprimento de cada um dos 9 grupos, foi de 473,2 cM (Haldane) (Tabela 8). Foi verificada a co-segregação de seis (4,3 %) marcadores (EM17160a no grupo 3; EM01525r no grupo 7; EM21124r e EM10300a no grupo 8 e EM24217a e EM22433a no grupo 9).

Como visto no mapa do acesso IAPAR-06, a distribuição dos marcadores AFLP não foi aleatória nos grupos de ligação. Nos grupos 1, 3 e 4 foram agrupados 45 % dos marcadores, enquanto nos grupos 5, 8 e 9 foram agrupados 20 %. Carneiro et al. (2001) também relataram distribuição não aleatória de marcadores RAPD no mapa deste acesso. Os autores verificaram que 57 % dos marcadores concentraram-se em 3 grupos de ligação que juntos corresponderam a 43 % do comprimento do mapa composto de 9 grupos. Relataram também a co-segregação de 17 (12,6 %) marcas, proporção esta superior à observada para marcas de AFLP (igual a 4,3 %).

Figura 7 - Mapa de marcadores AFLP do acesso IAPAR-06 de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. Grupos de ligação 1 a 3.

Figura 7 - Mapa de marcadores AFLP do acesso IAPAR-06 de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. Grupos de ligação 4 a 9.

Figura 8 - Mapa de marcadores AFLP do acesso IAPAR-123 de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. Grupos de ligação 1 a 3.

Figura 8 - Mapa de marcadores AFLP do acesso IAPAR-123 de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. Grupos de ligação 4 a 9.

Tabela 8. Marcadores AFLP e comprimento em centimorgans (cM) de cada grupo de ligação do mapa de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., acesso IAPAR-123.

Grupo de ligação	Número de marcadores agrupados	Número de marcadores ordenados	Número de marcadores acessórios (%)	Comprimento (cM)
1	23	7	69,6	124,7
2	12	8	33,3	117,6
3	24	9	62,5	84,2
4	15	6	60,0	38,2
5	9	6	33,3	35,7
6	15	5	66,7	26,1
7	21	5	76,2	23,5
8	11	3	27,3	14,8
9	8	4	50,0	8,1
Total	138	53	61,6	473,2

As características dos mapas gerados para os dois acessos são apresentadas na Tabela 9. Em ambos, os marcadores foram distribuídos em 9 grupos de ligação. Isto sugere que a distribuição dos marcadores tenha contemplado todos os cromossomos da espécie que tem $2n = 18$ cromossomos.

O comprimento dos grupos de ligação dos mapas, de ambos os acessos, também foi calculado usando a função de mapeamento de Kosambi (Tabela 10). Neste caso, as distâncias foram sempre inferiores às de Hadane. Usando a função de mapeamento de Kosambi, os comprimentos dos mapas dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123 foram de 681,8 cM (72 marcadores ordenados) e 411,1 cM (53 marcadores ordenados), respectivamente. O comprimento dos mapas dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123 relatados por Carneiro et al. (2001), obtidos usando a referida função de mapeamento, foi de 783,5 cM (64 marcadores ordenados) e 728,0 cM (65 marcadores ordenados no mapa), respectivamente.

Embora o número de marcadores analisados e agrupados do acesso IAPAR-123 (140 marcadores analisados e 138 agrupados) tenha sido quase 20 % superior ao do acesso IAPAR-06 (115 marcadores analisados e 112 agrupados), a proporção de marcas acessórias alocadas no mapa deste acesso foi de 61,6 %. O número de marcadores acessórios foi superior ao de ordenados em seis dos nove

grupos de ligação. No mapa do genitor IAPAR-06, a proporção de acessórios foi de 35,7 %. Apenas no grupo 1, o número de acessórios foi superior ao de ordenados (Tabela 7). A dificuldade em se obter a ordem correta dos marcadores, que por sua vez foram colocados como acessórios nos mapas, pode ser atribuída à formação de “clusters” em determinadas regiões, associada ao tamanho da população. A formação de “clusters” foi proporcionalmente maior no acesso IAPAR-123, e isto influenciou no comprimento do mapa deste acesso que foi igual a, aproximadamente, 60 % do comprimento do mapa do acesso IAPAR-06. A formação de “clusters” de marcas de AFLP foi genótipo-dependente. Padrões de “clusters” de AFLPs cromossomo-e-cultivar-específicos também foram observados em *Petunia*, sendo estes “clusters” associados a regiões de ocorrência de baixa frequência de recombinação (Strommer et al., 2002). A formação de “clusters” de locos de AFLP também foi verificada em outras espécies, como em soja (Young et al., 1999) e milho (Castiglioni et al., 1999).

Young et al. (1999) verificaram em milho a presença comum de um “cluster” de marcadores *EcoRI/MseI* por grupo de ligação, e também a rara presença de marcadores gerados por combinações usando a enzima *PstI*, sensível à metilação de citosina, nesses “clusters”. Associando esses fatos à baixa frequência de recombinação e ao alto nível de metilação de citosina em regiões heterocromáticas ao redor dos centrômeros, os autores sugerem que os “clusters” observados nos grupos de ligação representam a posição dos centrômeros dos cromossomos. Tal relação não foi tão evidente nos grupos de ligação aqui obtidos para os acessos de maracujá IAPAR-06 e IAPAR-123. Em *Pinus taeda*, apesar da formação de “clusters”, Remington et al. (1999) construíram um mapa de AFLP que, de acordo com as estimativas, cobriu de 87,5 a 99,6 % do genoma da espécie, dependendo do método usado para estimar o seu comprimento. Isto demonstra que a ocorrência de “clusters” não inviabiliza a construção de mapas de ligação de marcadores AFLP com ampla cobertura do genoma.

Tabela 9. Características dos mapas de ligação dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123 construídos a partir de 303 locos AFLP usando a estratégia “duplo pseudocruzamento-teste”. As distâncias em centimorgans foram obtidas a partir da função de mapeamento de Haldane.

	IAPAR-06	IAPAR-123
Número de locos	144	159
Marcadores com segregação distorcida	2	6
Marcadores com menos de 100 genótipos	27	13
Marcadores usados na construção do mapa	115	140
Número de grupos de ligação	9	9
Marcadores com segregação independente	3	2
Marcadores ordenados no "framework"	72	53
Marcadores acessórios	39	85
Comprimento do mapa (cM)	790,2	473,2
Comprimento do maior grupo (cM)	208,21	124,71
Comprimento do menor grupo (cM)	11,94	8,14
Comprimento médio dos grupos (cM) (desvio padrão)	87,8 (66,3)	52,6 (44,5)
Distância média entre marcadores (cM) (desvio padrão)	12,6 (10,8)	10,8 (10,0)

Tabela 10. Comprimento dos grupos de ligação dos mapas dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123 em centimorgans (cM) obtidos a partir das funções de mapeamento de Haldane e Kosambi.

Grupo de Ligação	IAPAR-06		IAPAR-123	
	Kosambi	Haldane	Kosambi	Haldane
1	173,5	208,9	102,1	124,7
2	130,0	156,9	100,0	117,6
3	97,7	108,9	72,3	84,2
4	91,6	104,2	35,3	38,2
5	81,5	93,5	33,0	35,7
6	55,1	66,2	24,5	26,1
7	28,7	30,9	22,2	23,5
8	12,4	13,4	13,9	14,8
9	11,3	11,9	7,8	8,1
Total	681,8	790,2	411,1	473,2

4.4 Mapeamento de QRLs

Para identificação de QRLs por regressão linear múltipla usando o procedimento “stepwise” para seleção de marcadores (variáveis regressoras), os locos de ambos genitores foram usados em conjunto. O modelo final de regressão foi composto por dois marcadores, ambos do acesso IAPAR-123, o qual apresentou o maior nível de resistência na avaliação fenotípica. A seleção de variáveis regressoras, usando o procedimento “stepwise”, teoricamente, não permite que permaneçam no modelo marcadores com informação redundante, ou seja, ligados a um mesmo QRL. Dessa maneira, entre os marcadores ligados a um mesmo QRL deve permanecer no modelo final aquele com ligação mais forte a este.

Um resumo da análise de regressão é apresentado na Tabela 11. Permaneceram no modelo final as marcas PM023558r ($P=0,0001$) e EM2378a ($P=0,0372$). O modelo composto por estas duas marcas explicou 21,3 % da variação da resistência na população segregante.

O sinal do coeficiente de regressão parcial, no caso positivo, indica que o marcador PM023558r está ligado em repulsão ao alelo de resistência, ou seja, a presença dele está associada ao maior tamanho da lesão. De acordo com o coeficiente de determinação parcial, este marcador explica sozinho 17,4 % da variação fenotípica da população segregante. Em geral, este valor é subestimado, uma vez que a metodologia não considera a ocorrência de recombinação entre o marcador e o QRL, a qual é proporcional à distância entre eles. Esse marcador foi atribuído ao grupo de ligação 2, no entanto, não foi ordenado com os demais marcadores no mapa do acesso IAPAR-123 e foi alocado como acessório, localizado a 8,1 cM da marca EM161461r.

O marcador EM2378a está ligado em associação ao alelo de resistência, uma vez que seu coeficiente de regressão parcial é negativo, ou seja, sua presença está associada à redução do tamanho da lesão. Esse marcador explicou 3,9 % da variação fenotípica e foi atribuído ao grupo de ligação 9, mas também foi alocado no mapa como acessório por não ser possível obter sua posição com o nível de confiança estabelecido (“LOD score” > 2). No mapa do acesso IAPAR-123, ele está localizado a 5,7 cM do marcador PM09198a.

Tabela 11. Resumo da análise de regressão múltipla para variável área foliar média lesionada (AFML) usando o processo “stepwise” para seleção de variáveis regressoras (marcadores).

Marcadores	Estimativa dos coeficientes de regressão	Erro padrão	Probabilidade (teste F)	R ² parcial (%)
PM023558r	- 1,8250	0,8631	0,0001	17,4 %
EM2378a	3,742	0,8634	0,0372	3,9 %
			R ² total	21,3 %

Na análise de mapeamento por intervalo composto, de acordo com o procedimento de baralhamento de dados (Churchil e Doerge, 1994), usando 1.000 permutações e $\alpha = 0,05$, o ponto de corte para declarar a presença de um QRL, em uma determinada posição, foi estabelecido como “LOD score” 2,36. Apenas um QRL foi identificado, explicando 15,8 % da variação fenotípica. Este QRL está localizado na posição 39,57 cM (“LOD score” = 4,41) no grupo de ligação 2 (Figura 8), no intervalo entre as marcas EM161461r e EM01156a (Figura 9). A posição estimada desse QRL praticamente coincide com a posição do marcador EM161461r (39,55 cM). De acordo com a sua posição no grupo de ligação, esse QRL corresponde ao identificado pelo marcador PM023558r na análise de regressão. A proporção da variação fenotípica explicada por esse QRL na análise de regressão (17,4 %) foi superior àquela explicada na análise de mapeamento por intervalo composto (15,8 %).

Figura 9 - Mapeamento do QRL à *Xanthomonas campestris* pv. *passifloae* no grupo de ligação 2 do acesso IAPAR-123. No eixo vertical é apresentada a escala de “LOD score” e no eixo horizontal a posição dos marcadores no grupo de ligação (cM).

O marcador acessório PM023558r foi identificado na análise de regressão como estando associado à variação devida ao QRL alocado no grupo de ligação 2 e, teoricamente, deve explicar a maior proporção da variação devida a esse QRL. Uma ordem alternativa do grupo de ligação 2 do acesso IAPAR-123 (Figura 10) foi obtida: o marcador PM023558r, anteriormente alocado como acessório, passou a integrar o mapa e pode então ser usado na análise de mapeamento por intervalo composto. O resultado dessa análise é apresentado na Figura 11. Nessa nova ordem, o QRL foi identificado entre as marcas PM023558r e EM01156a, posição coerente com a verificada no grupo de ligação quando este marcador não fora incluído no mapa (Figura 9). Estimou-se que ele situa-se a 0,02 cM (LOD 4,62) da marca PM023558r e que explica 16,5 % da variação fenotípica total na progênie segregante.

Era esperado que o QRL do grupo de ligação 2 explicasse uma proporção superior à verificada na análise da regressão múltipla (17,4 %) quando o mapeamento por intervalo composto foi realizado com a inclusão do marcador PM023558r (16,5 %). No entanto, isto não foi observado. Em geral, os efeitos de QRLs estimados a partir da informação de apenas um marcador são subestimados e tendem a ser inferiores aos estimados pelas metodologias de mapeamento por intervalo. No mapeamento por intervalo, o efeito do QRL é estimado compensando as frequências de recombinação entre os marcadores e o QRL (Lander & Botstein, 1989), assim as estimativas são mais precisas do que as obtidas pelas metodologias baseadas no efeito indireto de apenas um marcador, as quais são influenciadas pela distância entre o marcador e o QRL. Contudo, a proporção da variação fenotípica do QRL do grupo de ligação 2 aumentou com a inclusão do marcador PM023558r na análise de mapeamento por intervalo composto em relação à análise sem a sua presença no mapa, embora esta variação tenha sido pequena, 0,7 %.

Figura 10 - Ordem alternativa do grupo de ligação 2 do acesso IAPAR-123, a qual inclui o marcador PM023558r. A esquerda é apresentada a distância entre os locos em centimorgans (Haldane) e a direita a notação do marcador.

A metodologia de mapeamento por intervalo composto não foi capaz de identificar o QRL detectado pelo marcador acessório EM2378a (grupo de ligação 9 do genitor IAPAR-123) o qual explicou 3,9 % da variação fenotípica segundo a análise de regressão múltipla. O maior valor de “LOD score” nesse grupo de ligação foi próximo a 0,9. Como o marcador acessório EM2378a não foi considerado na análise de mapeamento, uma ordem alternativa, incluindo esse marcador no mapa, foi obtida para verificar seu efeito. Porém, mesmo com a sua inclusão, o QRL identificado na

análise de regressão não o foi na análise de mapeamento por intervalo composto, usando-se o valor de “LOD score de 2,36” como ponto de corte. Contudo, na distribuição (não apresentada) do “LOD score” no grupo incluindo a marca EM2378a, verificou-se um pico com valor igual a 1,07 localizado a, aproximadamente, 0,8 cM do marcador EM2378a. Se considerada a presença de um QRL nesse ponto, ele seria responsável por 3,4 % da variação fenotípica, valor semelhante ao encontrado pela análise de regressão múltipla. Nos trabalhos de mapeamento conduzidos por Melo et al. (2002), usando RILs em feijoeiro, e por Lopes (2003) usando geração F_2 de milho, também foram identificados QRLs usando marcadores não ordenados no mapa de ligação na análise de regressão múltipla os quais não foram identificados pela metodologia de mapeamento por intervalo composto, principalmente no caso de QRLs de pequeno efeito ($R^2 < 10,0 \%$).

Figura 11 - Mapeamento do QRL à *Xanthomonas campestris* pv. *passifloae* na ordem alternativa do grupo de ligação 2 do acesso IAPAR-123 com a inclusão do marcador PM023558r. No eixo vertical é apresentada a escala de “LOD score” e no eixo horizontal a posição dos marcadores no grupo de ligação (cM).

Em trabalhos de mapeamento de genes de resistência quantitativa usando diferentes delineamentos, tanto em espécies perenes como anuais, os efeitos individuais dos QRLs identificados, em geral, variam em torno de 5 a 25 %. Flament et al. (2001), avaliando famílias de irmãos germanos de cacau, identificaram QRLs associados à *Phytophthora palmivora* explicando de 9 a 17 % da variação fenotípica. Mignouna et al. (2002), analisando uma população F_1 tetraplóide de inhame com segregação para resistência à antracnose identificaram apenas um QRL, sendo este responsável por 10 % da variação fenotípica total. Boscariol et al. (1998) avaliaram linhagens recombinantes $F_{8,9}$ de feijoeiro e identificaram oito QRLs à *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* que explicaram individualmente de 8 a 23 % da variação fenotípica total. Avaliando famílias F_3 de pimenta Ben Chaim et al. (2001) identificaram 6 QRLs ao vírus CMV que explicaram individualmente de 7 % a 33 % da variação fenotípica total.

As médias da AFML dos genótipos nos locos marcadores que apresentaram associação com QRLs são apresentadas na Tabela 12. As diferenças entre as médias fenotípicas dos genótipos com alelos marcadores ligados a alelos favoráveis nos QRLs (alelos que conferem resistência) e genótipos alternativos são expressas em desvios padrões fenotípicos. Considerando as médias fenotípicas dos genótipos com alelo marcador ligado ao alelo favorável do QRL e as médias dos genótipos marcadores alternativos, as diferenças variaram de 0,38 a 0,81 desvios padrões fenotípicos (o desvio padrão fenotípico da média da população = 4,57 cm^2). Já, quando consideradas as médias fenotípicas dos genótipos com alelo marcador ligado ao alelo favorável do QRL e a média fenotípica da população, as diferenças variaram de 0,15 a 0,44 desvios padrões fenotípicos.

Simulando a seleção de 20 % da população, o que corresponde a 23 plantas com menor AFML, teríamos uma média fenotípica de 7,30 cm^2 (DP = 1,74 cm^2) e uma diferença de 1,12 desvios padrões fenotípicos em relação à média da população. Se realizada a seleção de 23 plantas considerando a informação dos locos marcadores EM01156, EM161461, EM2378 e PM023558 teríamos uma média fenotípica de 10,15 cm^2 (DP = 3,05) e uma diferença de 0,49 desvios padrões em

relação à média fenotípica da população. Entre as 23 plantas selecionadas com base no fenótipo e as selecionadas com base nos genótipos marcadores associados a alelos favoráveis dos QRLs, 8 foram comuns aos dois critérios, o que corresponde a uma eficiência de 35 % da seleção baseada nos marcadores moleculares em relação à seleção fenotípica. Um índice como este não justifica a seleção assistida, no entanto, deve ser considerado que foram mapeados apenas 2 QRLs, sendo um de pequeno efeito ($R^2 = 3,9 \%$). Assim, com o mapeamento de outros QRLs, maior proporção da variação fenotípica poderá ser explicada e certamente índices satisfatórios de eficiência de seleção poderão ser alcançados.

Tabela 12. Diferenças entre as médias fenotípicas da área foliar média lesionada (AFML) dos genótipos marcadores ligados a alelos favoráveis de QRLs associados à *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* - isolado 18b (Nakatani, 2001) e genótipos alternativos.

Marcador	Fase de ligação do alelo marcador ¹ com o alelo favorável do QRL	Média dos genótipos (desvio padrão) (cm ²)		Δ^2 (cm ²)	Δ^3 (cm ²)
		1-	00		
EM01156	Associação	11,28 (4,08)	13,69 (4,88)	- 0,53	- 0,23
EM161461	Repulsão	14,06 (4,96)	10,41 (3,19)	- 0,80	- 0,44
EM2378	Associação	11,53 (4,11)	13,28 (4,91)	- 0,38	- 0,15
PM023558	Repulsão	14,34 (5,07)	10,62 (3,19)	- 0,81	- 0,39

¹ alelo amplificado

² diferença entre média dos genótipos marcadores com alelo favorável e genótipos alternativos expressa em desvios padrões fenotípicos

³ diferença entre média dos genótipos marcadores com alelo favorável e média da população expressa em desvios padrões fenotípicos

A estratégia “duplo pseudocruzamento-teste” apresenta diferenças em relação aos delineamentos obtidos a partir de linhagens endogâmicas, tradicionalmente usados para o mapeamento genético, tanto quanto na capacidade de detectar QTLs como nas estimativas de seus efeitos (Comer et al., 1998; Grattapaglia et al., 1995). Enquanto em delineamentos genéticos obtidos a partir de linhagens endogâmicas segregam dois alelos no QTL, no esquema “duplo pseudocruzamento-teste” podem segregar até alelos alelos. Se para dado QTL o genótipo de um genitor for Q_1Q_2 e do outro Q_3Q_4 , para um único loco marcador dominante heterozigótico, a análise de QTL testa a diferença entre o valor médio da característica de $Q_1Q_3 + Q_1Q_4$ contra $Q_2Q_3 + Q_2Q_4$ no caso de um dos genitores, ou no caso do outro genitor, $Q_3Q_1 + Q_3Q_2$ contra $Q_4Q_1 + Q_4Q_2$ (Grattapaglia et al., 1995). No caso de um QTL ligado a marcadores duplo heterozigóticos com o alelo nulo ligado a Q_2 e Q_4 seria possível testar a diferença entre as médias fenotípicas de Q_2Q_4 , contra $Q_1Q_3 + Q_1Q_4 + Q_2Q_3$ (Conner et al., 1998). Por não serem conhecidos os genótipos do QTL nos genitores, interações intraloco que podem afetar os valores fenotípicos também não podem ser identificadas.

Neste trabalho podem ter ocorrido configurações genéticas específicas e/ou efeitos alélicos que limitaram a capacidade do mapeamento de QTLs, assim como interações intraloco que não puderam ser estimadas. Apesar dessas considerações, foi possível identificar dois QTLs envolvidos no controle genético da resistência à *X. campestris* pv. *passifloae*. Foi demonstrado que é possível mapear QTLs a partir do esquema “duplo pseudocruzamento-teste” usando marcadores dominantes em maracujá.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS DA PESQUISA

Relatou-se aqui o segundo trabalho de construção de mapas genéticos de *Passiflora* e o primeiro usando marcadores AFLP. Os primeiros mapas foram construídos usando RAPDs (Carneiro et al., 2002) e 90 indivíduos da mesma população segregante. Na construção dos mapas de AFLP, usou-se 117 indivíduos.

Visando dar continuidade a esses trabalhos, o DNA de outros indivíduos dessa mesma população está sendo extraído para aumentar o tamanho da população de mapeamento e com isto, aumentar a resolução dos mapas. Esses novos indivíduos serão analisados com os iniciadores usados na construção dos mapas de RAPD, e também com as combinações de iniciadores AFLP utilizadas neste trabalho. Por fim, será construído um único mapa contendo marcas RAPD e AFLP a partir da análise de, aproximadamente, 150 indivíduos. Esta pesquisa vem sendo realizada no Departamento de Genética da ESALQ/USP, e é financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Também, tiveram início os experimentos de clonagem e seleção, após seqüenciamento, das marcas de RAPD que servirão como sondas, visando atribuir os grupos de ligação de marcadores moleculares aos cromossomos da espécie. Para isso, um ou mais fragmentos alocados a cada um dos grupos de ligação serão usados como sonda na técnica de hibridização "in situ".

Outra perspectiva é o desenvolvimento de marcadores microssatélites para a espécie. Estes marcadores são codominantes e poderão ser usados na identificação dos grupos de ligação homólogos entre os genitores e, possivelmente, na integração destes grupos. Além disso, esses marcadores são mais informativos do

que os dominantes. No caso do mapeamento de QTLs, os microsatélites permitem identificar mais de um alelo do QTL.

A integração dos grupos de ligação homólogo aos dois acessos dependerá da obtenção de **alelos ponte** que segregam em ambos os genitores (biparentais). Esses alelos ponte podem ser marcadores codominantes, como RFLPs, microsatélites e isoenzimas, como os usados na integração de mapas de *Hevea spp.* (Lespinnasse et al., 2000) e para o alinhamento de grupos homólogos em maçã (Maliepaard et al., 1998), locos heteroduplex, como aqueles utilizados para integrar mapas de *Populus deltoides* (Wu et al., 2000) ou ainda marcadores dominantes biparentais, como realizado para alinhar mapas de *Eucalyptus globulus* e *E. tereticornis* (Marques et al., 1998).

Os indivíduos que serão analisados na construção do mapa comum de marcadores de DNA estão sendo multiplicados por propagação vegetativa. Assim, será possível realizar inoculações com outros isolados da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* visando obter informação da efetividade e especificidade dos QTLs encontrados, bem como identificar outros possíveis QTLs. Também deverão ser analisadas outras fontes de resistência à bacteriose.

Além disso, está sendo conduzido a campo um experimento para avaliação fenotípica de características relacionadas à qualidade do fruto e produção visando à identificação de QTLs associados a essas características na mesma população de mapeamento.

Como em macieira (Maliepaard et al., 1998), marcadores moleculares também poderão ser empregados no mapeamento de locos de incompatibilidade (alelos S), o que deve possibilitar um melhor entendimento dessa característica que é de grande importância para o melhoramento genético do maracujazeiro.

Para que seja possível implementar um programa de seleção assistida por marcadores que aumente a eficiência dos métodos de seleção convencionais, deve-se dispor de marcadores que apresentem forte associação com genes de interesse e que tenham efeito relativamente pronunciado na expressão fenotípica. Além disso, eles devem ser práticos do ponto de vista da manipulação em laboratório e de baixo

custo para permitir a avaliação de um grande número de plantas. No caso dos marcadores AFLP, uma vez identificados os fragmentos associados aos genes de interesse, estes são retirados dos géis de poliacrilamida, eluídos e clonados para a construção de iniciadores PCR-específicos, os quais são mais práticos para a análise de grande número de plantas e, portanto, mais adequados para uso na seleção assistida. Tal procedimento foi realizado para conversão de marcadores AFLP ligados a genes de resistência ao nematóide de cisto em batata (Bryan et al., 2002), de nematóide de pessegueiro (Lu et al., 1999) e à *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de pimenta (Pierre et al., 2000).

O maracujá é uma planta alógama obrigatória e apresenta alto nível de heterozigose e, a exemplo de outras culturas, as principais características de interesse são quantitativas. Nesta situação, grandes populações são necessárias para obter genótipos que concentrem alelos favoráveis a múltiplas características. Por ser uma cultura semi perene, com período de produção prolongado, exigir grande área experimental e condução tutorada, os experimentos apresentam dificuldades práticas de avaliação e custo relativamente elevado, fatores que dificultam o uso de grandes populações experimentais de melhoramento. A partir dos trabalhos de mapeamento de QTLs será possível, ainda na fase de viveiro, selecionar genótipos promissores os quais serão multiplicados e avaliados a campo. Assim, um grande número de plantas poderá ser submetido à análise molecular e, a partir da leitura dos fenótipos marcadores, serão selecionadas as plantas com maior “potencial genético esperado” a serem avaliadas a campo. Isto deverá aumentar a eficiência dos programas de melhoramento do maracujazeiro reduzindo a área, o tempo e, conseqüentemente, o custo dos experimentos. Deve-se considerar ainda a dificuldade de avaliação de características como a resistência genética, que depende da inoculação artificial, o que é um trabalho laborioso quando muitas plantas devem ser avaliadas, ou da infecção natural, que depende da constituição genética da população do patógeno e de sua distribuição na área experimental, variáveis que nem sempre podem ser controladas.

Por fim, cabe ressaltar que as informações aqui apresentadas são inéditas para a espécie e, como dito, deverão fornecer subsídios para futuros trabalhos de melhoramento de maracujazeiro visando obter populações resistentes a *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*.

6 CONCLUSÕES

Marcadores AFLP se prestam para construção de mapas genéticos e para identificar e mapear genes de interesse em maracujazeiro usando a estratégia “duplo pseudocruzamento-teste”.

Marcadores AFLP gerados pela combinação de enzimas *EcoRI/MseI* não apresentam distribuição aleatória no genoma do maracujá, e a formação de *clusters* é cromossomo e genótipo-específica.

A estratégia “duplo pseudocruzamento-teste” se presta à identificação e mapeamento de genes de interesse em maracujá usando marcadores dominantes e metodologias de regressão linear múltipla e de mapeamento por intervalo.

O acesso IAPAR-123 possui genes de resistência à bacteriose do maracujazeiro e poderá ser usado em programas de melhoramento visando o desenvolvimento de variedades resistentes à enfermidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H.; NAKANO, M.; NAKATSUKA, A.; NAKAYAMA, M.; KOSHIOKA, M.; YAMAGISHI, M. Genetic analysis of floral anthocyanin pigmentation traits in Asiatic hybrid lily using molecular linkage maps. **Theoretical and Applied Genetics**, v.105, p.1175-1182, 2002.
- AGUIAR, D.R.D.; SANTOS, C.C.F. Importância econômica e mercado. In: **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. 472p.
- AKAMINE, E.K.; GIROLAMI, G. **Pollination and fruit set in the yellow passion fruit**. Honolulu: University of Hawaii, Hawaii Agricultural Experiment Station, 1959. 44p. (Technical Bulletin, 39)
- ALZATE-MARIN, A.L.; ARRUDA, M.C.; CORREA, R.X.; NIETSCHE, S.; CARVALHO, G.A.; FALEIRO, F.G.; SARTORATO, A.; FERREIRA, C.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Marcadores moleculares ligados a genes de resistência identificados no programa de melhoramento do feijoeiro do BIOAGRO/UFV. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., Goiânia, 2001. **Resumos**. <http://www.sbmp.org.br/cbmp2001/areas/area5.htm> (15 jan. 2003)

AHN, S.N.; TANKSLEY, S.D. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, p.7980-7984, 1993.

ATIENZA, S.G.; SATOVIC, Z.; PETERSEN, K.K.; DOLSTRA, O.; MARTÍN, A. Preliminary genetic linkage map of *Miscanthus sinensis* with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.105, p.946-952, 2002.

BARBOSA, L.S. Resistência de *Passiflora* spp. a *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* e detecção do patógeno em sementes. Viçosa, 1995. 91p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

BARBOSA, L.V.; VIEIRA, M.L.C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener + *P. amethystina* Mikan. **Euphytica**, v.98, p.121-127, 1997.

BARCACCIA, G.; ALBERTINI, E.; TAVOLETTI, S.; FALCINELLI, M.; VERONESI, F. AFLP fingerprinting in *Medicago* spp.: Its development and application in linkage mapping. **Plant Breeding**, v.118, n.4, p.335-340, 1999.

BASTEN, C.J.; WEIR, B.S.; ZENG, B.Z. **QTL cartographer**, version 1.21. (software). Raleigh: North Carolina State University, Department of Statistics, 2000.

BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: PINHEIRO, J.B.; CARNEIRO, I.F. (Org.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000. p.63-224.

BEN CHAIM, A.; GRUBE, R.C.; LAPIDOT, M.; JAHN, M. Identification of quantitative trait loci associated with resistance to cucumber mosaic virus in *Capsicum annuum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p.1213-1220, 2001.

BENJAMINI, Y.; HOCHEBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistics Society**, v.57, p.289-300, 1995.

BENCHIMOL, L.L.; SOUZA JÚNIOR, C.L.; SIBOV, S.T.; MANGOLIN, C.A.; SILVA, A.R.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA, A.P. Seleção assistida por marcadores moleculares em programas de retrocruzamentos em milho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., Goiânia, 2001. **Resumos**. <http://www.sbmp.org.br/cbmp2001/areas/area5.htm> (15 jan. 2003)

BERT, P.F.; CHARMET, G.; SOURDILLE, P.; HAYWARD, M.D.; BALFOURIER, F.A. High-density molecular map for ryegrass (*Lolium perenne*) using AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.445-452, 1999.

BOSCARIOL, R.; SOUZA, A.A.; TSAI, S.M.; CAMARGO, L.E.A. Mapeamento de regiões genômicas associadas à resistência a dois isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, n.2, p.135-138, 1998.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of 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: DFZ/UESB, 1994. p.6-18.

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 Horticulturae**, n.370, p.45-57, 1995.

- BRUCKNER, C.H.; MELETTI, L.M.N.; OTONI, W.C.; ZERBINI JUNIOR, F.M. Maracujazeiro. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, 2002. 422p.
- BRYAN, G.J.; MCLEAN, K.; BRADSHAW, J.E.; DE JONG, W.S.; PHILLIPS, M.; CASTELLI, L.; WAUGH, R. Mapping QTLs for resistance to the cyst nematode *Globodera pallida* derived from the wild potato species *Solanum vernei*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.105, p.68-77, 2002.
- BUBECK, D.M.; GOODMAN, M.M.; BEAVIS, W.D.; GRANT, D. Quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot in maize. **Crop Science**, v.33, p.838-847, 1993.
- BUETOW, K.H.; CHAKRAVARTI, A. Multipoint gene mapping using seriation. I. General methods. **American Journal of Human Genetics**, v.41, p.180-188, 1987.
- CAMARGO, L.E.A. Marcadores moleculares no melhoramento para resistência a doenças. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.F.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.995-1010.
- CAO, G.; ZHU, J.; HE, C.; GAO, Y.; YAN, J.; WU, P. Impact of epistasis and QTL × environment interaction on the developmental behavior of plant height in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.103, p.153-160, 2001.
- CARNEIRO, M.S. Mapas de ligação de maracujá-amarelo (*Pssiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) baseados em marcadores RAPD. Piracicaba, 2001. 92p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

- CARNEIRO, M.S.; CAMARGO, L.E.A.; COELHO, A.S.G.; VENCovsky, R.; LEITE JÚNIOR, R.P.; STENZEL, N.M.C.; VIEIRA, M.L.C. RAPD-based genetic linkage maps of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **Genome**, v.45, p.670-678, 2002.
- 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, p.194-200, 1991.
- CARRARO, A.F.; CUNHA, M.M. **Manual de exportação de frutas**. Brasília: Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, Secretaria de Desenvolvimento Rural / EMBRAPA, SPI, 1994. 254p.
- CARVALHO-OKANO, R.M.; VIEIRA, M.F. Morfologia externa e taxonomia. In: BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. (Ed.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p.33-49.
- CASTIGLIONI, P.; AJMONE-MARSAN, P.; VAN WIJK, R.; MOTTO, M. AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.425-431, 1999.
- CERVERA, M.-T.; GUSMO, J.; STEENACKERS, M.; PELEMAN, J.; STORME, V.; VANDEN BROECK, A.; VAN MONTAGU, M.; BOERJAN, W. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.733-737, 1996.
- CHEN, S.; LIN, X.H.; XU, C.G.; ZHANG, Q. Improvement of bacterial blight resistance of 'Minghui 63' na elite restorer line of hybrid rice, by molecular marker-assisted. **Crop Science**, v.40, p.239-244, 2000.

- CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, v.138, p.963-971, 1994.
- 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.
- COLLINS, F.S. Positional cloning: let's not call it reverse any more. **Nature Genetics**, v.1, p.3-5, 1992.
- CONCIBIDO, V.C.; DENNY, R.L.; LANGE, D.A.; ORF, J.H.; YOUNG, N.D. RFLP mapping and marker-assisted selection of soybean cyst nematode resistance in PI 209332. **Crop Science**, v.36, p.1643-1650, 1996.
- CONNER, P.J.; BROWN, S.K.; WEEDEN, N.F. Molecular marker analysis of quantitative traits for growth and development in juvenile apple trees. **Theoretical and Applied Genetics**, v.96, p.1027-1035, 1998.
- COSTA, P.; POT, D.; DUBOS, C.; FRIGERIO, J.M.; PIONNEAU, C.; BODENES, C.; BERTOCHI, E.; CERVERA, M.T.; REMINGTON, D.L.; PLOMION, C. A genetic map of maritime pine based on AFLP, RAPD and protein markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p.39-48, 2000.
- CREPEL, L.; CHIROLLET, M.; DUREL, C.E.; ZHANG, D.; MEYNET, J.; GUDIN, S. Mapping of qualitative and quantitative phenotypic traits in Rosa using AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.105, p.1207-1214, 2002.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001.

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. da. Recursos genéticos e modificações em métodos de seleção para produtividade em maracujá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.18, n.3, p.413-423, 1996.

CUNHA, M.A.P.; CARDOSO, C.E.L. Variabilidade genética e melhoramento do maracujá. In: QUEIRÓZ, M.A. de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, nov. 1998. <http://www.cpatia.embrapa.br> (15 jan. 2003)

DANESH, D.; YOUNG, N.D. Partial resistance loci for tomato bacterial wilt show differential race specificity. **Tomato Genetics Cooperative Report**, v.44, p.12-13. 1994.

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.W. Statistical methods for locating quantitative trait loci with molecular markers. Raleigh, 1993. 158p. Thesis (Ph.D.) - North Carolina State University.

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* spp. **Plant Cell Reports**, v.15, p.106-110, 1995.

DRAPER, J.M.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1981. 709p.

EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDELL, J.F. Molecular marker facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution, and types of gene action. **Genetics**, v.116, p.113-125, 1987.

ESHED, Y.; ZAMIR, D. Less than additive epistatic interactions of QTL in tomato. **Genetics**, v.143, p.1807-1817, 1996.

FALLEIRO, T.; SUASSUNA, M.; BRUCKNER, C.H.; CARVALHO, C.R.; BORÉM, A. Self-incompatibility in passionfruit: evidence of gametophytic-sporophytic control. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.298-302, 2003.

FERREIRA, F.R. Germoplasma de maracujá. In: REUNIÃO TÉCNICA: PESQUISA EM MARACUJAZEIRO NO BRASIL, Cruz das Almas, 1997. Cruz das Almas: EMBRAPA, CNPMF, 1998. p.48-53. (Documentos, 77)

FERREIRA, M.E.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1996. 220p.

FUKUI, K.; MINEZAWA, M.; KAMISUGI, Y.; OHMIDO, N.; ISHIKAWA, M.; YANAGISAWA, T.; FUJISHITA M.; SAKAI, F. Microdissection of plant chromosomes by argon ion laser beam. **Theoretical and Applied Genetics**, v.84, p.787-791, 1992.

FLAMENT, M.-H.; KEBE, I.; CLÉMENT, D.; PIERETTI, I.; RISTERUCCI, A.-M.; N'GORAN, J.-A.-K.; CILAS, C.; DESPRÉAUX, D.; LANAUD, C. Genetic mapping of resistance factors to *Phytophthora palmivora* in cocoa. **Genome**, v.44, p.79-85, 2001.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2002**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo, 2002, p.402-408: maracujá.

FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores moleculares. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Coord.). **Biotechnologia na agricultura e agroindústria**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001. p.153-200.

GEFFROY, V.; SÉVIGNAC, M.; OLIVEIRA, J.C.F.; FOUILLOUX, G.; SKROCH, P.; TOQUET, P.; GEPTS, P.; LANGIN, T.; DRON, M. Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-localization of QTL with genes involved in specific resistance. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.13, p.287-296, 2000.

GELDERMANN, H. Investigation on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. **Theoretical and Applied Genetics**, v.46, p.319-330, 1975.

GONÇALVES, E.R.; ROSATO, Y.B. Genotypic characterization of xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.811-821, 2000.

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.1121-37, 1994.

GRATTAPAGLIA, D.; BERTOLUCCI, F.L.; SEDEROFF, R.R. Genetic mapping of quantitative trait loci controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Theoretical Applied Genetics**, v.90, p.933-947, 1995.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenovirus. **Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology**, v.39, p.439-446, 1974.

HALEY, C.S.; KNOTT, S.A. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. **Heredity**, v.69, p.315-324, 1992.

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.

HARPER, M.E.; SAUNDERS, G.F. Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by in situ hybridization. **Chromosoma**, v.83, p.431-439, 1981.

HARTL, D.L.; CLARCK, A.G. **Principles of population genetics**. 3.ed. Sunderland: Sinauer, 1997. 542p.

HELENTJARIS, T.; WEBER, D.F.; WRIGHT, S. Use of monosomics to map cloned DNA fragments in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.83, p.6035-6039, 1986.

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.

HOSPITAL, F.; CHEVALET, C.; MULSANT, P. Using markers in gene introgression breeding programs. **Genetics**, v.132, p.1199-1210, 1992.

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.

HYNE, V.; KEARSEY, M.J. QTL analysis: further uses of 'marker regression'. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, p.471-476, 1995.

INGLEZ DE SOUZA, J.S.; MELETTI, L.M.M. **Maracujá**: espécies, variedades e cultivo. Piracicaba: FEALQ, 1997. 179p. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 3)

JANSEN, R.C. A general mixture model for mapping quantitative trait loci by using molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.252-260, 1992.

JANSEN, R.C. Maximum likelihood in a generalized linear finite mixture model by using the EM algorithm. **Biometrics**, v.49, n.1, p.227-231, 1993.

JANSEN, R.C. Controlling the type I and type II errors in mapping quantitative trait loci. **Genetics**, v.138, n.3, p.871-881, 1994.

JANSEN, R.C.; STAM, P. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. **Genetics**, v.136, n.4, p.1447-1455, 1994.

JIANG, C.; ZENG, Z.B. Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, v.140, p.1111-1127, 1995.

- JIANG, C.; ZENG, Z. Mapping quantitative trait loci with dominant and missing markers in various crosses from two inbred lines. **Genetica**, v.101, p.47-58, 1997.
- JIN, H.; DOMIER, L.L.; KOLB, F.L.; BROWN, C.M. Identification of quantitative loci for tolerance to barley yellow dwarf virus in oat. **Phytopathology**, v.88, p.410-415, 1998.
- JONES, E.S.; MAHONEY, N.L.; HAYWARD, M.D.; ARMSTEAD, I.P.; JONES, J.G.; HUMPHREYS, M.O.; KING, I.P.; KISHIDA, T.; YAMADA, T.; BALFOURIER, F.; CHARMET, G.; FORSTER, J.W. An enhanced molecular marker based genetic map of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) reveals comparative relationships with other Poaceae genomes. **Genome**, v.45, n.2, p.282-295, 2002.
- KAO, C.H.; ZENG, Z.B.; TEASDALE, R.D. Multiple interval mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v.152, p.1203-1216, 1999.
- KEARSEY, M.J.; HYNE, V. QTL analysis: a simple 'marker regression' approach. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.698-702, 1994.
- KELLER, B.; FEUILLET, C. Colinearity and gene density in grass genomes. **Trends in Plant Science**, v.5, p.246-251, 2000.
- KIRKPATRICK, S.; GELATT, C.D.; VECCHI, M.P. Optimization by simulated annealing. **Science**, v.220, p.671-680, 1983.
- KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M. Enfermidades de etiologia viral e fitoplasmática. In: BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. (Ed.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p.345-385.

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, p.1119-1127, 1995.

KUMAR, L.S. DNA markers in plant improvement. **Biotechnology Advances**, v.17, p.143-182, 1999.

KURODA, N. Avaliação do comportamento quanto à resistência de espécies e progênies de maracujazeiro à *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. Jaboticabal, 1981. 45p. Monografia (Graduação) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

LAMOUREUX, D.; BOEUF, C.; REGAD, F.; GARSMEUR, O.; CHARMET, G.; SOURDILLE, P.; LAGODA, P.; BERNARD, M. Comparative mapping of the wheat 5B short chromosome arm distal region with rice, relative to a crossability locus. **Theoretical and Applied Genetics**, v.105, p.759-765, 2002.

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.174-81, 1987.

LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v.121, p.185-199. 1989.

LATHROP, G.; LALOUEL, J.; JULIER, C.; OTT, J. Multilocus linkage analysis in humans: detection of linkage and estimation of recombination. **American Journal of Human Genetics**, v.37, p.482-498, 1985.

LEBRUN, P.; BAUDOUIN, L.; BOURDEIX, R.; LOUIS KONAN, J.; BARKER, J.H.A.; ALDAM, C.; HERRÁN, A.; RITTER, E. Construction of a linkage map of the Rennell Island Tall coconut type (*Cocos nucifera* L.) and QTL analysis for yield characters. **Genome**, v.44, n.6, p.962-970, 2002.

LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advances in Agronomy**, v.55, p.265-344, 1995.

LEFEBVRE, V.; PALLOIX, A. Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: a case study, the interaction pepper (*Phytophthora capsici* Leonian). **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.503-511, 1996.

LEITE, R.A.S.; BLISKA, F.M.M.; GARCIA, A.E.B. Aspectos econômicos da produção e mercado. In: INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Maracujá**. Campinas, 1994. (Série Frutas Tropicais, 9)

LEONARDS-SCHIPPERS, C.; GIEFFERS, W.; SALAMINI, F.; GEBHARDT, C.; The *R 1* gene conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in potato is located on potato chromosome. **Molecular and General Genetics**, v.233, p.278-283, 1992.

LEONARDS-SCHIPPERS, C.; GIEFFERS, W.; SCHÄFER-PREGL, R.; RITTER, E.; KNAPP, S.J.; SALAMINI, F.; GEBHARDT, C. Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for QTL mapping in an allogamous plant species. **Genetics**, v.137, p.67-77, 1994.

- LESPINASSE, D.; RODIER, G.M.; GRIVET, L.; LECONTE, A.; LEGNATE, H.; SEGUIN, M. A saturated genetic map linkage of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite and isozymes markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p.127-138, 2000.
- LI, Z.K.; PINSON, S.R.M.; PARK, W.D.; PATERSON, A.H.; STANSEL, J.W.; Epistasis for three grain yield components in rice (*Oryza sativa* L.). **Genetics**, v.145, p.453-453, 1997.
- LIU, B.H. **Statistical genomics**. New York: CRC, 1998. 610p.
- LIU, B.H., KNAPP, S.J. GMENDEL: 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, 1992.
- LIU, J.; LIU, D.; TAO, W.; LI, W.; WANG, S.; CHEN, P.; CHENG, S. GAO, D. Molecular marker-facilitated pyramiding of different genes for powdery mildew resistance in wheat. **Plant Breeding**, v.119, n.1, p.21-24, 2000.
- LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p.398-401, 1989.
- 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.
- LOPES, M.T.G. Mapeamento de genes de resistência à mancha de *Phaeosphaeria* em milho (*Zea mays* L.). Piracicaba, 2003. 117p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

- LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.V.O.; CAMARDO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores moleculares dominantes RAPD e AFLP): aspectos técnicos e interpretação genética. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n.29, p.64-68, 2003.
- LU, Z.X.; SOSSEY-ALAOUI, K.; REIGHARD, G.L.; BAIRD, W.V.; ABBOTT, A.G. Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance and its application to peach rootstock breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.115-122, 1999.
- MALAVOLTA JÚNIOR, V.A. Bacterioses do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, 5., Jaboticabal, 1998. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 1998. p.217-229.
- MALIEPAARD, C.; JANSEN, J.; VAN OOIJEN, J.W. Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: overview and consequences for applications. **Genetical Research**, v.70, p.237-250, 1997.
- MALIEPAARD, C.; ALSTON, F.H.; VAN ARKEL, G.; BROWN, L.M.; CHEVREAU, E.; DUNEMANN, F.; EVANS, K.M.; GARDINER, S.; GUILFORD, P.; VAN HEUSDEN, A.W.; JANSE, J.; LAURENS, F.; LYNN, J.R.; MANGANARIS, A.G.; DEN NIJS, A.P.M.; PERIAM, N.; RIKKERINK, E.; ROCHE, P.; RYDER, C.; SANSVINI, S.; SCHMIDT, H.; TARTARINI, S.; VERHAEGH, J.J.; VRIELING-VAN GINKEL, M.; KING, G.J. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.97, p.60-73, 1998.
- MARQUES, C.M.; ARAÚJO, J.A.; FERREIRA, J.G.; WHETTEN, R.; O'MALLEY, D.M.; 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. CHUNNWONGSE, J.; FRARY, A.; GANAL, M.W.; SPIVEY, R.; WU, T.; EARLY, E.D.; TANKSLEY, S.D. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science**, v.262, p.1432-1435, 1993.
- MATHER, K. **Measurement of linkage in heredity**. London: Methuen, 1938. p.26-31.
- McCOUCH, S.R.; KOCHERT, G.; YU, Z.; WANG, Z.; KHUSH, G.S.; COFFMAN, W.R.; TANKSLEY, S.D. Molecular mapping of rice chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.76, p.815-829, 1988.
- MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; PINTO-MAGLIO, C.A.F.; MARTINS, F.P. Caracterização de germoplasma de maracujazeiro (*Passiflora* sp). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.14, n.2, p.157-162, 1992.
- MELETTI, L.M.M. Caracterização agronômica de progênies de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). Piracicaba, 1998. 92p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- MELETTI, L.M.M.; SANTOS, R.R.; MINAMI, K. Melhoramento do maracujazeiro-amarelo: obtenção do cultivar ‘composto IAC-27’. **Scientia Agricola**, v.57, n.3, p.491-498, 2000.
- MELETTI, L.M.M.; BRUCKNER, C.H. Melhoramento genético. In: BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. (Ed.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p.345-385.

- MELO, L.C.; SANTOS, J.B.; FERREIRA, D.F. Mapeamento de QTLs para florescimento do feijoeiro com marcadores rapd em diferentes ambientes. **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, n.4, p.768-779, 2002.
- MIGNOUNA, H.D.; MANK, R.A.; ELLIS, T.H.N.; VAN DEN BOSCH, N.; ASIEDU, R.; ABANG, M.M.; PELEMAN, J. A genetic linkage map of water yam (*Dioscorea alata* L.) based on AFLP markers and QTL analysis for anthracnose resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, v.105, p.726-735, 2002.
- MUELLER, U.G.; WOLFENBARGER, L.L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends in Ecology & Evolution**, v.14, n.10, p.389-394, 1999.
- MULLIS, K.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods of Enzymology**, v.55, p.335-350, 1987.
- MURRAY, M.G., THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v.8, p.1134-1137, 1980.
- NAKASONI, H.Y.; HIRANO, R.; ITO, P. **Preliminary observations on the inheritance of several factors in the passion fruit *Passiflora edulis* and forma *flavicarpa***. Honolulu: Hawaii Agricultural Experiment Station, 1967. 11p. (Technical Bulletin, 161)
- NAKATANI, A.K. Diversidade genética de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* e sensibilidade a produtos químicos. Piracicaba, 2001. 61p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

- NASCIMENTO, W.M.O.; OLIVEIRA, M.S.P.; MÜLLER, C.H.; CARVALHO, J.E.U.; TOMÉ, A.T. Avaliação de progênies de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) através de características físicas e físico-químicas dos frutos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., Goiânia, 2001. **Resumos**. <http://www.sbmp.org.br/cbmp2001/areas/area5.htm> (15 jan. 2003)
- NETO, J.R.; SUGIMORI, M.H.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A. Infecção natural em *Passiflora alata* Ait, por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. **Summa Phytopatologica**, v.10, p.50, 1984.
- NIKAIDO, A.; YOSHIMARU, H.; TSUMURA, Y.; SUYAMA, Y.; MURAI, M.; NAGASAKA, K. Segregation distortion for AFLP markers in *Cryptomeria japonica*. **Genes and Genetic Systems**, v.74, p.55-59, 1999.
- NIKAIDO, A.M.; 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. de; NAKAMURA, K.; MAURO, A.O.; CENTURION, M.A.P. da C. Aspectos gerais de melhoramento do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R. **Maracujá, produção e mercado**. Vitória da Conquista: UESB, 1994. p.27-37.
- OLIVEIRA, G.H.N.; SUDO, S.; SILVA, J.R.; KIMURA, O. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* infectando vascularmente plantas de maracujazeiro (*P. edulis* f. *flavicarpa*). **Fitopatologia Brasileira**, v.13, p.107, 1988.

- OLIVEIRA, J.C. Melhoramento genético de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg visando aumento de produtividade. Jaboticabal, 1980. 133p. Tese (Livre-Docência) – Universidade Estadual Paulista.
- 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, 5., Jaboticabal, 1998. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 1998. p.291-310.
- OPENSHAW, S.J. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: JOINT PLANT BREEDING SYMPOSIA SERIES, 1., Corvallis, 1994. **Proceedings**. Corvallis: Crop Science Society of America, 1994. p.41-43.
- OTONI, W.C. Potencial da biotecnologia no melhoramento de fruteiras. In.: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE FRUTEIRAS, 2., Viçosa, 2000. **Resumos**. Viçosa: UFV, DFT, 2000. p.102-121.
- 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.; LANDER, E.; LINCOLN, S.; HEWITT, J.; PETERSON, S.; TANKSLEY, S. Resolution of quantitative traits into mendelian factors using a complete RFLP linkage map. **Nature**, v.335, p.721-726, 1988.
- PEREIRA, A.L.G. Uma nova doença bacteriana do maracujá (*Passiflora edulis* Sims) causada por *Xanthomonas passiflora* sp. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.36, n.4, p.163-174, 1969.

- PEREIRA, M.C.; OLIVEIRA, J.C.; NACHTIGAL, J.C. Propagação vegetativa do maracujá-suspiro (*Passiflora nitida*) por meio de estacas herbáceas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, 5., Jaboticabal, 1998. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 1998. p.317.
- PIERRE, M.; NOËL, L.; LAHAYE, T.; BALLVORA, A.; VEUSKENS, J.; GANAL, M.; BONAS, U. High-resolution genetic mapping of the pepper resistance locus Bs3 governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatora* AvrBs3 protein. **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.255-263, 2000.
- PINHEIRO, J.B.; CARNEIRO, I.F. (Org.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000. 232p.
- PIZA JÚNIOR, C.T. A cultura do maracujá na região sudeste do Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, 5., Jaboticabal, 1998. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 1998. p.20-48.
- QUADROS, M.; NASCIMENTO, A.C.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BUENO, P.A.O. Incidência e severidade de bacteriose (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) em frutos de nove genótipos de maracujazeiro amarelo (compact disc). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., Belém, 2002. **Anais**. Belém: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2002.
- QUARRIE, S.A; LAURIE, D.A.; ZHU, J.; LEBRETON, C.; SEMIKHODSKII, A.; STEED, A.; WITSENBOER, H; CALESTANI, C. QTL analysis to study the association between leaf size and abscisic acid accumulation in droughted rice leaves and comparasons across cereals. **Plant Molecular Biology**, v.35, p.15-165, 1997.

- QI, X.; JIANG, G.; CHEN, W.; NIKS, R.E.; STAM, P.; LINDHOUT, P. Isolate-specific QTLs for partial resistance to *Puccinia hordei* in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.877-884, 1999.
- RÊGO, 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, p.564-568, 1999.
- REMLINGTON, D.L.; WHETTEN, R.W.; LIU, B.H.; O'MALLEY, D.M. Construction of an AFLP genetic map with nearly complete genome coverage in *Pinus taeda*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p.1279-1292, 1999.
- RITTER, E.; GEBHARDT, C.; SALAMINE, F. Estimation of recombination frequencies and construction of linkage maps from crosses between heterozygous parents. **Genetics**, v.125, p.645-654, 1990.
- 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: Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, Secretaria de Desenvolvimento Rural / EMBRAPA, SPI, 1996. 64p. (Série Publicações Técnicas FRUPEX, 19)
- RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J.C. Enxertia do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, 5., Jaboticabal, 1998. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 1998. p.70-92.
- SANTOS, J.B.; HAGIWARA, W.E.; CARMO, S.L.M. Viabilidade do RAPD para auxiliar na seleção em programa de retrocruzamento em feijão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., Goiânia, 2001. **Resumos**. <http://www.sbmp.org.br/cbmp2001/areas/area5.htm> (15 jan. 2003)

SÃO JOSÉ, A.R. A cultura do maracujá nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, 5, Jaboticabal, 1998. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 1998. p.3-17.

SAS INSTITUTE: **SAS user's guide**. version 6.03. (software). Cary, 1988.

SATOVIC, Z.; TORRES, A.M.; CUBERO, J.I. Genetic mapping of new morphological, isozyme and RAPD markers in *Vicia faba* L. using trisomics. **Theoretical Applied Genetics**, v.93, p.1130-1138, 1996.

SAX, K. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, v.8, p.552-60, 1923.

SCHUSTER, I. Identificação de QTL para resistência de nematóide de cisto da soja e capacidade de combinação de genitores. Viçosa, 1999. 85p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

SCOTT, D.W. On optimal and data-based histograms. **Biometrika**, v.66, n.3, p.605-610, 1979.

SEEFELDER, S.; EHRMAIER, H.; SCHWEIZER, G.; SEIGNER, E. Male and female genetic linkage map of hops, *Humulus lupulus*. **Plant Breeding**, v.119, n.3, p.249-255, 2000.

SILVA, J.R. Situação da cultura do maracujazeiro na região central brasileira In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, 5., Jaboticabal, 1998. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 1998. p.18-19.

SILVA, H.D.; VENCovsky, R. Testes múltiplos e associação de marcas associadas a QTL's. **Scientia Agricola**, v.99, n.4, p.755-762, 2002.

- SIMONE, M. de; MORGANTE, M.; LUCCHIN, M.; PARRINI, P.; MAROCCO, A. A first map of *Cichorium intybus* L. using a one-way pseudo-testcross and PCR-derived markers. **Molecular Breeding**, v.3, n.6, p.415-425, 1997.
- SOUZA, J.S.; CARDOSO, C.E.L.; FOLEGATTI, M.I.S.; MATSUURA, F.C.A.U. Mercado mundial. In: MATSUURA, F.C.A.U.; FOLEGATTI, M.I.S. (Ed.). **Maracujá: pós-colheita**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura / Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p.9-12. (Frutas do Brasil, 23)
- 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.
- STURTEVANT, A.H. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. **Journal of Experimental Zoology**, v.14, p.43-59, 1913.
- STROMMER, J.; PETERS, J.; ZETHOF, J.; KEUKELEIRE, P.; GERATS, T. AFLP maps of *Petunia hybrida*: building maps when markers cluster. **Theoretical and Applied Genetics**, v.105, p.1000-1009, 2002.
- TAKAHASHI, E.K.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, M.L.C. Co-transformação em *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. visando resistência à bacteriose causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, 3., Viçosa, 2002. **Resumos**. Viçosa: UFV, DFT, 2002. p.136.
- TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review Genetics**, v.27, p.205-33, 1993.

TEIXEIRA, C.G. Cultura. In: TEIXEIRA, C.G.; CASTRO, J.V.; TOCCHINI, R.P.; NISIDA, A.A.L.C.; HASHIZUME, T.; MEDINA, J.C.; TURATTI, J.M.; LEITER, S.S.F.; BLISKA, M.M.; GARCIA, A.E.B. **Maracujá: cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos**. (2.ed.). Campinas: Instituto Tecnologia de Alimentos, 1994. p.3-142.

TESTOLIN, R.; HUANG, W.G.; CIPRIANI, G.; RETAMALES, J. Towards a linkage map in kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch.) based on microsatellites and saturated with AFLP markers. **Acta Horticulturae**, v.498, p.79-84, 2001.

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.

TRASK, B.J. Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. **Trends In Genetics**, v.7, n.5, p.149-54, 1991.

VAN DER PLANK, J. **Passion flowers**. London: Cambridge Press, 1996. 224p.

VAN DER VOORT, J.N.A.M.; VAN ECK, H.J.; VAN ZANDVOORT, P.M.; OVERMARS, H.; HELDER, J.; BAKKER, J. Linkage analysis by genotyping of sibling populations: a genetic map for the potato cyst nematode constructed using a "pseudo-F2" mapping strategy. **Molecular and General Genetics**, v.261, n.6, p.1021-1031, 1999.

VAN OOIJEN, J.W.; MALIEPAARD, C. **MapQTL** ^(tm) version 3.0: software for the calculation of QTL positions on genetic maps. CPRO-DLO. Wageningen, 1996.

- VAN OOIJEN, J.W.; VOORRIPS, R.E. **JoinMap®** version 3.0: software for the calculation of genetic linkage maps. Wageningen: Plant Research International, 2001.
- VERHAEGEN, D.; PLOMION, C.; GION, J.-M.; POITEL, M.; COSTA, P.; KREMER, A. Quantitative trait dissection analysis in Eucalyptus using RAPD markers: 1. Detection of QTL in interspecific hybrid progeny, stability of QTL expression across different ages. **Theoretical and Applied Genetics**, v.95, p.597-608, 1997.
- WERNER, I.E.; ENDO, T.R.; GILL, B.S. Toward a cytogenetically based physical map of the wheat genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, p.11307-11311, 1992.
- VIEIRA, M.L.C. Hibridação somática em plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.3, p.36-40, 1997.
- VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. Regeneration of plants from protoplasts of *Passiflora* species (passion fruit). In: **Plant protoplasts and genetic engineering**. Berlin: Springer-Verlag, 1996. p.108-119. (Biotechnology in agriculture and forestry, v.38)
- VIEIRA, M.L.C.; MATTA, F.P.; LOPES, R.; CARNEIRO, M.S.; LOPES, M.T.G.; MORAES, M.C.; CAMARGO, L.E.A. Mapas de ligação de RAPDs e AFLPs, e identificação de QTLs em maracujá (*Passiflora edulis*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 48., Águas de Lindóia, 2002. **Resumos**. Águas de Lindóia, SBG, 2002. p.17–20. <http://www.sbg.org.br> (15 jan. 2003)
- VOGL, C.; XU, S. Multipoint mapping of viability and segregation distorting loci using molecular markers. **Genetics**, v.155, p.1439-1447, 2000.

VOORRIPS, R.E., JONGERIUS, M.C., KANNE, H.J. Mapping of two genes for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in a population of double haploid lines of *Brassica oleracea* by means of RFLP and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.75-82, 1997.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.

WEBER, D.F.; HELENTJARIS, T. Mapping RFLP loci in maize using B-A translocations. **Genetics**, v.12, n.1, p.583-590. 1989.

WEIR, B. **Genetic data analysis**. 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 447p.

WENDLAND, A. Avaliação de espécies de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) à bacteriose e caracterização de *Xanthomonas* sp. pv. *passiflorae*. Londrina, 1997. 87p. Monografia (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.

WU, R.L.; HAN, Y.F.; HU, J.J.; FANG, J.J.; LI, L.; LI, M.L.; ZENG, Z.B. An integrated genetic map of *Populus deltoides* based on amplified fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p.1249-1256, 2000.

WU, W.R.; LI, W.M. A new approach for mapping quantitative trait loci using complete genetic marker linkage maps. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.535-539, 1994.

- XIA, X.C.; MELCHINGER, A.E.; KUNTZE, L.; LUBBERSTEDT, T. Quantitative trait loci mapping of resistance to sugarcane mosaic virus in maize. **Phytopathology**, v.89, n.8, p.660-667, 1999.
- XU, M.L.; MELCHINGER, A.E.; XIA, X.C.; LUBBERSTEDT, T. High-resolution mapping of loci conferring resistance to sugarcane mosaic virus in maize using RFLP, SSR and AFLP markers. **Molecular and General Genetics**, v.261, n.3, p.574-581, 1999.
- XU, M.L.; KORBAN, S.S. Saturation mapping of the scab resistance gene *Vf* using AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**. v.101, p.844-851, 2000.
- YAMASHIRO, T. Principais doenças fúngicas e bacterianas no maracujazeiro encontradas no Brasil. In: SÃO JOSÉ, A.B.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. (Ed.). **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p.169-174.
- YIN, T.; HUANG, M.; WANG, M.; ZHU, L.; ZENG, Z.; WU, R. Preliminary interspecific genetics maps of *Populus* genome constructed from RAPD markers. **Genome**, v.44, p.602-609, 2001.
- YOUNG, N.D. Potential applications of map-based cloning to plant pathology. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.37, p.81-94, 1990.
- YOUNG, N.D. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. **Annual Review Phytopathology**, v.34, p.479-501, 1996.
- YOUNG, W.P.; SCHUPP, J.M.; KEIM, P. DNA methylation and AFLP marker distribution in the soybean genome. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.785-792, 1999.

YOUNG, N.D.; MILLER, J.C.; TANKSLEY, S.D. Rapid chromosomal assignment of multiple genomic clones in tomato using primary trisomics. **Nucleic Acids Research**, v.15, p.9339-9348, 1987.

YOUNG, N.D.; TANKSLEY, S.D. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the Tm-2 locus of tomato during backcross breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, v.77, p.353-359, 1989.

YU, Z.H.; MACKILL, D.J.; BONMAN, J.M.; TANKSLEY, S.D. Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.81, p.471-476, 1991.

YU, S.B.; LI, J.X.; TAN, Y.F.; GAO, Y.J.; LI, X.H.; ZHANG, Q.F.; SAGHAI MAROOF, M.A. Importance of epistasis as the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.9226-9231, 1997.

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

ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v.136, n.9, p.1457-1468, 1994.

ZHANG, W.P.; SHEN, X.Y.; WU, P.; HU, B.; LIAO, C.Y. QTLs and epistasis for seminal root length under a different water supply in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.103, p.118-123, 2001.