Endson Santana Nunes
Engenheiro Agrônomo

Caracterização fenotípica e molecular de uma população F₁ de maracujá-doce visando à construção de mapas de ligação e identificação de QTL

Orientadora:

Prof^ª. Dra. **MARIA LUCIA CARNEIRO VIEIRA**

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2010**

ERRATA

NUNES, E.S. **Caracterização fenotípica e molecular de uma população F₁ de maracujá-doce visando à construção de mapas de ligação e identificação de QTL.** Piracicaba, 2010. 138 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Página	Linha	Onde se lê	Leia-se
30	27	pela pesagem de dez frutos	pelo produto de NF por PF
53	7	307%	14%
53	8	593%	não apresentou eficiência
53	11	272% e 307%	12% e 14%
53	12	275% e 593%	5% para NF
53	Tabela 7 linha 1 coluna 2	0,99	1,00
53	Tabela 7 linha 1 coluna 3	0,79	1,01
53	Tabela 7 linha 1 coluna 5	1,09	1,13
53	Tabela 7 linha 1 coluna 6	1,00	1,01
53	Tabela 7 linha 1 coluna 9	2,72	1,12
53	Tabela 7 linha 1 coluna 10	3,07	1,14
53	Tabela 7 linha 2 coluna 2	1,00	1,01
53	Tabela 7 linha 2 coluna 3	1,34	1,07
53	Tabela 7 linha 2 coluna 4	0,97	1,01
53	Tabela 7 linha 2 coluna 9	2,75	1,05
53	Tabela 7 linha 2 coluna 10	5,93	0,94

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Nunes, Endson Santana

Caracterização fenotípica e molecular de uma população F₁ de maracujá-doce visando à construção de mapas de ligação e identificação de QTL / Endson Santana Nunes. -- Piracicaba, 2010.

138 p. : il.

Tese (Doutorado) -- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Maracujá 2. Mapeamento genético 3. Marcador molecular 4. Melhoramento genético vegetal 5. Variação genética I. Título

CDD 634.425
N972c

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

Dedicatória

Aos meus pais,

Edson de Moraes Nunes

Enizete Santos de Santana Nunes

e a minha família, por todo o incentivo e confiança,

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me permitir acordar todos os dias e me dar forças para realizar todas as minhas atividades;

A Prof^ª. Dr^ª. Maria Lucia Carneiro Vieira, pela grande oportunidade, confiança e apoio;

Ao Prof. Dr. Isaias Olívio Geraldi e ao Prof. Dr. Antonio Augusto Franco Garcia pelo incentivo, apoio e contribuições desde o início do desenvolvimento deste trabalho;

A Gicka pela atenção, compreensão, carinho e paciência durante a condução deste trabalho;

Ao Carlos Alberto de Oliveira, pela ajuda e contribuição no trabalho;

Aos amigos do Laboratório: Hanai, Alessandra, Helen, Carla, Luciane, Luciano, Marcelo, Larissa, Thiago, Anselmo e Guilherme;

Aos amigos do Laboratório de Genética-Estatística: Gabriel, Marcelo, Rodrigo e Maria Marta, muito importantes durante as análises dos dados;

Ao senhor Hildebrando Borgonove, por ter colaborado com a implantação desse projeto em sua fazenda;

Aos professores e funcionários do Departamento de Genética;

A ESALQ e ao Departamento de Genética, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado e pela estrutura oferecida;

Ao CNPq e a FAPESP pela concessão das bolsas de estudo;

Agradeço a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Importância econômica da cultura do maracujá	15
2.2 Melhoramento genético da cultura do maracujá	16
2.3 Mapas genéticos em populações não endogâmicas, com ênfase em <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	18
2.4 Mapeamento de QTL	21
2.5 Mapeamento de QTL em populações não endogâmicas	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Material vegetal	27
3.2 Obtenção, semeadura e clonagem dos indivíduos da população de mapeamento (F ₁).....	27
3.3 Espaçamento, plantio e tratos culturais da população de mapeamento (F ₁) a campo.....	29
3.4 Avaliações fenotípicas da população de mapeamento (F ₁), delineamento experimental e caracteres avaliados	30
3.5 Tratamento estatístico dos dados fenotípicos	31
3.6 Análises moleculares.....	35
3.6.1 Extração e quantificação do DNA genômico	35
3.6.2 Marcadores microssatélites (SSR)	36
3.6.3 Desenvolvimento dos marcadores AFLP	37
3.6.4 Marcadores microssatélites-AFLP	40
3.7 Genotipagem da população de mapeamento F ₁ e construção do mapa de ligação	41
3.8 Análise dos QTL	43
3.8.1 Mapeamento por intervalo composto	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 Análises fenotípicas	49
4.1.1 Análises de variância individuais.....	49
4.1.2 Análise de variância conjunta	54
4.1.3 Estimativas das variâncias genéticas, fenotípicas e ambientais em cada local e da interação genótipo x local na análise conjunta	57
4.1.4 Estimativas dos coeficientes de correlação genética e fenotípica	62
4.1.5 Resposta esperada com a seleção	63
4.2 Análises moleculares: genotipagem da população de mapeamento (F ₁) e segregação das marcas SSR, AFLP e M-AFLP.....	68
4.3 Construção dos mapas de ligação	71
4.4 Mapeamento de QTL	80
4.4.1 Mapeamento por intervalo composto.....	80
4.5 Análise crítica sobre o estudo dos QTL	112
5.CONCLUSÕES	125
REFERÊNCIAS	127

RESUMO

Caracterização fenotípica e molecular de uma população F_1 de maracujá-doce visando à construção de mapas de ligação e identificação de QTL

A cultura do maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis, $2n = 18$) ainda não apresenta expressão comercial como a do maracujá-amarelo. No entanto, por se tratar de uma frutífera relativamente nova nos mercados, com grande potencial de expansão, devido ao seu valor agregado, há necessidade de se realizarem estudos genéticos e de melhoramento visando a sua expansão comercial, que deve vir acompanhada pela geração de conhecimento científico, bem como pela liberação dos primeiros cultivares. Assim, o objetivo deste estudo foi estimar parâmetros genéticos, fenotípicos e os ganhos genéticos por seleção, construir um mapa genético integrado com base em marcadores AFLP e SSR e mapear QTL relacionados à produção e qualidade de fruto. Para tal, foi utilizada uma população F_1 composta por 180 indivíduos, provenientes do cruzamento simples entre dois acessos de maracujá-doce. Para a construção dos mapas de ligação, utilizou-se um algoritmo que estima, por verossimilhança, simultaneamente, a fase de ligação e a frequência de recombinação, especialmente desenhado para espécies não endogâmicas. Em paralelo, 100 genótipos dessa mesma população, foram avaliados fenotipicamente em dois ambientes, no Estado de São Paulo, Brasil, para os seguintes caracteres: número de frutos por parcela, peso médio de frutos, comprimento e diâmetro médio de frutos, espessura média da casca, peso médio da casca, peso médio da polpa produção e teor de sólidos solúveis totais. Procederam-se as análises de mapeamento de QTL usando o método de mapeamento por intervalo composto (CIM) e marcadores com diferentes padrões de segregação, estimando as fases de ligação e os padrões de segregação dos QTL. Foram obtidos nove grupos de ligação integrados, sendo dois deles compostos apenas por marcas de um dos genitores, com segregação 1:1. As análises estatísticas dos dados fenotípicos mostraram que a população F_1 apresenta variabilidade genética suficiente para ser explorada em programas de melhoramento. As estimativas dos ganhos com seleção direta variaram de 5,27 % a 35,85 % e de 1,76% a 31,32% dentro de cada ambiente, respectivamente. De modo geral, os ganhos genéticos com seleção indireta foram inferiores. As análises de mapeamento identificaram 57 QTL associados a todos os caracteres. A proporção da variação fenotípica (R^2) explicada pelos QTL variou de 0,90% (diâmetro médio do fruto, em um ambiente) a 11,26% (peso médio da polpa, em outro

ambiente). Houve predomínio de ação gênica aditiva no controle dos caracteres quantitativos. Diferentes fases de ligação entre os marcadores e os alelos dos QTL foram identificadas, assim como QTL com diferentes padrões de segregação. O mais importante deles, designado PPa₂, explicou 11,26 da variância (R^2) do caráter peso de médio de polpa.

Palavras-chave: Maracujá-doce; Mapa genético; Mapeamento de QTL; Parâmetros genéticos

ABSTRACT

Phenotypic and molecular characterization of a F₁-population of the sweet passion fruit for linkage map construction and QTL identification

The sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis, 2n = 18) does not show the same commercial expression of the yellow passion fruit. However, as the fruit species is relatively new in the markets, with great potential for expansion due to its aggregate value, there is much interest in developing genetic and breeding studies to support the commercial expansion of the crop, besides the production of scientific knowledge and the release of the first cultivars. Then, the objective of this study was to estimate genetic and phenotypic parameters and the genetic gain by selection, to construct an integrated genetic map based on AFLP and SSR markers, and to map QTL related to production and fruit quality. For that, we produced a F₁-population composed of 180 individuals, originated from a single cross between two sweet passion fruit accessions. For map construction, we used an approach based on simultaneous maximum-likelihood estimation of linkage and linkage phases, specially designed for outcrossing species. In parallel, 100 individuals of the same population were evaluated phenotypically in two different environments, in the State of São Paulo, Brazil, for the following: number of fruits per plant, average weight of the fruits, average length and width, of the fruits, average width of mesocarp, average weight of mesocarp, average weight of pulp, fruit yield per plant and average content of total soluble solids in Brix degrees. QTL mapping were performed using the Composite interval mapping (CIM) method and markers exhibiting different segregation ratios for estimating the linkage phases and QTL segregation patterns. Nine integrated linkage groups were obtained, two of them were composed each exclusively of 1:1 segregating markers from one of the parents. Phenotypic data analyses showed that there is enough genetic variability in the F₁-population to be exploited in breeding programs. Estimated genetic gains from direct selection ranged from 5.27 % to 35.85 % and from 176% to 31.32% within each environmental, respectively. Genetic gains from indirect selection were generally lower. Mapping analyses identified 57 QTL related to all phenotypic traits. The proportion of the phenotypic variation (R²) explained by QTL ranged from 0.90% (average width of the fruits, in one site) to 11.26% (average weight of pulp, in the other site). Most genetic variance was additive for the quantitative traits. Different linkage phases

between markers and QTL alleles were identified as well as QTL with different segregation patterns. The most important QTL, denoted as PPa2, explained 11.26% of the variance (R^2) of the trait average weight of pulp.

Keywords: Sweet passion fruit; Genetic map; QTL mapping; Genetic parameters

1. INTRODUÇÃO

O nome maracujá vem da designação indígena *Mara-cuiá*, que significa “comida preparada na cuiá” (FUMIS; SAMPAIO, 2007). Outras denominações como flor da paixão, *fleur de la passion*, em francês e *passion flower*, em inglês, designam as espécies do gênero *Passiflora* (palavra latina composta de *passio*, a paixão e de *flos oris*, a flor).

O maracujazeiro pertence à ordem *Passiflorales* e à família *Passifloraceae* representada por 18 gêneros e 630 espécies (CUNHA; BARBOSA, 2002). No Brasil, a família é representada pelos gêneros *Passiflora* e *Dikea*, sendo o primeiro composto de 24 subgêneros e 465 espécies. Dentre as espécies, 150 são originárias do Brasil e, aproximadamente, 70 apresentam frutos comestíveis (CUNHA et al., 2002; VIEIRA e CARNEIRO, 2004). O maracujá-doce é também conhecido como maracujá de refresco, maracujá do grande, maracujá-alado, maracujá-guassu ou maracujá de comer. Esta espécie é provavelmente originária do Brasil, sendo que suas áreas de dispersão estão localizadas na Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás, Amazonas, Distrito Federal e no Pará. É também encontrada no Peru (CUNHA et al., 2002).

O maracujá-doce apresenta flores grandes e hermafroditas com estigmas localizados acima das anteras, o fruto tem formato variado, com peso variando de 30 a 500g, de 4 a 10 cm de diâmetro, sendo a cor da casca, predominantemente, amarela alaranjada. Quando maduro, o fruto não se desprende. A polpa do fruto varia de cor esbranquiçada a laranja, envolve sementes numerosas, ovais, pretas; em média, há 200 sementes por fruto. Os frutos de maracujá-doce são destinados principalmente para o mercado de frutas frescas, sendo comercializados em centrais de abastecimento de hortifrutigranjeiros.

No Brasil, o cultivo restringe-se a pequenos sítios e chácaras de fruticultores, que exploram além dos frutos, folhas e flores. Devido a sua propagação por sementes de qualidade não reconhecida, os pomares comerciais de maracujá-doce apresentam acentuada variabilidade genética, verificando-se, como consequência, variações pronunciadas entre indivíduos, em caracteres relacionados à planta, inflorescência e fruto. A cultura de maracujá-doce apresenta muitos problemas que precisam ser solucionados ou minimizados com o emprego de programas de melhoramento para a espécie (JUNQUEIRA et al., 2005). Segundo Savazaki (2003), não existe nenhuma variedade selecionada de maracujá-doce.

De um modo geral, as características de importância agronômica, como produção e resistência a pragas e doenças, são controlados por muitos genes e sofrem influência ambiental. Ferramentas da genética molecular, como os marcadores moleculares, têm permitido a identificação de marcadores que “monitoram” a expressão de genes que controlam caracteres de importância agronômica, auxiliando no processo de seleção.

Esta seleção baseia-se no princípio de que se um gene, ou um grupo de genes, encontra-se fortemente ligado a um marcador de fácil identificação, este marcador pode ser utilizado para selecionar a característica de interesse em programas de melhoramento. Segundo Hayward et al. (1994), o método mais eficaz para determinar este tipo de associação envolve a construção de mapas genéticos detalhados, nos quais podem ser localizadas regiões que contêm locos de caracteres quantitativos, denominados QTL (*Quantitative Trait Loci*).

Em experimentos de mapeamento genético, rotineiramente, são utilizadas populações oriundas do cruzamento de linhagens endogâmicas. No entanto, para certas espécies que apresentam ciclo de vida muito longo ou sistemas de auto-incompatibilidade, a obtenção de tais populações é impraticável, devido ao tempo demandado para a sua obtenção e pela forte depressão por endogamia que ocorre nestas espécies quando submetidas à autofecundação.

Assim, dando continuidade a uma linha de pesquisa do Departamento de Genética da ESALQ/USP sobre espécies comerciais do gênero *Passiflora*, o presente trabalho teve como objetivo:

- (i) Avaliar fenotipicamente uma população F_1 segregante de maracujá-doce, obtida do cruzamento entre duas plantas dos acessos 2(12) e SV3.
- (ii) Estimar parâmetros genéticos e fenotípicos, tais como, variância genética e fenotípica, coeficiente de herdabilidade, coeficiente de correlação genética e fenotípica e o ganho de seleção.
- (iii) Construir mapas genéticos baseados em marcadores moleculares do tipo AFLP e SSR.
- (iv) Mapear QTL relacionados aos caracteres fenotípicos avaliados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância econômica da cultura do maracujá

O gênero *Passiflora* possui três espécies importantes economicamente: *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (maracujá-amarelo ou maracujá-azedo), *P. edulis* Sims f. *edulis* (maracujá-roxo) e *Passiflora alata* Curtis (maracujá-doce). O maracujá-amarelo é a espécie mais cultivada no nosso país, respondendo por 95% do volume de frutos comercializados (MELETTI et al., 2003). Isso se deve, basicamente, à divulgação junto aos consumidores e ao incentivo das agroindústrias do setor de processamento de frutas. No Brasil, a cultura de maracujá-amarelo, com aproximadamente 33.000 ha plantados, apresenta produtividade média de 14,14 toneladas/ha. Apresentou, no intervalo de 1994 a 2001, aumento em produção da ordem de 23% e, em produtividade, de 24,58% (FNP Consultoria & Agroinformativos, 2004).

Para a cultura do maracujá-doce, os dados de produção não têm sido organizados sistematicamente, sendo que, atualmente, os estados brasileiros com maior produção são: São Paulo, Santa Catarina e o Distrito Federal (MANICA; OLIVEIRA Jr., 2005). A área ocupada pelo maracujá-doce é muito inferior à área ocupada pelo maracujá amarelo. No Estado de São Paulo, a cultura do maracujá-doce concentra-se em algumas regiões produtoras tais como: São João da Boa Vista, Registro, Pindamonhangaba, Piracicaba, Barretos, Presidente Prudente, Limeira e Mogi Mirim. Segundo levantamento da CATI- Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (agosto/2003), a área ocupada está em torno de 170 ha, sendo a área média, por produtor, de 1,40 ha.

O fruto de *P. alata* tem atraído a atenção de fruticultores devido ao seu elevado valor comercial comparativamente aos preços praticados para o maracujá-amarelo no mercado atacadista (VASCONCELLOS; CEREDA, 1994). No entanto, trata-se de uma fruta pouco conhecida pela população, devido basicamente a dois fatos: a baixa oferta do produto e aos elevados preços praticados. Destaca-se em apenas uma pequena parcela do mercado consumidor dos grandes centros quais sejam, São Paulo e Brasília (MANICA; OLIVEIRA Jr., 2005).

Outro atrativo do maracujá-doce é o conteúdo de passiflorina, um calmante natural extraído das folhas, que vem atraindo a atenção das indústrias farmacêuticas para fabricação de medicamentos e para o tratamento de excitações nervosas, ansiedade e insônia (MELETTI; MAIA, 1999; MANICA; OLIVEIRA Jr., 2005). Na agroindústria, o maracujá-doce não é

utilizado como matéria-prima fornecedora de frutos, devido a sua polpa excessivamente adocicada, que produz um suco de sabor enjoativo (OLIVEIRA et al., 1982).

2.2 Melhoramento genético da cultura do maracujá

No Brasil, existem bancos de germoplasma de *Passiflora* e estes se encontram, basicamente, em instituições públicas, como universidades e centros de pesquisas. As principais coleções localizam-se na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, em Jaboticabal, São Paulo; na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB em Vitória da Conquista, Bahia; na Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, em Ilhéus, Bahia; no Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, em Campinas, São Paulo; no Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR, em Londrina, Paraná; na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, Distrito Federal; na Embrapa Cerrados, em Planaltina, Distrito Federal e na Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, Bahia.

Assim como o Brasil, países como África do Sul, Austrália, Camarões, Chile, Colômbia, Costa Rica, Cuba, Equador, EUA, Filipinas, França, Gana, Jamaica, Malauí, Nicarágua, Papua, Nova Guiné, Peru, Quênia, Taiwan e Uruguai mantêm coleções de *Passiflora*, as quais são consideradas pequenas para representar a grande variabilidade natural existente no gênero (OLIVEIRA; FERREIRA, 1991).

O avanço das fronteiras agrícolas, principalmente, pelas culturas de grãos e pela criação de gado, associado ao desmatamento, vem contribuindo para que espécies silvestres de *Passiflora* até então pouco estudadas, passem a fazer parte da lista de plantas da flora brasileira em extinção.

Viana et al. (2003a) avaliaram a diversidade genética por meio de marcadores genéticos (RAPD) das espécies cultivadas no Brasil (*P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata*) e de espécies relacionadas *P. giberti* N. E. Brown, *P. cincinnata* Mast, *P. foetida* L., *P. maliformis* L., *P. mucronata* Lam., *P. suberosa* L. e *P. malacophylla* Mast., observando grande variabilidade e recomendando-as para hibridações interespecíficas, visando principalmente à resistência a doenças. Há vários outros estudos sobre avaliação da diversidade genética de espécies de *Passiflora* e, de modo geral, percebe-se maior diversidade entre espécies do que dentro delas (CERVI; GUERRA, 2001, SOUZA et al., 2004, CUCO et al., 2005). Meletti et al. (1997), utilizando germoplasma nativo de maracujá-amarelo, concluíram que é possível e recomendável

explorar a variabilidade natural em programas de melhoramento, com ganhos genéticos significativos, devido a diversidade existente dentro da espécie.

Para desenvolver cultivares de maracujá, é preciso, primeiramente, conhecer, explorar e manusear convenientemente a variabilidade genética disponível. Diversos pesquisadores brasileiros vêm caracterizando acessos dos bancos de germoplasma e populações oriundas de cruzamentos controlados de maracujás, principalmente maracujá-amarelo, seja fenotipicamente (MELETTI et al., 1992, MELETTI et al., 2003, VIANA et al., 2004, MORAES et al., 2005, NUNES, 2006, VIANA et al., 2006, NEGREIROS et al., 2008, SILVA et al., 2009) ou molecularmente (MORAES et al., 2005; BELLON et al., 2009). Esses trabalhos indicaram alta variabilidade genética a ser explorada para fins de melhoramento de populações de maracujazeiro.

Já em 1997, Bruckner afirmava que estudos mais precisos e adequados são necessários para o melhoramento de maracujazeiro, para que se mantenham os ganhos genéticos em produtividade, qualidade de frutos e resistência a principais doenças e pragas.

Atualmente, grande parte dos pomares comerciais de maracujá-amarelo é composta por variedades selecionadas seja para produção, qualidade de frutos ou tolerância a pragas e doenças. Isto se deve aos esforços de alguns pesquisadores de universidades, institutos de pesquisa e da Embrapa que, ao longo dos últimos 15 anos, liberaram genótipos superiores dessa fruteira, de modo a fornecer ao produtor um produto diferenciado que lhe proporcionasse uma maior produção e lucratividade. No entanto, encontram-se ainda, em pequenas propriedades, agricultores que selecionam as plantas mais produtivas de frutos desejáveis e as multiplicam.

Essa seleção visual muito praticada pelos fruticultores de maracujá-amarelo tem sido realizada por aqueles que plantam maracujá-doce para a formação dos seus pomares, uma vez que não existem variedades comerciais, tampouco estudos que sobre a espécie e populações melhoradas disponíveis.

Outro aspecto importante no maracujazeiro é a produção de híbridos a partir de linhagens auto-incompatíveis, porém, para que isso seja possível, é necessário que exista diversidade suficiente de alelos S para que ocorra boa frutificação (MELETTI; BRUCKNER, 2001). A auto-incompatibilidade é um mecanismo importante que determina a alogamia destas espécies, pois impede que plantas produtoras de gametas masculinos e femininos funcionais produzam sementes quando polinizadas (BRUCKNER et al., 2005; FERREIRA et al., 2010).

Nas últimas décadas, o melhoramento genético de *Passiflora* tem se restringido apenas à cultura do maracujá-amarelo, que concentra a maioria dos trabalhos relacionados ao gênero, com estudos relacionados à estimativa de parâmetros genéticos e à aplicação de metodologias de seleção, como seleção massal, seleção entre e dentro de famílias, seleção combinada, seleção recorrente e índice de seleção (VIANA et al., 2003b, 2004, MORAES et al., 2005, NUNES 2006, VIANA et al., 2006, JUNQUEIRA et al., 2008, NEGREIROS et al., 2008, SILVA et al., 2009).

Atualmente, na Embrapa Cerrados, tem sido feitas tentativas de transferência de genes de resistência de espécies silvestres para as comerciais de maracujazeiro por meio de hibridações interespecíficas, seguidas de um programa de retrocruzamentos, auxiliados por marcadores moleculares (FONSECA et al., 2009).

2.3 Mapas genéticos em populações não endogâmicas, com ênfase em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*

Os primeiros estudos envolvendo marcadores genéticos se restringiam apenas a marcadores morfológicos. No entanto, o seu número reduzido e a influência que as variações ambientais exerciam sobre estes, os tornaram de uso limitado. Os marcadores morfológicos se apresentam como não-neutros, em relação a possíveis efeitos ambientais, pleiotrópicos ou epistáticos e, em geral, são de herança dominante. Estes fatores também comprometem a cobertura dos genomas por esses marcadores (STUBER, 1992).

Em 1950, os primeiros mapas de ligação em plantas foram construídos com o uso de marcadores isoenzimáticos (TANKSLEY; RICK, 1980; VALEJJOS et al., 1991; VALEJJOS; SAKIYAMA; CHASE, 1992; PHILIPP, WEHLING e WRICKE, 1994). Também na década de 50, Watson e Crick (1953) anunciaram para a comunidade científica a descoberta da estrutura do DNA; em seguida, Nirenberg e Matthaei (1961) anunciaram a descoberta do código genético. Estas descobertas levaram ao desenvolvimento de metodologias de sequenciamento de nucleotídeos de uma determinada região do DNA (SANGER, 1975), a obtenção de fragmentos de DNA gerados por restrição enzimática (SOUTHERN, 1975) e a amplificação de sequências específicas da molécula de DNA, via PCR (MULLIS; FALOONA, 1987). Como consequência, ocorreu o desenvolvimento de marcadores moleculares que exploram os polimorfismos de DNA,

os quais supriram as limitações apresentadas pelos marcadores morfológicos e isoenzimáticos (FUNGARO; VIEIRA, 2001).

Dentre os marcadores moleculares, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) (GRODZIKER et al., 1974) foi o primeiro a ser utilizado na construção de mapas genéticos. Tal metodologia apresenta como vantagem principal a herança codominante. Ao possibilitar a utilização de sondas heterólogas, permite também a construção de mapas de espécies afins. No entanto, este procedimento é bastante laborioso, com grande complexidade técnica, requerendo laboratórios bem equipados e mão-de-obra especializada.

Com o descobrimento da técnica de PCR, na década de 80, a síntese enzimática de fragmentos de DNA *in vitro* passou a ser rotineira nos laboratórios. A partir daí, surgiram vários tipos de marcadores moleculares com base em PCR, dentre os mais utilizados estão: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (VOS et al., 1995) e SSR (*Single Sequences Repeats*) (LITT ; LUTTY, 1989).

Recentemente, uma nova classe de marcadores tem despertado o interesse de muitos grupos de pesquisa, devida a sua abundância no genoma. Tais marcadores são decorrentes de mutações pontuais e é possível distinguir seus alelos na região genômica sequenciada. Esta nova classe é denominada SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*).

De posse dessa variedade de marcadores genéticos, os mapas genéticos tem se tornado um recurso de valor inestimável, em diversos aspectos, dentre as várias ferramentas da genética molecular disponíveis para o melhoramento de plantas. Para a construção de mapas genéticos em plantas, diversos tipos de populações podem ser utilizados, cada uma com características próprias, apresentando vantagens e desvantagens, que devem ser levadas em consideração pelo pesquisador no momento de selecionar populações para fins de estudo (SCHUSTER; CRUZ, 2004).

As populações mais comuns utilizadas na construção de mapas genéticos são F₂, de retrocruzamento, populações derivadas por autofecundação a partir da geração F₂ e linhagens endogâmicas recombinantes (RILs – *Recombinant Inbred Line*).

Porém, nos maracujás, o mecanismo de auto-incompatibilidade, que determina a alogamia destas espécies, impede ou limita o pesquisador a produzir esses tipos de população, naturalmente. Em espécies de ciclo longo, como o eucalipto, por exemplo, esta limitação também

é levada em consideração. Para contornar esse problema, inicialmente, foi adotada a estratégia *2-way pseudo testcross* (RITTER et al., 1990). Nessa estratégia, a configuração do cruzamento não é conhecida *a priori*, como em um cruzamento-teste clássico, mas inferida à *posteriori*, após a análise da segregação. Tal metodologia foi utilizada de forma eficiente para espécies de cruzamento ou auto-incompatíveis (CARLSON et al., 1991; GRATAPAGLIA; SEDEROFF, 1994, MALIEPAARD et al., 1997).

Nesse contexto, foram construídos dois mapas genéticos de maracujá-amarelo, sendo que no primeiro mapa foram utilizados marcadores moleculares do tipo RAPD (CARNEIRO et al., 2002) e, no segundo mapa, marcadores do tipo AFLP (LOPES et al., 2006). Matta (2005) realizou um trabalho envolvendo a mesma população de maracujá-amarelo no sentido de integrar os mapas individuais gerados pela estratégia *2-way pseudo-testcross*. Esse autor utilizou marcadores com segregação 3:1 (em F_1) para fazer tal integração e o software JoinMap® 3.0.

Recentemente, Oliveira et al. (2008) obtiveram um mapa único de maracujá-amarelo utilizando os dados de AFLP gerados por Lopes (2003) e marcadores microssatélites. Esta integração só foi possível devido: (i) à metodologia proposta por Wu et al. (2002a) que estima, simultaneamente, a fase de ligação e a fração de recombinação em populações não endogâmicas e (ii) ao uso de marcadores codominantes do tipo microssatélites (SSR) como ponte. Estes locos SSR mostram alelos em ambos os genitores (salvo casos de alelos nulos) e, por isso, permitem a geração de um mapa único, diferentemente da estratégia *2-way pseudo testcross*.

No melhoramento genético de plantas tem-se utilizado, cada vez mais, marcadores moleculares com o intuito de se obter maior eficiência na seleção e piramidação de fatores genéticos. Marcadores moleculares ligados fisicamente a locos que controlam caracteres de importância econômica têm sido identificados, permitindo a seleção indireta de características desejáveis em gerações segregantes precoces (CAIXETA et al., 2006).

Sobre o mapeamento de caracteres quantitativos, existem poucas informações quanto ao número de locos, posição cromossômica, magnitude do efeito e interações dos locos que controlam a sua expressão em populações de maracujá, a exemplo de outras espécies tropicais cultivadas. Por sua natureza complexa e pela importância que apresentam, tanto sob ponto de vista evolutivo quanto do melhoramento genético, os caracteres quantitativos são muito estudados, porém pouco compreendidos (COELHO, 2000).

2.4 Mapeamento de QTL

Caracteres com herança quantitativa apresentam um perfil contínuo, não se observando a presença de classes discretas nas populações. O fenótipo é resultado da ação de vários locos sob a influência ambiental (TANKSLEY, 1993). Os métodos clássicos de genética quantitativa consideram somente os efeitos agregados de todos os genes causando a variação no caráter e uma completa descrição do caráter necessita levar em consideração as propriedades dos genes, individualmente e a magnitude de seus efeitos (FALCONER; MACKAY, 1996).

Para melhor compreender a natureza dos caracteres quantitativos, métodos vêm sendo desenvolvidos para estudar os locos individuais que controlam este tipo de caráter. Tais locos foram denominados QTL (*Quantitative Trait Loci*). Para que tal estudo seja realizado, faz-se necessário uma análise conjunta dos dados referentes aos genótipos marcadores e aos valores fenotípicos dos indivíduos que compõem as populações segregantes. Uma vez estimada uma associação entre estes dois conjuntos de dados, é possível detectar e mapear um QTL.

Assim, o desenvolvimento dos marcadores moleculares, de métodos genéticos-estatísticos e de ferramentas computacionais possibilitou o estudo detalhado da herança e arquitetura de caracteres complexos, ou seja, permitiu o estudo dos QTL detalhadamente (FALCONER; MACKAY, 1996).

A utilização de marcadores moleculares para mapear e caracterizar QTL está fundamentada no desequilíbrio de ligação existente numa população segregante, fazendo com que sejam geradas associações entre os marcadores e o QTL. Uma associação significativa entre os marcadores e a expressão do caráter pode evidenciar a presença de um QTL próximo fisicamente ao marcador.

O estudo de locos quantitativos depende, também, da obtenção de uma população segregante estruturada, seja F_2 , retrocruzamento, RILs (populações de mapeamento tradicionais) ou F_1 (populações de indivíduos não-endogâmicos) (LIN et al., 2003). O mapeamento de QTL em populações tradicionais de mapeamento é relativamente simples, uma vez que há apenas dois alelos segregando e a segregação dos marcadores é conhecida *à priori*, maximizando assim a associação e detecção dos QTL. No entanto, segundo Lin et al. (2003), quando se estudam populações oriundas de genitores preferencialmente heterozigóticos, os marcadores apresentam

diversos tipos de segregação, o número de alelos podem variar de um a quatro (em diplóides), e as fases de ligação entre marcadores é desconhecida, assim como entre QTL e marcadores.

Populações não endogâmicas têm sido utilizadas para o mapeamento de QTL, seja de espécies florestais (BUNDOCK et al., 2008, SHEPHERD et al., 2008, DILLEN et al., 2009) ou frutíferas (MORAES, 2005, CHAPARRO; BECKMAN, 2008, OYANT et al., 2008, BOKSZCZANIN et al., 2009, DUREL et al., 2009, FAZIO et al., 2009, STOECKLI et al., 2009).

O poder de detecção do QTL será tanto maior quanto maior for a cobertura do genoma pelos marcadores, bem como o número de indivíduos genotipados e analisados fenotipicamente para os caracteres quantitativos (LANDER; BOTSTEIN, 1989). Nesta situação, para que se possam identificar QTL, podem-se utilizar diversas metodologias, desde as mais simples, como análise de marcas individuais, até modelos que analisam mais de uma região do genoma, simultaneamente (JANSEN; STAM, 1994, ZENG, 1994, KAO; ZENG; TEASDALE, 1999).

A metodologia de mapeamento de QTL que envolve marcas simples baseia-se na comparação entre as médias das classes genotípicas dos marcadores, o que pode ser realizado por meio do teste *t*, análise de variância e regressão linear simples (LYNCH; WALSH, 1998) e teste da razão de verossimilhança (WELLER, 1986). Como vantagem, esta metodologia apresenta simplicidade e rapidez, podendo ser facilmente estendida para múltiplos locos, não sendo necessário ter um mapa de ligação para essas análises. No entanto, apresenta o inconveniente de não distinguir um QTL de pequeno efeito, localizado próximo a um marcador, de um QTL de grande efeito, localizado mais distante do marcador, comprometendo, assim, a estimação correta dos efeitos e da posição no genoma de cada QTL.

Segundo Broman (2001), o poder do teste é fortemente afetado quando não se observa um nível adequado de saturação do mapa pelos marcadores, uma vez que os QTL com distância considerável podem não ser detectados.

Já em 1989, Lander e Botstein propuseram uma nova metodologia denominada mapeamento por intervalo. Este método utiliza, para análise, marcadores adjacentes flanqueando um possível QTL, permitindo, dessa forma, o aumento no poder de detecção, precisão nas estimativas dos efeitos e nas posições dos QTL. Entretanto, o mapeamento por intervalo simples, que avalia um intervalo de cada vez, sem considerar o restante da informação do genoma, apresenta problemas de detecção, especialmente quando houver outros QTL de grande efeito no mesmo ou em outros grupos de ligação. Desse modo, não há como determinar se o efeito

significativo observado é devido a um QTL ou a vários ligados. Além disso, quando múltiplos QTL estão presentes, um problema comum é a observação de falsos positivos, ou seja, são detectados QTL inexistentes ou QTL fantasmas.

Com o intuito de eliminar os QTL fantasmas, Jansen (1993, 1996) e Zeng (1993, 1994), de forma independente, propuseram um modelo de regressão múltipla, denominado mapeamento por intervalo composto (CIM). Este método combina mapeamento por intervalo e regressão linear múltipla e tem como característica principal evitar que um QTL presente em qualquer posição do genoma interfira no mapeamento do QTL no intervalo considerado. Isto é feito incluindo, no modelo de regressão múltipla, a informação de marcadores adjacentes ao intervalo considerado e de marcadores presentes em outros grupos de ligação, sob a forma de co-fatores (covariáveis). Este método apresenta como limitação o fato de não considerar o efeito epistático entre os genes, ou seja, o efeito de interação entre alelos de diferentes locos é ignorado (ZENG, 1994).

Segundo Zeng (1994), co-fatores são os marcadores que apresentam maior associação com o caráter e os mesmos não deverão exceder o número de $2\sqrt{n}$, sendo n o número de observações. Para selecionar tais co-fatores, vários métodos podem ser utilizados, como o *forward*, *backward* e o *stepwise*.

Kao et al. (1999) propuseram um modelo mais complexo que considera múltiplos intervalos simultaneamente, denominado de mapeamento por intervalos múltiplos. O diferencial desta metodologia está na incorporação da estimativa da epistasia no modelo. E, como vantagem, apresenta maior eficiência e precisão na identificação de QTL, identificação e entendimento dos padrões epistáticos, possibilitando agregar os efeitos epistáticos ao ganho genético por meio de seleção assistida por marcadores.

2.5 Mapeamento de QTL em populações não endogâmicas

Como dito anteriormente, para algumas plantas não é possível a produção de linhagens endogâmicas, seja por fatores genéticos, bioquímicos ou fisiológicos da espécie. Dentre estes fatores, podemos destacar (i) o grande período juvenil que as espécies arbóreas e algumas frutíferas possuem, (ii) o mecanismo de auto-incompatibilidade, que não permite que a espécie se

autofecunde como observado em cacau, café e maracujá, (iii) a complexidade do genoma como a cana-de-açúcar apresenta e (iv) a alta depressão por endogamia.

Moraes (2005) mapeou QTL associados à produção e a diversos caracteres de qualidade de fruto em maracujá-amarelo. Conner et al. (1998) e Kenis et al. (2008) mapearam QTL associados ao crescimento e à altura de planta no período juvenil e à qualidade de frutos, em macieira, respectivamente. Freeman et al. (2008) mapearam QTL relacionados ao mecanismo de defesa da planta contra a ação de herbívoros, em eucalipto, na Austrália. Zhang et al. (2010) mapearam QTL associados à qualidade de frutos de cerejeira.

Nesses casos, o mapeamento de QTL é feito usando uma população segregante F_1 (irmãos-germanos) obtida pelo cruzamento entre indivíduos não aparentados e fenotipicamente contrastantes. Devido à maioria dos locos estarem em heterozigose, diversos padrões de segregação podem ocorrer. Wu et al. (2002a) afirmam que é possível a ocorrência de até 18 tipos de segregação, com até quatro alelos informativos para as espécies diplóides e estes podem ser completamente informativos (1:1:1:1) ou parcialmente informativos (1:2:1, 3:1 e 1:1).

Com relação aos QTL, o não conhecimento da fase de ligação entre o QTL e o marcador, dificulta o mapeamento, pois o conhecimento da fase de ligação é de extrema importância para a determinação da origem dos alelos de interesse. Devido a essa particularidade, o mapeamento de QTL tem sido feito por três metodologias, a saber: a) marcas analisadas individualmente; b) *2-way pseudo testcross* e c) mapeamento de QTL em mapa integrado.

A análise com marcas simples é similar àquelas realizadas com populações tradicionais de mapeamento, apresentando, no entanto, as mesmas limitações.

Grattapaglia e Sederoff (1994) propuseram a utilização de marcadores com segregação 1:1 para a construção de mapas de ligação e mapeamento de QTL, numa abordagem conhecida como *2-way pseudo testcross*. Nesta metodologia, são gerados dois mapas de ligação, indivíduo-específico para cada genitor, sendo os marcadores com configuração *ao x oo* informativos para o genitor 1 e *oo x ao*, informativos para o genitor 2.

Essa abordagem tem sido amplamente empregada na prática, pois permite a utilização de metodologias e *softwares* desenvolvidos para populações tradicionais de mapeamento (F_2 , retrocruzamento e RILs) (MYBURG et al., 2003; LANTERI et al., 2006; LOPES et al., 2006; AITKEN et al., 2008; BUNDOCK et al., 2008; CHEN et al., 2008; GAUDET et al., 2008; PIPERIDIS et al., 2008).

Como desvantagem, essa abordagem não permite que marcadores com outros tipos de segregação sejam utilizados na construção dos mapas, não conseguindo gerar um único mapa. Em relação ao mapeamento de QTL, somente é possível detectar com precisão os QTL que segregam em um dos genitores e que não possuam efeito de dominância.

Gazaffi (2009) propôs uma nova metodologia para mapear QTL em mapas de ligação integrados para populações F_1 , utilizando o modelo CIM. Tal metodologia permite a detecção de um maior número de QTL e mapeando QTL com diferentes padrões de segregação, além de identificar seus efeitos (aditivo e dominante) e as fases de ligação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

A população de mapeamento, constituída de 180 indivíduos F_1 , foi obtida de um cruzamento controlado entre dois acessos de maracujá-doce. O genitor feminino, denominado 2(12), foi fornecido pelo Dr. Nilton Junqueira (Embrapa Cerrados) e o masculino, denominado SV3, foi coletado em uma propriedade particular, situada no município de Piracicaba, SP.

3.2 Obtenção, semeadura e clonagem dos indivíduos da população de mapeamento (F_1)

O cruzamento entre os acessos SV3 e 2(12) foi realizado em ambiente protegido (casa de vegetação), em outubro de 2006 (Figura 1). Foram utilizadas duas flores, protegidas com saco de papel dois dias antes da antese (a flor apresentava início de abertura das sépalas) do genitor 2(12), e os frutos foram colhidos em janeiro de 2007.

Figura 1. Etapas da polinização em *Passiflora alata* e obtenção do fruto: (A) Flor no dia da antese; (B) Excisão parcial dos estaminódios; (C) Coleta de pólen; (D) Detalhe da coleta de pólen nas anteras; (E) Polinização manual; (F) Detalhe da polinização, esfregação do pólen no estigma; (G) Formação do fruto após 5 dias

A semeadura da população de mapeamento F_1 se deu em março de 2007: foram plantadas 256 sementes em duas bandejas de isopor com 128 células contendo substrato Plantmax®. As mudas foram transferidas em maio de 2007 para vasos plásticos (1L) contendo 75% de terra e 25% de substrato (Figura 2).

A multiplicação vegetativa (clonagem) foi realizada por meio de estaquia, durante o segundo semestre de 2007. Cada clone forneceu 10 segmentos nodais, em duas coletas realizadas quando os clones atingiram 15 a 30 cm de altura.

Figura 2. População de mapeamento (F_1), 30 dias após a germinação, devidamente transferida e etiquetada em ambiente protegido

3.3 Espaçamento, plantio e tratos culturais da população de mapeamento (F_1) a campo

O espaçamento utilizado foi de 3 m entre linhas e 5 m na linha, que corresponde ao tamanho da parcela. A condução foi feita em espaldeira com um fio de arame (tipo frutifio), a 2 m de altura do solo. Desde o plantio, foram realizados todos os tratos culturais recomendados, tais como: condução da planta, poda, adubação, controle das ervas daninhas, controle de pragas e doenças.

O experimento foi conduzido em dois ambientes: na Estação Experimental do Anhembi, do Departamento de Genética da ESALQ/USP, a qual se encontra nas proximidades do distrito de Anhumas, a 55 km de Piracicaba, SP (22°47' latitude sul, 48°07' longitude oeste e altitude de 500 m) e na propriedade rural do Sr. *Hildebrando Borgonove* na cidade de Descalvado, SP (21°54' latitude sul, 47°37' longitude oeste e altitude de 679 m) a 140 km de Piracicaba. Os

plantios foram realizados em fevereiro e abril de 2008 no Anhembi e em Descalvado, respectivamente.

3.4 Avaliações fenotípicas da população de mapeamento (F_1), delineamento experimental e caracteres avaliados

O delineamento experimental utilizado foi o látice quadrado 10 x 10 com duas repetições nos ambientes Anhembi e Descalvado. A parcela experimental foi constituída por três plantas (clones) que foram dispostas nas linhas, totalizando 15 m lineares para cada parcela.

As plantas F_1 foram avaliadas para os caracteres de produção e qualidade do fruto. As seguintes avaliações foram feitas por parcela, individualmente:

Número de frutos por parcela (NF): o total de frutos foi contado nas parcelas a cada três meses;

Peso médio de frutos (PF): obtido com a pesagem de 10 frutos por parcela, usando uma balança digital, sendo a leitura expressa em gramas (g);

Comprimento médio de frutos (CF): obtido pela medição de 10 frutos por parcela, medindo-se o eixo longitudinal do fruto com o uso de paquímetro digital (DIGIMESS), sendo a leitura expressa em milímetros (mm);

Diâmetro médio de frutos ou calibre (DF): obtido pela medição de 10 frutos por parcela na região equatorial do fruto, usando paquímetro digital, sendo a leitura expressa em milímetros (mm);

Espessura média da casca (EC): obtida pela medição da casca na porção mediana dos frutos cortados, totalizando 10 frutos por parcela, usando um paquímetro digital, sendo e a leitura expressa em milímetros (mm);

Peso médio da casca (PC): obtida com a pesagem da casca de 10 frutos por parcela, com auxílio de uma balança digital, sendo a leitura expressa em gramas (g);

Peso médio da polpa (PP): obtida com a pesagem da polpa de 10 frutos por parcela, com auxílio de uma balança digital, sendo a leitura expressa em gramas (g);

Produção (PR): obtida em kg por parcela pela pesagem de dez frutos;

Teor de sólidos solúveis totais (SST): o teor de sólidos solúveis totais de 10 frutos foi determinado por refratometria, utilizando um refratômetro portátil, com leitura na faixa de 0 a 32° Brix.

3.5 Tratamento estatístico dos dados fenotípicos

As análises de variância individuais para cada ambiente foram feitas usando-se o programa computacional SAS[®] (*Statistical Analysis System*), utilizando o procedimento GLM- (*General Linear Model*), considerando todos os efeitos aleatórios de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{il(j)} = \mu + t_i + r_j + (b/r)l(j) + e_{il(j)} \quad (1)$$

em que:

$Y_{il(j)}$ refere-se à observação do genótipo i , no bloco l , na repetição j ;

μ é uma constante comum a todas observações;

t_i é o efeito do genótipo i ;

r_j é o efeito da repetição j ;

$(b/r)l(j)$ é o efeito do bloco l na repetição j ;

$e_{il(j)}$ é o erro associado a observação $Y_{il(j)}$ onde $e_{il(j)} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$

A análise de variância conjunta foi feita segundo o procedimento anteriormente descrito, considerando a fonte de variação ambiente fixo e as demais aleatórias. A análise foi feita considerando delineamento em blocos casualizados, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + a_j + ta_{ij} + e_{ij} \quad (2)$$

em que:

Y_{ij} refere-se à observação do genótipo i , no ambiente j ;

μ é uma constante comum a todas observações;

t_i é o efeito do genótipo i ;

a_j é o efeito do ambiente j ;

ta_{ij} é o efeito da interação entre genótipo i e o ambiente j ;

e_{ij} é o erro associado a observação onde $e_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$

Os dados foram primeiramente analisados quanto à obediência das premissas básicas do modelo matemático: a) os parâmetros do modelo estatístico devem ser aditivos; b) os erros experimentais devem ser independentes; c) os erros experimentais devem ter variância comum; d) os erros experimentais devem ter distribuição normal (EISENHART, 1974).

A partir dos quadrados médios das análises de variâncias foram estimados os componentes de variância para cada ambiente e com base na análise conjunta, com auxílio do PROC GLM do SAS®.

A partir dos quadrados médios das análises de variância foram estimados os componentes de variância: $\hat{\sigma}^2$ (estimativa da variância residual), $\hat{\sigma}_f^2$ (estimativa da variância fenotípica), $\hat{\sigma}_g^2$ (estimativa da variância genética), $\hat{\sigma}_a^2$ (estimativa da variância ambiental) e $\hat{\sigma}_{ga}^2$ (estimativa da variância da interação genótipo e ambiente).

Os coeficientes de herdabilidade no sentido amplo entre médias de genótipos foram calculados de acordo com a seguinte expressão:

Para cada ambiente:

$$\hat{h}^2 = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_g^2 + \frac{\hat{\sigma}^2}{j}}; \quad (3)$$

Para a análise conjunta:

$$\hat{h}^2 = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_g^2 + \frac{\hat{\sigma}_{ga}^2}{j} + \frac{\hat{\sigma}^2}{jk}} \quad (4)$$

Os intervalos de confiança para as estimativas de variâncias e das herdabilidades foram obtidas de acordo com os procedimentos de Knapp et al. (1985) e Barbin (1993).

Foi realizada a análise de covariância entre os caracteres dois a dois, seguindo um esquema semelhante ao da análise de variância. A partir das estimativas de covariâncias genéticas e fenotípicas foram estimadas as correlações genéticas e fenotípicas entre os caracteres, de acordo com o procedimento relatado por Kempthorne (1966) e Falconer e Mackay (1996), como segue:

$$r_g = \frac{CÔV(x, y)}{\hat{\sigma}_{g(x)} \hat{\sigma}_{g(y)}} ; \text{ correlação genética entre os caracteres x e y.} \quad (5)$$

$$r_f = \frac{CÔV(x, y)}{\hat{\sigma}_{\bar{f}(x)} \hat{\sigma}_{\bar{f}(y)}} ; \text{ correlação fenotípica entre os caracteres x e y.} \quad (6)$$

O coeficiente de variação genética (CV_g) foi calculado de acordo com a seguinte expressão:

$$CV_g = \frac{\hat{\sigma}_g}{\bar{X}} . 100 \quad (7)$$

em que $\hat{\sigma}_g$ é a raiz quadrada da estimativa da variância genética e $\bar{X}$ é a média da população.

Os ganhos preditos, considerando 30% de intensidade de seleção dos melhores clones, foram calculados para todos os caracteres conforme duas situações: a) seleção dentro de cada local (seleção específica) e b) seleção num dado ambiente e verificação do progresso esperado no outro (seleção indireta). Assim foram determinados:

a) seleção dentro de cada local (seleção específica).

$$DS = (\bar{X}_S - \bar{X}_O) \quad (8)$$

$$\hat{GS} = DS . \hat{h}_m^2 \quad (9)$$

$$\hat{GS}(\%) = \frac{\hat{GS}}{\bar{X}_O} \cdot 100 \quad (10)$$

DS : diferencial de seleção;

$\bar{X}_S$: média dos genótipos selecionados;

$\bar{X}_O$: média original da população;

$\hat{h}_m^2$: herdabilidade ao nível de média;

$\hat{GS}$: ganho de seleção;

$\hat{GS}(\%)$: ganho de seleção expresso em porcentagem;

b) seleção num dado ambiente e verificação do progresso esperado no outro

$$DS_{x,y} = (\bar{X}_{Sx,y} - \bar{X}_{Ox}) \quad (11)$$

$$\hat{GS}_{x,y} = DS_{x,y} \cdot \hat{h}_{mx}^2 \quad (12)$$

$$\hat{GS}_{x,y}(\%) = \frac{\hat{GS}_{x,y}}{\bar{X}_{Ox}} \cdot 100 \quad (13)$$

em que o índice x,y significa seleção dos melhores indivíduos do ambiente y e o uso dos dados fenotípicos dos respectivos indivíduos no ambiente x.

Os intervalos de confiança (IC) dos componentes de variância foram calculados segundo Burdick; Graybill (1992), com nível de probabilidade de 0,95:

$$IC(\hat{\sigma}^2)_{0,95} = n_t \hat{\sigma}_i^2 / \chi_{n_t;0,975}^2 \leq \hat{\sigma}_i^2 \leq n_t \hat{\sigma}_i^2 / \chi_{n_t;0,025}^2 \quad (14)$$

Sendo n_t o número de graus de liberdade associados à estimativa do componente de variância, calculados segundo Satterthwaite (1946), $\hat{\sigma}_i^2$ a estimativa do componente de variância e $\chi_{n_t;0,975}^2$ e

$\chi^2_{n_i;0,025}$ referem-se aos valores tabelados de χ^2 com n_i graus de liberdade a 0,975 e 0,025 de probabilidade, respectivamente.

As precisões das estimativas dos coeficientes de herdabilidade com base nas médias foram obtidas utilizando o intervalo de confiança de 0,95 de probabilidade, com proposto por Knapp, Stroup, Ross (1985).

$$IC(h_x^2)_{0,95} = \left[1 - \frac{1}{(QMT/QMR)F_{0,975;GL_T;GL_R}} \leq h_x^2 \leq 1 - \frac{1}{(QMT/QMR)F_{0,025;GL_T;GL_R}} \right] \quad (15)$$

em que: $F_{0,975;GL_T;GL_R}$ e $F_{0,025;GL_T;GL_R}$ referem-se aos valores tabelados de F a 0,975 e 0,025 de probabilidade, respectivamente, com graus de liberdade de tratamento (genótipo) (GL_T) e graus de liberdade do resíduo (GL_R).

As estimativas das variâncias genética, fenotípicas da interação genótipo x locais e coeficientes de herdabilidade foram comparadas com base nos intervalos de confiança.

3.6 Análises moleculares

3.6.1 Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA genômico dos 182 indivíduos (180 indivíduos F_1 e dois genitores) foi extraído utilizando o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Murray e Thompson (1980), com modificações. Folhas jovens e frescas foram lavadas individualmente com água destilada e secas com papel absorvente, antes de iniciar o processo de extração. Foram utilizadas, aproximadamente, 250 mg de tecido fresco vegetal. A quantificação foi realizada após eletroforese de alíquotas de DNA (3 Volts/cm) em géis de agarose a 1% (p/v), comparando a fluorescência de cada amostra com aquela de uma série de concentrações conhecidas (50, 100, 150 e 200 ng) de DNA do fago Lambda (Invitrogen - BRL).

3.6.2 Marcadores microssatélites (SSR)

Foram utilizados *primers* desenhados a partir de sequências oriundas da espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e *primers* desenhados a partir de sequências da própria espécie, ambos desenvolvidos em nosso laboratório por Oliveira (2006) e Penha (2007).

Para a identificação dos *primers*, adotou-se um código no qual os dois primeiros caracteres correspondem às iniciais da espécie para a qual foram desenhados (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* = PE e *Passiflora alata* = PA), seguidos pelo terceiro e quarto caracteres que são algarismos que identificam o par de *primers*, propriamente. Já o código de identificação dos locos SSR mapeados foi composto pelos mesmos quatro caracteres, seguidos do tamanho do fragmento (alelo) em pares de base (pb).

Cada PCR foi otimizada para amplificar o alelo predito pelo sequenciamento da sequência dos locos SSR. O tamanho dos fragmentos foi determinado usando *Ladder* 10 pb (Invitrogen - BRL). Foram utilizados quatro diferentes *mix* de reação para a otimização da PCR, conforme o par de *primers* (Tabela 1). Os reagentes que variaram entre os *mix* foram as concentrações do tampão, de MgCl₂ e dNTP.

Tabela 1- Reagentes e *mix* usados nas reações de amplificação de locos SSR

Reagente	Mix 2	Mix 4	Mix 5	Mix 7
Tampão	1X	2X	1X	1X
Primer F + R*	0,3 µM	0,3 µM	0,3 µM	0,3 µM
DNA	20 ng	20 ng	20 ng	20 ng
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
dNTP	200 µM	200 µM	200 µM	350 µM
Taq Polimerase	0,5 U	0,5 U	0,5 U	0,5 U
Água Mili-Q	9,7 µL	7,7 µL	8,9 µL	7,7 µL

*F e R: *primers forward* e *reverse*, respectivamente.

O polimorfismo dos locos SSR foi avaliado entre os genitores, sendo que uma pequena amostra da população foi incluída nesta análise inicial para confirmar a segregação dos alelos. Em seguida, procedeu-se à genotipagem da população de mapeamento.

3.6.3 Desenvolvimento dos marcadores AFLP

O desenvolvimento de marcadores AFLP envolveu os passos propostos por Vos et al. (1995) com algumas modificações, conforme descritos a seguir.

Restrição. Cerca de 200 ng de DNA foram digeridos pela combinação de duas enzimas. A digestão se deu em um volume final de 20 µl contendo 5 U de *EcoR*-I ou *Pst*-I (Promega), 5 U de *Mse*-I (NEBiolabs), 2 µl de tampão de digestão universal *One Phor All* 10X (Amersham) e 2 µg de BSA (NEBiolabs). A solução de digestão foi incubada em termociclador modelo *Gen Amp® PCR System 9700 thermocycler* (Applied Biosystems) durante 4 h a 37°C para a restrição do DNA e, em seguida, por 20 min. a 65°C para a inativação das enzimas.

Ligação de adaptadores. Adaptadores específicos (Tabela 2) foram ligados às extremidades dos fragmentos de DNA gerados na restrição. Adaptadores de fita dupla foram previamente preparados misturando quantidades equimolares dos dois oligos de fita simples para uma concentração final de 50 µM para adaptadores *Mse*-I e 5 µM para adaptadores *EcoR*-I e *Pst*-I. A solução foi aquecida a uma temperatura de 90°C por 10 min. e deixada resfriar lentamente. A ligação dos adaptadores às extremidades dos fragmentos foi obtida adicionando-se 20 µl de uma solução de ligação [1X de tampão de ligação T4 DNA ligase (NEBiolabs), 1 µM de adaptador *Mse*-I, 0,1 µM de adaptador *EcoR*-I ou *Pst*-I e 1 U de T4 DNA ligase (NEBiolabs)] aos 20 µl da solução de digestão do passo anterior. A ligação foi realizada por 14h a 17°C; os tubos foram incubados em termociclador modelo *Gen Amp® PCR System 9700 thermocycler* (Applied Biosystems).

Pré-amplificação. Para a amplificação dos marcadores AFLP, primeiramente, foi realizada uma pré-amplificação com iniciadores específicos para os acrescidos de uma base seletiva (Tabela 2). A reação foi realizada em um volume final de 20 µl contendo 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Promega), 1X tampão da *Taq* DNA polimerase (Promega), 1,5 µM de $MgCl_2$, 200 µM de dNTPs, 125 nM de cada iniciador E+A e M+C ou P+A e M+G, e 3 µl de DNA digerido e ligado. Este coquetel foi incubado a 94 °C por 2 min., em seguida, foi submetido a 26 ciclos nas seguintes condições: 94 °C por 1 min., 56 °C por 1 min., 72 °C por 1 min., ao final, foi mantido por mais 5 min. a 72 °C para a extensão final das fitas de DNA. Os produtos da reação foram diluídos 10X em água ultrapura esterilizada e armazenados a -20°C.

Amplificação seletiva. Na amplificação seletiva foram utilizadas combinações de *primers* específicos para os adaptadores acrescidos de 3 bases seletivas (N) na extremidade 3' (Tabela 2).

A reação foi realizada em um volume final de 15 µl contendo 1,0 U de Taq DNA polimerase (Promega), 1X tampão da Taq DNA polimerase (Promega), 1,5 µM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 135 nM do iniciador E+ANN ou P+ANN, 165 nM do iniciador M+CNN e 5 µl de DNA pré-amplificado. O coquetel foi incubado a 94 °C por 2 min., em seguida, foi submetido a 12 ciclos nas seguintes condições: 94 °C por 30 seg., 65 °C por 30 seg., 72 °C por 1 min., e a mais 23 ciclos nas seguintes condições: 94 °C por 30 seg., 56 °C por 30 seg., 72 °C por 1 min., ao final, foi mantido por mais 5 min. a 72 °C para a extensão final das fitas de DNA.

Análise em gel de poliacrilamida. Os produtos resultantes da PCR foram misturados a uma solução desnaturante [EDTA (0,5 M, pH 8,0) 10mM, azul de bromofenol 1 mg/ml, xileno cianol 1mg/ml e formamida 98%], aquecidos a 95°C por cinco minutos e separados em gel de poliacrilamida desnaturante [acrilamida/bisacrilamida (19:1) 5%, uréia 7,0 M, tampão TBE 1X] de 0,4 mm de espessura e visualizados por coloração com prata pelo método proposto por Creste et al. (2001). O tamanho dos fragmentos foi determinado usando *Ladder* 100 pb e 25 pb. Os géis foram genotipados sobre transluminador de luz branca e digitalizados em *scanner* modelo Color Page-HR3200 (Genius).

Tabela 2 - Sítios de restrição, seqüências de adaptadores e de iniciadores (*primers*) usados nas análises de AFLP

Enzima	Sítio de restrição	Função do oligonucleotídeo	Seqüência (5' – 3')*
EcoR-I	5' G [▼] AATTC 3' 3' CTTAA [▲] G 5'	Adaptador	5'CTCGTAGACTGCGTACC3' 3'CATCTGACGCATGGTTAA5'
		Iniciador E+N	5' GACTGCGTACCAATTN3'
		Iniciador ENNN	5' GACTGCGTACCAATTCNNN3'
Pst-I	5' CTGCA [▼] G 3' 3' G [▲] ACGTC 5'	Adaptador	5'CTCGTAGACTGCGTACATGCA3' 3'CATCTGACGCATGT5'
		Iniciador P+N	5' GACTGCGTACATGCAGN 3'
		Iniciador PNNN	5' GACTGCGTACATGCAGNNN 3'
Mse-I	5' T [▼] TAA 3' 3' AAT [▲] T 5'	Adaptador	5'GACGATGAGTCCTGAG3' 3'TACTCAGGACTCAT5'
		Iniciador M+N	5' GATGAGTCCTGAGTAAN 3'
		Iniciador MNNN	5' GATGAGTCCTGAGTAANN 3'

▼ e ▲ sítios de corte da enzima;

* N nucleotídeo arbitrário na etapa de pré-amplificação (N) e de amplificação seletiva (NNN).

Diversas combinações de *primers* seletivos (E+ANN/M+CNN e P+ANN/M+CNN) foram avaliadas na etapa de amplificação seletiva. Foram utilizados DNA dos genitores e de um indivíduo da progênie. Para a identificação das combinações selecionadas, adotou-se um código no qual os dois primeiros caracteres correspondem às iniciais das enzimas de restrição (*Eco*RI = E, *Pst*I = P e *Mse*I = M), sendo que o terceiro e o quarto caracteres são algarismos que as identificam de acordo com a variação nas extensões dos iniciadores (Tabela 3).

Tabela 3 - Sequências e códigos atribuídos as 34 combinações de *primers* AFLP usadas na etapa de amplificação seletiva. Em negrito, estão os 3 nucleotídeos seletivos adicionados à extremidade dos iniciadores

(continua)

Códigos	Combinações
EM01	5'-GACTGCGTACCAATTC ACC -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTC -3'
EM02	5'-GACTGCGTACCAATTC ACC -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTG -3'
EM03	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTA -3'
EM04	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTC -3'
EM05	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAG -3'
EM06	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAT -3'
EM07	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CGT -3'
EM08	5'-GACTGCGTACCAATTC AGC -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTC -3'
EM09	5'-GACTGCGTACCAATTC AGC -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTG -3'
EM10	5'-GACTGCGTACCAATTC AAG -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTT -3'
EM11	5'-GACTGCGTACCAATTC AGG -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTC -3'
EM12	5'-GACTGCGTACCAATTC ACA -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAC -3'
EM13	5'-GACTGCGTACCAATTC ACA -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAG -3'
EM14	5'-GACTGCGTACCAATTC ACA -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTC -3'
EM15	5'-GACTGCGTACCAATTC AAA -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CGC -3'
EM16	5'-GACTGCGTACCAATTC AAA -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTA -3'
EM17	5'-GACTGCGTACCAATTC AAC -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAA -3'
EM18	5'-GACTGCGTACCAATTC AAG -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAA -3'
EM19	5'-GACTGCGTACCAATTC AAG -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAC -3'
EM20	5'-GACTGCGTACCAATTC AGA -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAG -3'
EM21	5'-GACTGCGTACCAATTC AGA -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAA -3'
EM22	5'-GACTGCGTACCAATTC ACT -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CGC -3'
EM23	5'-GACTGCGTACCAATTC ACG -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CGC -3'
EM24	5'-GACTGCGTACCAATTC AGG -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTT -3'
EM25	5'-GACTGCGTACCAATTC ACG -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTT -3'
EM26	5'-GACTGCGTACCAATTC AGG -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAG -3'
EM27	5'-GACTGCGTACCAATTC ACA -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAA -3'
EM28	5'-GACTGCGTACCAATTC AGG -3' + 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAA -3'

Tabela 3 - Sequências e códigos atribuídos as 34 combinações de *primers* AFLP usadas na etapa de amplificação seletiva. Em negrito, estão os 3 nucleotídeos seletivos adicionados à extremidade dos iniciadores

(conclusão)

Códigos	Combinações	
PM01	5'-GACTGCGTACATGCAG ACA -3'	+ 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAC -3'
PM02	5'-GACTGCGTACATGCAG ACA -3'	+ 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAG -3'
PM03	5'-GACTGCGTACATGCAG ACC -3'	+ 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAC -3'
PM04	5'-GACTGCGTACATGCAG ACT -3'	+ 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAG -3'
PM05	5'-GACTGCGTACATGCAG AGC -3'	+ 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CGT -3'
PM06	5'-GACTGCGTACATGCAG AAC -3'	+ 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTA -3'
PM07	5'-GACTGCGTACATGCAG ACG -3'	+ 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTG -3'
PM08	5'-GACTGCGTACATGCAG AGC -3'	+ 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTA -3'
PM09	5'-GACTGCGTACATGCAG AGA -3'	+ 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAC -3'
PM10	5'-GACTGCGTACATGCAG AAA -3'	+ 5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAC -3'

Assim, o código de identificação dos locos AFLP foi composto pelos quatro caracteres, seguidos do tamanho do fragmento em pares de base.

3.6.4 Marcadores microssatélites-AFLP

Microssatellite-AFLP (M-AFLP) é um método baseado em amplificações simultâneas de marcadores SSR e AFLP. Utiliza uma combinação aleatória de um *primer* SSR e um *primer* AFLP seletivo para amplificar fragmentos de restrição contendo microssatélites (VAN EIJK et al., 2001). Neste trabalho usou-se a pré-amplificação das reações de PCR de AFLP de acordo com Vos et al. (1995). Amplificações de M-AFLP foram realizadas em 20 µL de reação contendo 1/100 do produto da pré-amplificação. Foram utilizados um *primer* *Eco*RI e *primers* SSR (desenvolvidos para maracujá-doce), 2 µL 1X tampão da Taq DNA polimesase (Promega), 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Promega), 21,5 µM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs (ALBERTINI et al., 2003). O coquetel foi incubado a 94 °C por 2 min., em seguida, foi submetido a 12 ciclos nas seguintes condições: 94 °C por 30 seg., 65 °C por 30 seg., 72 °C por 1 min., e a mais 23 ciclos nas seguintes condições: 94 °C por 30 seg., 56 °C por 30 seg., 72 °C por 1 min., ao final, foi mantido por mais 5 min. a 72 °C para a extensão final das fitas de DNA. A análise do gel de poliacrilamida foi semelhante a descrita para AFLP.

3.7 Genotipagem da população de mapeamento F_1 e construção do mapa de ligação

A construção do mapa foi baseada no padrão de segregação de locos marcadores polimórficos entre os genitores na respectiva progênie F_1 .

No caso dos SSR, é possível identificar até quatro alelos segregando, além de alelos nulos. Também, o número de alelos pode variar entre os locos.

Para o marcador dominante AFLP, podem ser observados três tipos de segregação: a) segregação do tipo ($ao \times oo$), ou seja, informativo por parte do genitor feminino, com segregação 1:1; b) segregação do tipo ($oo \times ao$), ou seja, informativo por parte do genitor masculino, com segregação 1:1; c) segregação do tipo ($ao \times ao$), ou seja, quando loco é heterozigótico em ambos os genitores, com segregação 3:1.

A Tabela 4 apresenta as 18 possíveis configurações genéticas dos locos marcadores, segundo o tipo de cruzamento, alelos observados nos genitores e nas progênies oriundas de cruzamentos não endogâmicos (modificado de WU et al., 2002a e MALIEPAARD, JANSEN e VAN OOIJEN, 1997).

Tabela 4 - Configurações genéticas dos locos marcadores, segundo o tipo de cruzamento, alelos observados nos genitores e nas progênes oriundas de cruzamentos não endogâmicos

Tipo de cruzamento			Genitores		Progênie			
			Cruzamento	Alelos observados	Obs: ¹	Alelos observados	Segregação	Nº de fenótipos moleculares
A	A1	1	ab x cd	ab x cd	A	ac, ad, bc, bd	1:1:1:1	4
	A2	2	ab x ac	ab x ac	A	a, ac, ba, bc	1:1:1:1	4
	A3	3	ab x co	ab x c	A	ac, a, bc, b	1:1:1:1	4
	A4	4	ao x bo	a x b	A	ab, a, b, o	1:1:1:1	4
B	B1	5	ab x ao	ab x a	A	ab, 2a, b	1:2:1	3
	B2	6	ao x ab	a x ab	A	ab, 2a, b	1:2:1	3
	B3	7	ab x ab	ab x ab	S	a, 2ab, b	1:2:1	3
C		8	ao x ao	a x a	S	3a, o	3:1	2
D	D1	9	ab x cc	ab x c	A	ac, bc	1:1	2
		10	ab x aa	ab x a	A	a, ab	1:1	2
		11	ab x oo	ab x o	A	a, b	1:1	2
		12	bo x aa	b x a	A	ab, a	1:1	2
		13	ao x oo	a x o	A	a, o	1:1	2
	D2	14	cc x ab	c x ab	A	ac, bc	1:1	2
		15	aa x ab	a x ab	A	a, ab	1:1	2
		16	oo x ab	o x ab	A	a, b	1:1	2
		17	aa x bo	a x b	A	ab, a	1:1	2
		18	oo x ao	o x a	A	a, o	1:1	2

¹ A - marcador assimétrico e S - marcador simétrico

Após a leitura dos dados moleculares para fim de genotipagem da população de mapeamento, foi usado um teste de aderência do χ^2 para verificar a ocorrência de distorção de segregação mendeliana loco a loco. Para cada teste, foi obtido um valor de P , com base na hipótese H_0 . Como foram feitos múltiplos testes, foi necessário considerar um nível de significância conjunto e, por isso, utilizou-se o critério da “razão de falsas descobertas” (FDR – *False Discovery Rate*), proposto por Storey e Tibshinari (2003).

Para a construção do mapa de ligação, foi usada, inicialmente, a metodologia de Wu et al. (2002a) a qual estima a fração de recombinação e a fase de ligação simultaneamente com base em estimativas de máxima verossimilhança. Esta metodologia permite analisar diferentes tipos de marcadores com padrões de segregação distintos, tais como 1:1:1:1, 1:2:1, 3:1 e 1:1. Estas análises foram implementadas no pacote *R* (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2004), utilizando o *software* livre *OneMap vs.1.0-1* (MARGARIDO et al. 2007). Num primeiro passo, foram feitas análises de dois pontos entre as marcas utilizando o algoritmo EM (*Expectation*

Maximization) (DEMPSTER et al. 1977) baseado na metodologia de Wu et al. (2002a) e, com base nestes resultados, foram designadas as marcas para os diferentes grupos de ligação (GL).

As análises multiponto entre as marcas de cada GL foram feitas utilizando o método HMM (*Hidden Markov Models*) (JIANG et al.1997; WU et al. 2002b) implementados no algoritmo EM (*Expectation Maximization*). Com base nesta metodologia, foi realizada a ordenação das marcas nos respectivos GL usando a função *order.seq*, a qual ordena as marcas no GL com o auxílio de duas outras funções *compare* (compara todas as possíveis ordens dos marcadores em uma sequência) e *try.seq* (tenta inserir marcadores em um determinado grupo de ligação). Nesta etapa, marcas foram escolhidas aleatoriamente e ordenadas. Foram avaliadas 60 possíveis ordens exaustivamente; em seguida, uma nova marca foi escolhida e o novo processo iniciou-se, tal processo foi repetido até que todas as marcas foram posicionadas no *framework* (MOLLINARI et al. 2009). Foi utilizado o algoritmo *RIPPLE* (LANDER et al. 1987) para verificar possíveis erros no ordenamento das marcas, o qual foi usado em todos os mapas previamente construídos. Finalmente, utilizando a função *map*, foram desenhados os GL com estimativa multiponto. Para converter as frequências de recombinação em distâncias de mapa, expressas em centiMorgans, foi utilizada a função de mapeamento de Kosambi (KOSAMBI, 1944).

3.8 Análise dos QTL

As análises dos QTL foram realizadas utilizando-se as médias dos caracteres avaliadas que apresentaram variabilidade genética, ou seja, número de frutos (NF), peso médio de frutos (PF), comprimento médio de frutos (CF), diâmetro médio de frutos (DF), espessura média da casca (EC), peso médio da casca (PC), peso médio da polpa (PP), teor de sólidos solúveis totais (SST) e produção (PR). Foram usados os dados de 100 indivíduos avaliados em dois ambientes, os dados foram utilizados para mapear locos quantitativos por ambiente.

3.8.1 Mapeamento por intervalo composto

Na análise de mapeamento por intervalo composto (CIM), foi utilizado o mapa de ligação integrado dos genitores 2(12) e SV3, construídos via HMM, usando o *software* OneMap (MARGARIDO et al., 2007). As análises foram feitas utilizando o modelo genético estatístico proposto por Gazaffi (2009), modelo este que mapeia locos quantitativos em populações de irmãos-germanos (F_1).

3.8.1.1 Metodologia e modelo estatístico

A partir de uma população de irmãos-germanos, oriundos do cruzamento entre dois genitores P e Q , não aparentados, diplóides e com mapa de ligação conhecido (Figura 3), sendo m e $m+1$ marcadores que flaqueiam um intervalo definido, com alelos 1 ou 2, tem-se quatro arranjos para os genótipos destes locos $P_m^{\{1,2\}}$, $P_{m+1}^{\{1,2\}}$, $Q_m^{\{1,2\}}$ e $Q_{m+1}^{\{1,2\}}$, em que $\{1,2\}$ indicam os possíveis alelos de cada loco. Pressupondo a presença de um QTL neste dado intervalo, cujos alelos são representados por P^1 e P^2 , para o genitor P e Q^1 e Q^2 , para o genitor Q , assume-se que os alelos P^1 e Q^1 tem efeito positivo sobre o fenótipo. Tal cruzamento pode ser representado como a seguir:

$$\begin{array}{c}
 P \qquad \qquad \qquad Q \\
 \begin{array}{c|c|c|c}
 P_m^1 & P_m^2 & Q_m^1 & Q_m^2 \\
 P^1 & P^2 & Q^1 & Q^2 \\
 P_{m+1}^1 & P_{m+1}^2 & Q_{m+1}^1 & Q_{m+1}^2
 \end{array}
 \times
 \begin{array}{c|c}
 Q_m^1 & Q_m^2 \\
 Q^1 & Q^2 \\
 Q_{m+1}^1 & Q_{m+1}^2
 \end{array}
 \end{array}$$

Figura 3 – Cruzamento entre os genitores P e Q , com os quatro arranjos para os genótipos destes locos $P_m^{\{1,2\}}$, $P_{m+1}^{\{1,2\}}$, $Q_m^{\{1,2\}}$ e $Q_{m+1}^{\{1,2\}}$, sendo os alelos dos marcadores m e $m+1$, P^1 , P^2 , Q^1 e Q^2 os alelos dos QTL

As possíveis classes genotípicas para os QTL ($P^1 Q^1$, $P^1 Q^2$, $P^2 Q^1$ e $P^2 Q^2$) com base na segregação esperada é de 1:1:1:1. Assim, é possível definir três contrastes ortogonais entre as médias genotípicas das classes:

$$\begin{aligned} P^1 Q^1 + P^1 Q^2 - P^2 Q^1 - P^2 Q^2 \\ P^1 Q^1 - P^1 Q^2 + P^2 Q^1 - P^2 Q^2 \\ P^1 Q^1 - P^1 Q^2 - P^2 Q^1 + P^2 Q^2 \end{aligned}$$

Os dois primeiros contrastes referem-se aos efeitos aditivos dos QTL nos genitores P e Q , respectivamente, e o terceiro devido à interação devido à dominância dos efeitos aditivos de cada genitor. Nesta metodologia, o genótipo do QTL é inferido com base nos genótipos dos marcadores que os flaqueiam. Assumiu-se que as probabilidades condicionais para os genótipos dos QTL são multiponto e foram obtidas através do mapa de ligação construído via HMM, usando o *software* OneMap (MARGARIDO et al., 2007).

O mapeamento de QTL é dado pelo seguinte modelo estatístico:

$$y_j = Z_j \gamma + \alpha_p^* x_{pj}^* + \alpha_q^* x_{qj}^* + \delta_{pq}^* x_{pj}^* x_{qj}^* + \epsilon_j \quad (16)$$

em que:

y_j é o fenotipo do j -ésimo indivíduo ($j = 1, 2, \dots, n$);

Z_j é a j -ésima linha da matriz indicadora Z , com dimensão $n \times (1+3c)$, que contém uma coluna de 1's e variáveis indicadoras dos genótipos dos c (marcadores moleculares fora da região sendo mapeada), de acordo com os contrastes;

γ é o vetor de parâmetros $(1+3c) \times 1$ contendo o intercepto (μ) e coeficientes de regressão linear múltipla (α_p , α_q e δ_{pq}) para os cofatores;

α_p^* e α_q^* são os efeitos aditivos para o QTL nos genitores P e Q , respectivamente;

δ_{pq}^* é o efeito da interação devido a dominância entre os efeitos aditivos;

ϵ_j é o erro com $\sim N(0, \sigma^2)$.

Na análise o genitor P refere-se a 2(12) e o genitor Q refere-se a SV3. Os valores que x_{pj}^* e x_{qj}^* podem assumir são:

$$x_{pj}^* \begin{cases} 1 \text{ se } P^1 Q^1 \\ 1 \text{ se } P^1 Q^2 \\ -1 \text{ se } P^2 Q^1 \\ -1 \text{ se } P^1 Q^2 \end{cases}; x_{qj}^* \begin{cases} 1 \text{ se } P^1 Q^1 \\ -1 \text{ se } P^1 Q^2 \\ 1 \text{ se } P^2 Q^1 \\ -1 \text{ se } P^1 Q^2 \end{cases}$$

A presença de QTL foi testada ao longo do genoma, com a utilização do teste da razão de verossimilhança (LRT), com três graus de liberdade.

A função de verossimilhança para o modelo em (X) é dada por:

$$L(\theta, \gamma, \sigma) = \prod_{j=1}^n \left[\sum_{k=1}^2 \sum_{l=1}^2 p_{klj} \phi \left(\frac{y_j - \mu_{klj}}{\sigma} \right) \right] \quad (17)$$

em que:

θ é o vetor de parâmetros para os QTL (α_p^* , α_q^* e δ_{pq}^*);

p_{klj} é a probabilidade *a priori* do QTL apresentar o genótipo $P^k Q^l$ para o j -ésimo indivíduo;

$\phi(\cdot)$ é a função densidade de probabilidades da distribuição normal padrão; $\mu_{11j} = Z_j \gamma + \alpha_p^* + \alpha_q^* + \delta_{pq}^*$; $\mu_{12j} = Z_j \gamma + \alpha_p^* - \alpha_q^* - \delta_{pq}^*$; $\mu_{21j} = Z_j \gamma - \alpha_p^* + \alpha_q^* - \delta_{pq}^*$; $\mu_{22j} = Z_j \gamma - \alpha_p^* - \alpha_q^* + \delta_{pq}^*$.

Para a obtenção das estimativas de máxima verossimilhança foi utilizado o algoritmo *EM* (DEMPSTER; LAIRD; RUBIN, 1977).

O procedimento de busca por QTL é realizado através da comparação da verossimilhança dos modelos, considerando presença de possível QTL (H_a) versus modelo sem QTL (H_0):

$$H_0: \alpha_p^* = \alpha_q^* = \delta_{pq}^* = 0$$

H_a : pelo menos um efeito diferente de zero

Após a localização dos QTL, hipóteses adicionais foram consideradas para inferir a segregação do QTL detectado.

Inicialmente, verificou-se a significância dos efeitos α_p^* , α_q^* e δ_{pq}^* através das hipóteses, $H_{01}: \alpha_p^* = 0$, $H_{02}: \alpha_q^* = 0$ e $H_{03}: \delta_{pq}^* = 0$, respectivamente. Para as situações que houve mais de um efeito significativo, foram testadas hipóteses para verificar a igualdade das estimativas (considerando seu sinal): $H_{04}: \alpha_p^* = \alpha_q^*$ (ou $\alpha_p^* = -\alpha_q^*$, ou $-\alpha_p^* = \alpha_q^*$, ou $-\alpha_p^* = -\alpha_q^*$),

$H_{05}: \alpha_p^* = \delta_{pq}^*$ (ou $\alpha_p^* = -\delta_{pq}^*$, ou $-\alpha_p^* = \delta_{pq}^*$, ou $-\alpha_p^* = -\delta_{pq}^*$) e $H_{06}: \alpha_q^* = \delta_{pq}^*$ (ou $\alpha_q^* = -\delta_{pq}^*$, ou $-\alpha_q^* = \delta_{pq}^*$, ou $-\alpha_q^* = -\delta_{pq}^*$). A segregação dos QTL foi inferida a partir da interpretação dos testes realizados, e a fase de ligação dos mesmos com os marcadores é identificada com a interpretação dos sinais de α_p^* e α_q^* .

Para a seleção de cofatores foram empregados, métodos de regressão múltipla entre fenótipos e marcadores, com a seleção de modelos utilizando o critério de informação bayesiano, ou BIC (SCHWARZ, 1978), até a seleção do modelo final com no máximo $2\sqrt{n}$ parâmetros para evitar super-parametrizações (SAKAMOTO; KITAGAWA; ISHIGURO, 1986; WANG; BASTEN; ZENG, 2007). A proporção da variância fenotípica (R^2) que é explicada pelos QTL mapeados (individualmente e simultaneamente. A realização das análises foi desenvolvida num *software* usando ambiente de programação R (*R Development Core Team*, 2008), que deve ser disponibilizada em breve (GARCIA, A.A.F., Comunicação pessoal).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises fenotípicas

4.1.1 Análises de variância individuais

Os resultados das análises de variância individuais são apresentados nas Tabelas 5 e 6. Com exceção do caráter NF, os demais apresentaram distribuição normal, de acordo com o teste de *Shapiro-Wilk*, em nível de 5% de significância. Verificaram-se, pelo teste F, valores significativos para genótipos ($p < 0,01$), nos dois ambientes. Portanto, há variabilidade suficiente para ser explorada em processos de seleção com vistas ao melhoramento genético. De certa forma isto era esperado por se tratar de uma população F_1 segregante.

Os efeitos de repetição nas análises individuais foram significativos apenas para alguns caracteres: PP, SST, NF e PR, na E.E. do Anhembi e CF, SST, NF e PR, em Descalvado. Para o efeito blocos dentro de repetição, nas análises individuais, apenas PP foi significativo na E.E. do Anhembi. Estes resultados indicam que, para os caracteres mencionados, o delineamento experimental látice foi eficiente no isolamento de fontes de variação que pudessem comprometer a precisão experimental. Moraes et al. (2005), conduzindo uma população F_1 segregante de maracujá-amarelo, encontraram efeitos significativos para repetição e blocos dentro de repetição para as variáveis PR e NF.

Os caracteres DF, CF, EC e SST apresentaram baixos coeficientes de variação experimental nas análises individuais. Estes coeficientes variaram de 2,86 % para SST a 6,54% para CF, na E.E. do Anhembi e de 3,70 % para SST a 5,89% para DF, em Descalvado. Já os caracteres PF, PC, PP, NF e PR apresentaram coeficientes de variação moderados, que oscilaram de 17,12 % para PF a 21,86% para PR, na E.E. do Anhembi e de 12,42 % para PR a 21,74% para PP, em Descalvado (Tabelas 5 e 6).

Negreiros et al. (2008), trabalhando com 39 progênies de meios irmãos de maracujá-amarelo, encontraram coeficientes de variação similares para os caracteres CF (5,62%), DF (4,75%), PP (22,66%), SST (5,19%) e PC (13,20%). De forma semelhante, Moraes et al. (2005) obtiveram coeficientes de variação baixos para SST (3,8%), CF (5,4%) e DF (4,9%) e coeficientes de variação moderados para PF (17,1%), PP (11,7%), NF (11,8%) e PR (23,8%),

dados estes relativos ao plantio de um população F_1 segregante de maracujá-amarelo, também cultivada na E.E. do Anhembi em 2002.

Tabela 5 - Resumo das análises de variância para caracteres avaliados na Estação Experimental do Anhembi em uma população F₁ de maracujá-doce

Fonte de Variação		QM									
		GL	DF	CF	PF	EC	PC	PP	SST	NF	PR
Repetição		1	37,54	218,61	2692,18	0,05	181,95	1473,94**	2,58*	42838,55**	2330,27**
Bloco/Rep		18	15,97	56,60	1206,06	0,73	733,60	137,98*	0,51	2829,83	153,11
Genótipo (G)		98	42,80**	139,98**	3190,59**	1,35**	2345,41**	165,11**	1,91**	7983,31**	462,12**
Erro Intrabloco		77	16,45	55,56	1082,19	0,43	730,50	76,23	0,30	1755,32	88,97
CV%			5,71	6,54	17,12	6,37	18,06	20,58	2,86	18,78	21,86
$\bar{X}$			70,97	113,90	192,07	10,29	149,65	42,42	19,15	223,00	43,14

(DF) diâmetro médio de frutos; (CF) comprimento médio de frutos; (PF) peso médio de frutos; (EC) espessura média da casca; (PC) peso médio da casca; (PP) peso médio de polpa; (SST) teor de sólidos solúveis totais; (NF) número de frutos por planta e (PR) produção

*, ** Significativo a 5 e 1% de probabilidade

Tabela 6 - Resumo das análises de variância para caracteres avaliados em Descalvado em uma população F₁ de maracujá-doce

Fonte de Variação	QM									
	GL	DF	CF	PF	EC	PC	PP	SST	NF	PR
Repetição	1	25,35	284,67*	1368,73	0,04	735,96	240,07	2,95*	18891,69**	302,93**
Bloco/Rep	18	18,45	56,07	827,98	0,24	455,70	121,08	0,58	1656,88	21,29
Genótipo (G)	99	38,65**	135,78**	3595,96**	1,12**	2503,23**	240,27**	2,26**	4950,53**	256,24**
Erro Intrabloco	75	17,55	41,46	775,34	0,29	480,05	86,00	0,47	1311,47	29,42
CV%		5,89	5,64	14,55	5,54	14,80	21,74	3,70	15,62	12,42
$\bar{X}$		71,16	114,07	191,38	9,72	148,02	42,65	18,47	231,76	43,67

(DF) diâmetro médio de frutos; (CF) comprimento médio de frutos; (PF) peso médio de frutos; (EC) espessura média da casca; (PC) peso médio da casca; (PP) peso médio de polpa; (SST) teor de sólidos solúveis totais; (NF) número de frutos por planta; e (PR) produção

*, **, *** Significativo a 5 e 1% de probabilidade

Foi comparada a eficiência do delineamento experimental adotado em relação ao delineamento em blocos casualizados. Para que isso pudesse ser feito, foi desconsiderada a estrutura de blocos dentro de repetições do delineamento látice, e procedeu-se a análise estatística como blocos casualizados.

Conforme apresentado na Tabela 7, o controle intrabloco não foi eficiente em cinco caracteres DF e CF, na E. E. do Anhembi e PF, EC e PC, em Descalvado. Para os demais caracteres, o látice apresentou eficiência superior variando de 2% para PF e 307% para PR e 4% para SST e 593% para PR, na E. E.do Anhembi e em Descalvado, respectivamente. Esses resultados indicam que houve uma eficiência de moderada a alta para o efeito do controle intrabloco.

Os caracteres NF e PR apresentaram eficiência do látice superior a 272% e 307%, na E. E. do Anhembi e de 275% e 593%, em Descalvado. Estes valores são superiores aos encontrados por Moraes (2005) que encontrou superioridade do látice para NF e PR de 8% e 11,8%, respectivamente. Santos et al. (2001), trabalhando com 23 populações segregantes de arroz, encontraram valores de eficiência do látice de 255% para o caráter altura de planta e 381% para o caráter produtividade de grãos em um ambiente.

Esses resultados mostram a importância de se adotar tal delineamento, mesmo em se tratando de uma única população com muitos tratamentos (genótipos) e área experimental heterogênea.

Tabela 7 – Eficiência relativa do látice para os caracteres diâmetro médio de frutos (DF), comprimento médio de frutos (CF), peso médio de frutos (PF), espessura média da casca (EC), peso médio da casca (PC), peso médio de polpa(PP), teor de sólidos solúveis totais (SST), número de frutos por planta(NF) e produção (PR). A primeira linha refere-se à Estação Experimental do Anhembi, SP e a segunda a Descalvado, SP

Caracteres	DF	CF	PF	EC	PC	PP	SST	NF	PR
Eficiência do Látice	0,99	0,79	1,02	1,09	1,00	1,15	1,13	2,72	3,07
	1,00	1,34	0,97	0,96	0,99	1,07	1,04	2,75	5,93

4.1.2 Análise de variância conjunta

Os resultados das análises de variância conjunta são apresentados na Tabela 8. Verificaram-se pelo teste F, valores significativos para genótipos ($p < 0,01$) para todos os caracteres. Observaram-se, também, valores significativos entre ambientes para EC e SST ($p < 0,01$). Os efeitos significativos de genótipos evidenciam a variabilidade existente nesta população, passível de ser explorada em programas de melhoramento de maracujá-doce. Os coeficientes de variação experimental apresentaram valores de baixos a moderados, com o maior valor observado para PP igual a 21,67%.

Observou-se, na análise de variância conjunta, que existem diferenças significativas entre os dois locais estudados para os caracteres EC e SST. Outro fato observado foi a interação genótipo $\times$ locais (G $\times$ L), para a qual se detectaram efeitos significativos para sete dos nove caracteres avaliados em relação ao efeito ambiental. Os dados relativos ao caráter EC foram significativos a 5% ($p < 0,05$) e para PF, PC, PP, SST, NF e PR foram significativos a 1% ($p < 0,01$).

A respeito da interação significativa para locais de plantio, pode-se inferir que os genótipos avaliados apresentam desempenho diferenciado, dependendo do ambiente em que são cultivados. Exceções foram observadas para as variáveis CF e DF, indicando que estes caracteres são pouco influenciados pelo local.

Viana et al. (2006), trabalhando com populações de maracujá-amarelo de diferentes procedências, encontraram valores semelhantes e significativos ($p < 0,01$) entre ambientes para SST e interação G $\times$ L significativa apenas para NF, DF e PF. Detecção de significância estatística na interação G $\times$ L indica comportamento diferente dos caracteres nos dois locais. Isto sugere que se deve atentar para a recomendação de genótipos específicos para cada local. Um detalhamento da magnitude desta interação se faz necessário, pois estes valores servirão de subsídios ao melhorista para a escolha dos genótipos que apresentem adaptação ampla ou restrita.

A análise conjunta de experimentos é de grande interesse para os melhoristas de plantas, pois, segundo Ramalho (1977), as estimativas de parâmetros genéticos baseadas em experimentos conduzidos em um único ambiente são superestimadas. Além do componente genético isto ocorre devido à existência do componente da interação genótipo $\times$ local envolvido nestas estimativas. Segundo Gardner, citado por Ramalho (1977), em certos casos, o erro das estimativas obtidas

com base em apenas um ambiente é de quase 50%, mostrando que as estimativas baseadas em experimentos conduzidos em dois ou mais ambientes são mais realistas.

Tabela 8 - Resumo das análises de variância conjunta para caracteres avaliados em uma população F₁ de maracujá-doce

Fonte de Variação	QM									
	GL	DF	CF	PF	EC	PC	PP	SST	NF	PR
Repetição/Locais	2	31,45	251,64**	2030,46	0,05	458,96	857,01**	2,77**	30865,12**	1316,60**
Locais(L)	1	3,22	1,14	442,04	38,88**	459,92	84,62	58,46**	6057,68	40,48
Genótipo (G)	99	70,48**	254,38**	6291,46**	2,22**	4606,14**	354,34**	3,98**	10752,72**	584,26**
G x L	99	20,56	52,12	1714,16**	0,48*	1101,9**	135,26**	0,82**	4158,92**	258,02**
Erro efetivo médio	152	17,03	49,67	945,44	0,37	604,91	86,43	0,40	1622,23	62,02
CV%		5,80	6,17	15,88	6,04	16,37	21,67	3,35	17,74	18,13
$\bar{X}$		71,16	114,18	193,60	10,06	150,21	42,90	18,86	226,92	43,44

(DF) diâmetro médio de frutos; (CF) comprimento médio de frutos; (PF) peso médio de frutos; (EC) espessura média da casca; (PC) peso médio da casca; (PP) peso médio de polpa; (SST) teor de sólidos solúveis totais; (NF) número de frutos por planta e (PR) produção.
 *, ** Significativo a 5 e 1% de probabilidade.

4.1.3 Estimativas das variâncias genéticas, fenotípicas e ambientais em cada local e da interação genótipo x local na análise conjunta

As estimativas das variâncias genéticas, fenotípicas e da variância ambiental, bem como dos respectivos coeficientes de herdabilidade e de variação genotípica das análises individuais estão apresentadas nas Tabelas 9 e 10. Observa-se que os valores de $\hat{\sigma}^2$, que representa a variância ambiental, foram expressivos para os caracteres NF (1311,47 e 1755,32), PF (775,34 e 1082,19) e PC (480,06 e 730,50), intermediários para PR (29,43 e 88,98), CF (41,46 e 55,56) e PP (86,01 e 76,23) e baixos para DF (17,55 e 16,45), EC (0,29 e 0,43) e SST (0,46 e 0,30), para os locais E.E. do Anhembi e Descalvado, respectivamente.

Viana et al. (2004), trabalhando com maracujá-amarelo plantado em dois locais, encontraram estimativas de variância ambiental expressivas para PF (737,89) e moderadas para CF (30,74) e DF (20,18).

As estimativas de variância genética ($\hat{\sigma}_g^2$) e da variância fenotípica ($\hat{\sigma}_f^2$) (Tabelas 9 e 10) foram expressivas para os caracteres NF, PF e PC, intermediárias para PR, CF e PP e baixas para DF, EC e SST. Moraes et al. (2005) estudando uma população F_1 segregante de maracujá-amarelo, em que um dos genitores era inferior ao outro, agronomicamente, observaram estimativas de variância genética expressivas para PF (163,00) e estimativas moderadas para PR (26,8) e PP (12,16). Foram observadas também as estimativas dos componentes de variância genética, fenotípica, ambiental e da interação genótipo x local na análise conjunta (Tabela 11). Estas foram expressivas para os caracteres NF, PF e PC, intermediárias para PR, CF e PP e baixas para DF, EC e SST, comportando-se de forma similar ao encontrado nas análises individuais.

Viana et al. (2004) observaram estimativas de variância genética expressivas apenas para PF (518,60), em populações segregantes de maracujá-amarelo. A variabilidade apresentada pelas espécies de maracujás exploradas comercialmente independe do número de famílias estudadas, no entanto, existem características que apresentam maior variabilidade, tendendo a ser proporcional quando os materiais são divergentes ou pouco estudados.

Tabela 9 - Estimativa da variância genética ($\hat{\sigma}_g^2$), variância fenotípica ($\hat{\sigma}_f^2$), variância ambiental ($\hat{\sigma}^2$), coeficiente de herdabilidade ($\hat{h}_m^2$) e coeficiente de variação genética ($CV_g\%$) para os caracteres avaliados em uma população F₁ de maracujá-doce, em Descalvado, SP

Caráter	$\hat{\sigma}_g^2$	$\hat{\sigma}_f^2$	$\hat{\sigma}^2$	$\hat{h}_m^2$	$CV_g\%$
PR	113,41 (86,99-166,54)	128,13 (98,28-188,15)	29,43 (22,57-43,22)	0,88 (0,82-0,92)	24,38
NF	1819,53 (1470,02-3525,67)	2475,27 (1999,81-4796,28)	1311,47 (1059,56-2541,22)	0,73 (0,59-0,83)	18,40
DF	10,55 (5,69-16,85)	19,32 (10,44-30,89)	17,55 (9,48-28,06)	0,54 (0,30-0,70)	4,56
CF	47,15 (29,34-66,09)	67,89 (42,24-95,15)	41,46 (25,80-58,11)	0,69 (0,53-0,80)	6,02
PF	1410,31 (1233,86-2347,47)	1797,98 (1573,02-2992,74)	775,34 (678,33-1290,55)	0,78 (0,67-0,86)	19,62
EC	0,42 (0,25-0,52)	0,56 (0,34-0,70)	0,29 (0,17-0,36)	0,74 (0,60-0,83)	6,65
PC	1011,59 (670,44-1317,04)	1251,62 (829,52-1629,55)	480,06 (318,17-625,01)	0,81 (0,70-0,87)	21,49
PP	77,13 (50,53-130,12)	120,13 (78,70-202,67)	86,01 (56,35-145,10)	0,64 (0,45-0,76)	20,59
SST	0,89 (0,73-1,60)	1,13 (0,92-2,01)	0,46 (0,38-0,83)	0,79 (0,68-0,86)	5,13

(DF) diâmetro médio de frutos; (CF) comprimento médio de frutos; (PF) peso médio de frutos; (EC) espessura média da casca; (PC) peso médio da casca; (PP) peso médio de polpa; (SST) teor de sólidos solúveis totais; (NF) número de frutos por planta e (PR) produção.

Tabela 10 - Estimativa da variância genética ($\hat{\sigma}_g^2$), variância fenotípica ($\hat{\sigma}_f^2$), variância ambiental ($\hat{\sigma}^2$), coeficiente de herdabilidade ($\hat{h}_m^2$) e coeficiente de variação genética ($CV_g\%$) para os caracteres avaliados em uma população F₁ de maracujá-doce na Estação Experimental do Anhembi, SP

Caráter	$\hat{\sigma}_g^2$	$\hat{\sigma}_f^2$	$\hat{\sigma}^2$	$\hat{h}_m^2$	$CV_g\%$
PR	186,57 (121,32-237,57)	231,06 (150,25-294,22)	88,98 (57,86-113,30)	0,81 (0,70-0,87)	31,66
NF	3113,99 (2303,61-4934,57)	3991,65 (2952,87-6325,34)	1755,32 (1298,52-2781,55)	0,78 (0,66-0,85)	25,02
DF	13,18 (7,13-17,55)	21,40 (11,58-28,51)	16,45 (8,90-21,91)	0,61 (0,41-0,75)	5,11
CF	42,21 (36,25-127,69)	69,99 (60,11-211,73)	55,56 (47,72-168,08)	0,60 (0,39-0,74)	5,70
PF	1054,20 (782,65-2089,34)	1595,29 (1184,36-3161,74)	1082,19 (803,42-2144,81)	0,66 (0,48-0,78)	16,90
EC	0,46 (0,26-0,58)	0,67 (0,38-0,85)	0,43 (0,24-0,54)	0,68 (0,51-0,79)	6,59
PC	807,45 (478,50-1067,35)	1172,70 (694,96-1550,16)	730,50 (432,90-965,62)	0,69 (0,52-0,79)	18,99
PP	44,44 (22,56-65,68)	82,55 (41,91-122,02)	76,23 (38,70-112,68)	0,54 (0,29-0,70)	15,71
SST	0,80 (0,62-1,26)	0,95 (0,74-1,49)	0,30 (0,23-0,47)	0,84 (0,76-0,89)	4,67

(DF) diâmetro médio de frutos; (CF) comprimento médio de frutos; (PF) peso médio de frutos; (EC) espessura média da casca; (PC) peso médio da casca; (PP) peso médio de polpa; (SST) teor de sólidos solúveis totais; (NF) número de frutos por planta e (PR) produção.

Tabela 11 - Estimativa da variância genética ($\hat{\sigma}_g^2$), variância da interação genótipo x local ($\hat{\sigma}_{gl}^2$), variância fenotípica ($\hat{\sigma}_f^2$), variância ambiental ($\hat{\sigma}^2$), para os caracteres avaliados em uma população F₁ de maracujá-doce com as estimativas da análise conjunta

Caráter	$\hat{\sigma}_g^2$	$\hat{\sigma}_{gl}^2$	$\hat{\sigma}_f^2$	$\hat{\sigma}^2$
PR	130,56 (105,97-205,04)	49,00 (39,77-76,95)	146,07 (118,55-229,39)	62,02 (50,34-97,40)
NF	2282,62 (1511,33-2823,31)	634,17 (419,89-784,39)	2688,18 (1779,85-3324,93)	1622,23 (1074,08-2006,49)
DF	13,36 (10,23-20,06)	0,88 (0,67-1,32)	17,62 (13,48-26,45)	17,03 (13,03-25,56)
CF	51,18 (34,79-68,65)	0,61 (0,42-0,82)	63,60 (43,23-85,30)	49,67 (33,77-66,62)
PF	1336,51 (887,27-1658,19)	192,18 (127,58-238,44)	1572,87 (1044,19-1951,44)	945,44 (627,65-1173,00)
EC	0,46 (0,36-0,73)	0,03 (0,02-0,04)	0,56 (0,43-0,88)	0,37 (0,29-0,59)
PC	1000,31 (723,55-1371,01)	124,25 (89,87-170,29)	1151,54 (832,94-1578,28)	604,91 (437,55-829,08)
PP	66,98 (50,29-99,05)	12,21 (9,17-18,05)	88,59 (66,52-131,01)	86,43 (64,90-127,82)
SST	0,90 (0,74-1,45)	0,11 (0,09-0,17)	1,00 (0,83-1,61)	0,40 (0,33-0,65)

(DF) diâmetro médio de frutos; (CF) comprimento médio de frutos; (PF) peso médio de frutos; (EC) espessura média da casca; (PC) peso médio da casca; (PP) peso médio de polpa; (SST) teor de sólidos solúveis totais; (NF) número de frutos por planta e (PR) produção.

Tabela 12 - Estimativa do coeficiente de herdabilidade ($\hat{h}_m^2$) e coeficiente de variação genética ($CV_g\%$), razão entre coeficiente de variação genética e coeficiente de variação experimental (CV_g/CV_e) para os caracteres avaliados em uma população F_1 de maracujá-doce com as estimativas da análise conjunta

Caráter	$\hat{h}_m^2$	$CV_g\%$	CV_g/CV_e
PR	0,89 (0,85-0,93)	26,30	1,45
NF	0,85 (0,78-0,89)	21,05	1,49
DF	0,76 (0,66-0,83)	5,14	0,88
CF	0,80 (0,72-0,86)	6,26	1,01
PF	0,85 (0,79-0,89)	18,88	1,19
EC	0,83 (0,76-0,88)	6,76	1,12
PC	0,87 (0,81-0,91)	21,05	1,28
PP	0,75 (0,65-0,83)	19,08	0,88
SST	0,90 (0,86-0,93)	5,02	1,49

(DF) diâmetro médio de frutos; (CF) comprimento médio de frutos; (PF) peso médio de frutos; (EC) espessura média da casca; (PC) peso médio da casca; (PP) peso médio de polpa; (SST) teor de sólidos solúveis totais; (NF) número de frutos por planta e (PR) produção.

Os caracteres CF, PF, EC, PC, SST, NF, e PR apresentaram os maiores coeficientes de herdabilidade, com valores superiores a 0,60 nas análises individuais (Tabela 9 e 10). Apenas as variáveis DF e PP tiveram um comportamento diferente tendo seus coeficientes de herdabilidade inferiores a 0,60 em pelo menos um local, com intervalo de confiança de 0,30 a 0,70 (Tabelas 9 e 10). Moraes et al. (2005) estimaram coeficientes de herdabilidade para características de produção e qualidade de frutos em maracujá-amarelo e observaram valores medianos de 0,52 e 0,56 para DF e PF respectivamente e valores superiores a 0,79 para NF, PR, CF, PP e SST em plantios realizados na E. E. do Anhembi, SP.

Os coeficientes de herdabilidade da análise conjunta foram superiores a 0,75, apresentando valores de médio a alto, como observado para SST (0,90). Segundo Vencovsky (1987), o coeficiente de herdabilidade é um parâmetro que informa a confiabilidade com que o valor fenotípico representa o valor genotípico, ou seja, a acurácia. As estimativas do coeficiente de variação genética em cada local e a análise conjunta referente encontram-se nas Tabelas 9, 10 e 12. A relação entre o coeficiente de variação genética e o coeficiente de variação experimental foi estimada na análise conjunta, observando-se valores iguais ou superiores à unidade em todos os caracteres exceto PP e DF. Quando esta relação é igual ou superior a 1,0 em ensaios de progênies, isto é indicativo da viabilidade de se praticar seleção com consequentes ganhos genéticos nestas características (VENCOVSKY, 1987). Logo, espera-se ganhos genéticos em todas os caracteres avaliados exceto para PP e DF.

4.1.4 Estimativas dos coeficientes de correlação genética e fenotípica

Na Tabela 13 são apresentadas as estimativas de correlações fenotípicas e genotípicas da análise conjunta entre os caracteres mensurados. Observa-se que PR com NF apresentaram-se correlacionados fenotípica e geneticamente ($r = 0,68$ e $0,61$). Esta associação era esperada, uma vez que a PR foi estimada pelo produto entre NF e PF. Estes valores são inferiores aos encontrados para maracujá-amarelo, onde observou-se estimativas de correlação entre PR e NF superiores a 0,88 estimados em um ambiente (MORAES et al., 2005 e NUNES, 2006).

O PF apresentou valores de correlação altos e positivos com DF, CF, EC e PC, ($r = 0,90$, $0,80$, $0,70$ e $0,98$, respectivamente). Assim, se a prática seletiva for baseada em PF, esperam-se ganhos positivos nos caracteres com as quais apresentou alta associação linear.

O CF apresentou correlação alta e positiva com DF ($r = 0,69$) e com PC ($r = 0,72$), indicando ganhos positivos quando a seleção for praticada com base na CF. Este resultado é de suma importância, uma vez que a mensuração do comprimento do fruto é de alta praticidade e de baixo custo, tornando o processo de seleção dinâmico e barato. Além disso, frutos mais compridos apresentam, em geral, aspecto oval e sem pescoço, que são preferidos pelo mercado e facilitam o processo de embalagem para o mercado consumidor. Em maracujá-amarelo observa-

se que as correlações entre os caracteres PF, CF, DF, EC e PC são altas e positivas (MORAES et al. 2005; NUNES, 2006; SILVA et al. 2009).

Estimativa de correlação em sentido e magnitude indesejáveis foi obtida entre DF e PC ($r = 0,88$), uma vez que se objetiva no melhoramento do maracujazeiro frutos de elevado DF e de baixo PC.

Correlações negativas foram obtidas entre SST e os demais caracteres, ou seja, praticando-se seleção para ganho em SST não se obtêm ganhos para os demais caracteres, o que é um indicativo para se utilizar índices de seleção para obtenção de ganhos simultâneos para os demais caracteres. Correlações negativas entre SST e os demais caracteres de qualidade de fruto e produção têm sido relatados em diversos trabalhos com maracujá-amarelo (VIANA et al. 2003b; MORAES et al.; 2005, NUNES, 2006).

Tabela 13 - Estimativas dos coeficientes de correlações fenotípicas (acima da diagonal principal) e correlações genéticas (abaixo da diagonal principal) para diversos caracteres avaliados em maracujá-doce

	DF	CF	PF	EC	PC	PP	SST	NF	PR
DF		0,69	0,89	0,60	0,88	0,50	-0,12	-0,09	0,58
CF	0,66		0,81	0,45	0,79	0,54	-0,23	-0,03	0,56
PF	0,90	0,80		0,70	0,98	0,56	-0,13	-0,13	0,61
EC	0,63	0,48	0,75		0,74	0,12	-0,01	-0,21	0,34
PC	0,89	0,77	0,98	0,78		0,41	-0,10	-0,15	0,59
PP	0,49	0,52	0,54	0,08	0,38		-0,25	0,00	0,41
SST	-0,11	-0,26	-0,16	-0,00	-0,12	-0,27		-0,02	-0,11
NF	-0,15	-0,04	-0,20	-0,38	-0,23	0,02	-0,06		0,68
PR	0,62	0,61	0,65	0,31	0,61	0,44	-0,18	0,61	

(DF) diâmetro médio de frutos; (CF) comprimento médio de frutos; (PF) peso médio de frutos; (EC) espessura média da casca; (PC) peso médio da casca; (PP) peso médio de polpa; (SST) teor de sólidos solúveis totais; (NF) número de frutos por planta e (PR) produção.

4.1.5 Resposta esperada com a seleção

As respostas esperadas com a seleção foram obtidas conforme duas situações: a) seleção e resposta no mesmo ambiente, ou seja, seleção direta e b) seleção em um ambiente e resposta em outro, ou seja, seleção indireta. Foi considerada uma taxa de seleção de 30%.

4.1.5.1 Seleção direta e seleção indireta

Os ganhos preditos na seleção direta, com base em cada um dos nove caracteres mensurados estão apresentados na Tabela 14. Observaram-se ganhos para todos os caracteres avaliados. Os ganhos preditos variaram de 5,27% e 4,21%, para o caráter DF, de 35,85% e 31,32%, para o caráter PR na E. E. Anhembi e em Descalvado, respectivamente. Ressalta-se que o caráter PR foi estimado pelo produto entre NF, com ganhos preditos de 30,80% e 18,45%, e PF com ganhos preditos de 19,08% e 22,77% na E. E. Anhembi e em Descalvado, respectivamente.

Este resultado indica que a seleção praticada com base em NF poderá ser mais efetiva do que aquela com base em peso médio de frutos PF, para a resposta PR, visto, que a correlação entre PR e NF é positiva e com magnitude de 0,68 correlação fenotípica e 0,61 correlação genética (Tabela 13). Gonçalves et al. (2007) conduziram 113 progênies de maracujá-amarelo em dois ambientes e observaram ganhos preditos com seleção direta para número de frutos variando de 5% a 18,55%.

Caracteres como PC e EC apresentaram ganhos com a seleção que variaram de 1,76% a 6,13 % para PC e de 19% a 19,04% EC na E. E. Anhembi e em Descalvado respectivamente. Espera-se selecionar indivíduos com menor EC e menor PC. Estes caracteres apresentam correlação fenotípica e genética altas e positivas ($r = 0,74$ e $0,78$) logo, se a seleção for praticada em PC, que apresenta maiores ganhos com a seleção obteremos ganhos simultâneos em EC. No entanto, a seleção com base em PC acarretará em perdas significativas em PF e CF uma vez que esse caráter apresenta correlações altas e positivas superiores a 0,70. Então, para que se possam maximizar os ganhos simultâneos entre estes caracteres é recomendada a utilização de índice de seleção.

Ao selecionar progênies superiores com base em um caráter, mudanças indesejáveis podem ocorrer em outras, em razão da existência de correlações (CRUZ et al., 2004). Cruz (2006) comenta que, na obtenção de materiais genéticos superiores, o melhorista necessita selecionar com base em vários caracteres, para melhor inferir a superioridade relativa dos mesmos. Segundo Gonçalves et al. (2007) o uso de índice de seleção permitiu a predição de ganhos simultâneos em vários caracteres do maracujá-amarelo, o que não é possível com a seleção direta.

Para o caráter SST estimaram-se ganhos preditos em torno de 5%, nos dois ambientes. No entanto, este caráter apresenta uma particularidade, ou seja, se correlaciona negativamente com

todos os caracteres de qualidade de fruto e com a produção, devendo-se, também atentar para qual método de seleção usar, pois não se esperam ganhos simultâneos entre os demais caracteres devido a sua correlação negativa.

Observam-se ganhos com a seleção indireta em todos os caracteres avaliados, nos dois locais (Tabela 14). Os ganhos preditos, de maneira geral, foram inferiores aos encontrados com a seleção direta, mas as estimativas de ganhos genéticos indicam a presença de genótipos com desempenho similar nos dois ambientes.

Em relação aos caracteres determinantes da produção (PR), a seleção indireta, com base em número de frutos por planta (NF), levou a ganhos preditos superiores (10,18% a 11,25%) em relação a CF (3,55% a 4,49%) e semelhante a PF (10,93% e 12%).

Tal resultado é de interesse para os programas de melhoramento genético de maracujazeiro, uma vez que bastaria utilizar como critério de seleção NF para se ganhar em PR. O caráter NF é de fácil mensuração, pode ser realizado na própria planta sem a necessidade da colheita do fruto, o que resultará em economia de recursos financeiros e de mão de obra. Entretanto, devem ser considerados os objetivos do programa. Para o mercado de fruta fresca, como é o caso do maracujá-doce, a obtenção de frutos medianos é essencial, pois estes alcançam preços maiores, aumentando a rentabilidade, o que pode compensar a produtividade menor.

Tabela 14 - Ganho esperado com a seleção baseado em seleção direta e indireta em uma população F₁ de maracujá-doce, na Estação Experimental do Anhembi (1) e em Descalvado (2) para os caracteres DF, CF, PF, EC e PC
(continua)

Tipo	Seleção	Resposta	DF		CF		PF		EC		PC	
			Ganho de seleção									
			Absoluto	%	Absoluto	%	Absoluto	%	Absoluto	%	Absoluto	%
E. E. do Anhembi												
a	1	1	3,75	5,27	7,04	6,14	37,50	19,08	0,64	6,13	28,79	19,00
b	2	1	2,16	3,03	5,15	4,49	21,48	10,93	0,40	3,89	16,57	10,93
Descalvado												
a	2	2	3,22	4,51	7,54	6,60	43,87	22,77	0,17	1,76	28,42	19,04
b	1	2	1,60	2,25	4,07	3,55	23,38	12,00	0,62	6,11	22,20	14,74

(DF) diâmetro médio de frutos; (CF) comprimento médio de frutos; (PF) peso médio de frutos; (EC) espessura média da casca; (PC) peso médio da casca;

a: Seleção e resposta no mesmo ambiente; b: Seleção em um ambiente e resposta em outro

Tabela 14 - Ganho esperado com a seleção baseado em seleção direta e indireta em uma população F₁ de maracujá-doce, na Estação Experimental do Anhembi (1) e em Descalvado (2) para os caracteres SST, NF, PR e PP (conclusão)

Tipo	Seleção	Resposta	SST		NF		PR		PP	
							Ganho de seleção			
			Absoluto	%	Absoluto	%	Absoluto	%	Absoluto	%
E. E. do Anhembi										
a	1	1	1,09	5,64	69,14	30,80	15,84	35,85	8,26	18,36
b	2	1	0,77	3,96	25,26	11,25	5,58	12,62	2,25	5,00
Descalvado										
a	2	2	1,10	5,97	42,67	18,45	13,73	31,32	9,03	21,31
b	1	2	0,45	2,39	23,15	10,18	4,62	10,51	2,26	5,16

(SST) teor de sólidos solúveis totais; (NF) número de frutos por planta; (PR) produção e (PP) peso médio de polpa
a: Seleção e resposta no mesmo ambiente; b: Seleção em um ambiente e resposta em outro

4.2 Análises moleculares: genotipagem da população de mapeamento (F_1) e segregação das marcas SSR, AFLP e M-AFLP

Um total de 180 indivíduos da população de mapeamento mais os dois genitores foram caracterizados com base em 21 locos microssatélites e 34 combinações de enzimas/iniciadores pré selecionadas de AFLP (Tabela 3). Nas Figuras 4 e 5, partes das imagens de um gel de SSR e de AFLP, ambos corados com nitrato de prata, são apresentadas, respectivamente.

Figura 4 – Padrão do loco PA-28 de SSR: DNA dos genitores 2(12) e SV3 e de parte da população F_1 após eletroforese em gel de acrilamida corado com prata

Um total de 21 locos polimórficos foi amplificado, sendo quatro informativos (presença de banda) para o genitor SV3 e sete para o genitor 2(12); quatro locos se mostraram biparentais, com segregação 3:1, dois biparentais, com segregação 1:2:1 e quatro biparentais com segregação 1:1:1:1. Outros quatro locos de microssatelite-AFLP (M-AFLP) apresentaram padrão de segregação 1:1:1:1. As marcas de SSR e microssatélite-AFLP não apresentaram distorção de segregação (Tabela 15).

Um total de 322 locos polimórficos de AFLP foi obtido a partir da amplificação de 34 combinações de *primers*. A maioria dos locos segregantes (289) apresentou padrão de segregação 1:1, sendo 126 informativos (presença da banda) para o genitor SV3 e 163 para o genitor 2(12). Outros 17 locos AFLP foram bi-parentais e segregaram na proporção 3:1. A taxa de polimorfismo apresentada pelos marcadores SSR foi de 10% e de AFLP 18%.

Figura 5 – Padrão de AFLP obtido a partir da combinação EM04 usando o DNA dos genitores e de parte da população de mapeamento (F_1), após eletroforese em gel de acrilamida corado com prata. As setas indicam locos segregantes

O teste de aderência de χ^2 (qui-quadrado), com nível de significância $\alpha = 0,05$, verificou a veracidade da hipótese nula (H_0) de segregação mendeliana 1:1 e 3:1 (dependendo da configuração genética do loco). Foi verificado, também, a existência de distorções de segregações das marcas, utilizando-se o critério FDR (*False Discovery Rate*). Após a verificação 16 marcas ainda apresentaram desvios da proporção de segregação esperada, sendo sete delas com desvios para a proporção 1:1 e nove com desvios da proporção 3:1.

Tabela 15- Número de locos utilizados na construção do mapa genético de maracujá-doce para tipo de marca

Nº de locos polimórficos	Monoparentais (1:1)		Biparentais		
	2(12)	SV3	3:1	1:2:1	1:1:1:1
AFLP	163	126	17	-	-
Microsatélites	7	4	4	2	4
M-AFLP	-	-	-	-	4
Com distorção de segregação esperada	6	1	7	-	-
Com mais de 10% de dados perdidos	2	-	1	-	-
Total utilizado na construção do mapa	170	130	21	2	8

Distorções de segregação de locos marcadores têm sido observadas tanto em espécies parcialmente endogâmicas, como o algodão (LIN et al., 2009), endogâmicas, como o trigo (MANTOVANI et al., 2008) e a alface (TRUCO et al., 2007), quanto em espécies não endogâmicas, como a cana-de-açúcar (ALWALA et al., 2008), a maçã (IGARASHI et al., 2008) e o maracujá-amarelo (OLIVEIRA et al., 2008).

Em maracujá-amarelo, foram relatadas taxas de distorção que variavam de 2,5% a 5% (LOPES et al. 2006; OLIVEIRA et al. 2008), em cana-de-açúcar, 10% (ALWALA et al. 2008) e taxas variando de 5,5% a 13,4% foram relatados em *Populus* (WOOLBRIGHT et al., 2008).

Existem vários fatores que contribuem para as distorções de segregação, tais como: erros de genotipagem, viés estatístico e razões biológicas. A distorção pode ser também explicada pela co-migração de locos separados (WOOLBRIGHT et al., 2008). Cervera et al. (2001) e Yin et al. (2004) encontraram que as distorções de segregação em alguns marcadores podem ocorrer devido à susceptibilidade à *Melampsora*, que causa um tipo de ferrugem, ou a outras forças de seleção durante a geração de híbridos. Bearzoti (2000) recomenda que esses locos sejam excluídos da construção dos mapas de ligação por afetarem os testes estatísticos usados para detectar a ligação gerando, assim, falsos positivos.

4.3 Construção dos mapas de ligação

Foram utilizadas 331 marcas sendo 21 SSR , 306 AFLP e 4 M-AFLP na construção do mapa de ligação (Tabela 15), todas com segregação de acordo com o esperado e com menos de 10% de observações perdidas. Destas, 170 foram informativas para o genitor 2(12), 130 foram informativas para o genitor SV3 e 31 biparentais.

Pela utilização da metodologia proposta por Wu et al. (2002a), visando gerar um mapa único ou integrado, 97,57% das marcas (322) foram ligadas com $LOD \geq 5,0$ e fração de recombinação $\leq 0,35$, formando nove grupos de ligação o que corresponde ao número de cromossomos de maracujá-doce ($2n = 18$). O número de marcas por grupo de ligação (GL) variou de 11 (GL-IX) a 55 (GL-IV) (Tabela 16).

Todas as 21 marcas SSR, com segregação 1:1, 1:2:1 ou 3:1, foram alocadas no *framework* do mapa. Das quatro marcas SSR com segregação 1:1:1:1, totalmente informativas, apenas uma não foi alocada no *framework*. A distribuição das 20 marcas SSR foi observada em seis dos nove grupos, com número variando de uma marca no GL-V e seis marcas no GL-VII. Não foram alocadas marcas SSR no *framework* dos GL-VIII e GL-IX. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Oliveira et al. (2008), já que a distribuição de microssatélites se deu em oito dos grupos de ligação do mapa integrado de maracujá-amarelo ($2n = 18$). Em ambos os casos, o número de marcas SSR foi baixo, havendo necessidade de outros estudos para aumentar esses números

Com relação às marcas AFLP, 98% dos locos com segregação 1:1 e 3:1 foram alocados no *framework* dos GL. Lanteri et al. (2006) alocaram 13 M-AFLP no primeiro mapa de ligação de alcachofra, sendo esses marcadores distribuídos aleatoriamente, estando presentes em 13 dos 18 grupos de ligação para o mapa do genitor feminino e 13 dos 16 grupos de ligação para o mapa do genitor masculino, já que esses autores utilizaram a estratégia *2-way pseudo testcross*.

A técnica M-AFLP é muito semelhante ao AFLP e as distribuições destes marcadores parecem ser similares aos AFLP convencionais. No entanto, foi demonstrado que a frequência de motivos microssatélites é significativamente mais elevada em regiões transcritas do que em não-transcritas do DNA (MORGANTE et al., 2002). Assim o polimorfismo de M-AFLP pode ser mais eficiente do que o de AFLP para identificar e mapear genes (ALBERTINI et al., 2003).

Tabela 16 - Distribuição das marcas alocadas no *framework* de cada grupo de ligação do mapa integrado de maracujá-doce

GL	Nº de marcas alocadas no <i>framework</i>							Total
	AFLP		Microsatélites				M-AFLP	
	1:1	3:1	1:1	3:1	1:2:1	1:1:1:1	1:1:1:1	
I	21	1	-	-	1	1	-	24
II	41	5	-	-	-	-	2	48
III	44	3	3	1	-	1	-	52
IV	50	3	-	-	1	1	1	56
V	20	1	1	-	-	-	-	22
VI	46	-	2	1	-	-	1	50
VII	30	3	4	2	-	-	-	39
VIII	20	-	-	-	-	-	-	20
IX	11	-	-	-	-	-	-	11
Não ligadas	8	-	-	-	-	1	-	
Total	283	16	10	4	2	7		322

GL: Grupo de Ligação;

Para a construção dos mapas de ligação, num primeiro passo, foi utilizada a metodologia de dois pontos, que gerou 10 GL. Em seguida, foi utilizado o algoritmo RCD (*Rapid Chain Delineation*) para o estabelecimento de uma ordem preliminar. Uma vez que os grupos foram determinados, para cada grupo, foi refeita, a ordenação com base na metodologia HMM (*Hidden Markov Models*), utilizando, agora, estimativa multiponto.

Foram comparadas 60 ordens para os cinco marcadores mais informativos que foram ancorados no *framework* principal e, com base na estimativa de máxima verossimilhança, foi escolhida a melhor ordem. Em seguida, os marcadores remanescentes foram inseridos um a um. Wu et al. (2002a) afirmam que melhores estimativas de fração de recombinação e de ordenação das marcas são obtidas quando utilizadas estimativas multiponto.

Os grupos de ligação foram aqui constituídos de 322 marcadores distribuídos entre os nove grupos com média de 32 marcas por GL. A distância total foi de 1.725,3 cM, variando de 101,3 (GL-IX) a 280,4(GL-III) cM, com média de 191,7 cM por GL. A distância média entre marcas no *framework* foi de 5,37 cM, sendo que o maior intervalo foi de 42,7 cM (GL-7) (Figura 6). Na Tabela 17 estão resumidas as características do mapa integrado.

Tabela 17 - Características do mapa integrado de maracujá-doce

Características	Mapa integrado
Número total de locos	331
Grupos de ligação	9
Marcadores ordenados no <i>framework</i>	322
Comprimento do mapa (cM – Kosambi)	1725,3
Comprimento do maior grupo de ligação (cM – Kosambi)	280,4
Comprimento do menor grupo de ligação (cM – Kosambi)	101,3
Comprimento médio dos grupos de ligação (cM – Kosambi)	191,7
Distância média entre os marcadores (cM – Kosambi)	5,37

Observou-se que 75,5% dos marcadores concentram-se em cinco grupos de ligação (GL– 2, 3, 4, 6, e 7), cobrindo 64,3% do comprimento dos GL (Tabela 18). Resultados semelhantes foram encontrados em maracujá-amarelo por Matta (2005), que observou 70% das marcas em cinco grupos de ligação que correspondiam a 75% do comprimento total do mapa. Da mesma forma, Oliveira et al. (2008) ao construir o primeiro mapa integrado de maracujá-amarelo observou a reunião de 70% das marcas em cinco grupos de ligação, cobrindo 63,1% do comprimento dos GL.

Tabela 18 - Correspondência entre o número de marcas, comprimento dos grupos de ligação e a porcentagem de cada grupo em relação ao comprimento do mapa

GL	Mapa Integrado		
	Nº de marcas	Comprimento (cM)	% do Comprimento total
1	24	243,5	14,68
2	48	136,8	7,87
3	52	280,4	16,14
4	56	248,2	14,29
5	22	140,1	8,08
6	50	253,7	14,62
7	39	198,6	11,43
8	20	122,7	7,06
9	11	101,3	5,83
Total	322	1736,8	100

GL: Grupo de Ligação

Figura 6 – Mapa de ligação integrado (GL-I e GL-II) com base em marcadores biparentais, AFLP e microssatélites (negrito e sublinhado). À esquerda do *framework* estão as posições estimadas e à direita o código das marcas

(continua)

Figura 6 – Mapa de ligação integrado (GL-III e GL-IV) com base em marcadores biparentais, AFLP e microssatélites (negrito e sublinhado). À esquerda do *framework* estão as posições estimadas e à direita o código das marcas

(continuação)

Figura 6 – Mapa de ligação integrado (GL-V e GL-VI) com base em marcadores biparentais, AFLP e microssatélites (negrito e sublinhado). À esquerda do *framework* estão as posições estimadas e à direita o código das marcas

(continuação)

Figura 6– Mapas de ligação integrado (GL-VII, GL-VIII e GL-IX) com base em marcadores biparentais, AFLP e microssatélites (negrito e sublinhado). À esquerda do framework estão as posições estimadas e à direita o código das marcas

(conclusão)

Apesar dos problemas inerentes aos marcadores dominantes com segregação 3:1 para se estimar a ligação, 100% deles puderam ser alocados no *framework* do mapa-integrado de maracujá-doce, utilizando a metodologia proposta por Wu et al. (2002a), através do *software OneMap vs 1.0-1* (MARGARIDO et al., 2007). O número médio de marcas 3:1 por grupo de ligação foi de 2,4. Número médio superior (5,6) foi encontrado por Oliveira et al. (2008), sendo que esta discrepância se deve ao maior número de marcas 3:1 alocadas no *framework* do mapa integrado de maracujá-amarelo por esses autores.

Para que se possam integrar mapas genéticos de populações não endogâmicas, o ideal é utilizar marcadores com segregação completamente informativa (1:1:1:1) e parcialmente informativa (1:2:1), como marcadores microsatélites e SNPs. Estes marcadores permitem uma melhor inferência das fases de ligação e das frações de recombinação entre os diferentes tipos de segregações encontradas, bem como permitem a integração de mapas genéticos e físicos.

Lee et al. (2009) promoveram a integração de mapas de ligação em pimenta utilizando 854 marcadores dominantes e codominantes (169 SSR, 354 RFLP, 23 STS derivados de *BAC-end sequences*, 6 STS derivados de RFLP, 152 AFLP, 51 WRKY, e 99 rRAMP) e obtiveram 12 grupos de ligação. Han et al. (2009), trabalhando com maçã, promoveram a integração de mapas genéticos e físicos dessa espécie ancorando 51 SNPs resultantes de *contigs* obtidos pelo sequenciamento de *BAC-ends* distribuídos em 14 grupos de ligação que cobriram aproximadamente 37 Mb do mapa físico de maçã.

A construção do mapa genético de *P. alata* representa a continuidade de uma linha de pesquisa do nosso laboratório, que vem trabalhando com as espécies de *Passiflora* exploradas comercialmente (maracujá-amarelo e maracujá-doce). O mapa aqui apresentado é o primeiro para a espécie e será utilizado para a alocação de novas marcas de microsatélites e SNP, que serão progressivamente mapeadas em busca da integração completa dos grupos de ligação e de um adensamento em marcadores codominantes, principalmente em regiões genômicas específicas de interesse aplicado. A alocação de marcadores SSR e SNP contribuirá para o estabelecimento da correspondência entre os mapas genéticos de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (maracujá-amarelo) e *P. alata* (maracujá-doce), estudos de citogenética via FISH e filogenéticos.

4.4 Mapeamento de QTL

4.4.1 Mapeamento por intervalo composto

Antes de proceder com o mapeamento dos QTL foi verificado se havia necessidade de transformação dos dados para todos os caracteres (DF, CF, PF, EC, PC, PP, SST, NF e PR). Verificou-se que não havia necessidade de transformar os dados.

O mapeamento realizado identificou QTL para todos os caracteres, utilizando *LOD Score* 2 como limiar. No total, foram detectadas 57 associações entre fenótipos e marcadores, com 27 QTL mapeados com os dados do local E. E. do Anhembi (Tabela 19) e 30 QTL mapeados com os dados de Descalvado (Tabela 20).

Os caracteres com menos QTL foram PF com um QTL em cada local e PC com um QTL detectado apenas na E. E. do Anhembi. Os maiores números de QTL foram encontrados para os caracteres PR com seis QTL em Descalvado e PP e EC com cinco QTL cada na E. E. do Anhembi. Os valores de *LOD Score* variaram de 2,10 a 4,70 e os R^2 variaram de 0,90 % a 8,93% em Descalvado. Já na E. E. do Anhembi os valores de *LOD Score* variaram de 2,05 a 4,65 e os valores de R^2 variaram de 0,85% a 11,26%. Os QTL apresentaram segregação 1:1 (75%), 1:2:1 (19%) e 3:1 (6%). Como a análise de mapeamento por intervalo composto detectou vários QTL, para uma melhor apresentação, os resultados estão divididos por caráter.

Tabela 19 – QTL mapeados conforme modelo CIM em Descalvado, SP

Caráter	Posição			Efeitos					Conclusão					
	GL cM	Marcas flaqueadoras	LOD	$\hat{\mu}$	$\alpha_p^{*(1)}$	LOD	$\alpha_q^{*(2)}$	LOD	$\widehat{\delta_{pq}^{*(3)}}$	LOD	Fase	Seg	R ² (%)	
DF	2	28,45	D2-EM03102	4,61	70,88	0,05	0,00	-0,27	0,90	-1,35	5,01	n.d.	1:1	2,99
DF	4	125,80	D2-PM04620	2,85	71,05	1,10	3,03	-0,02	0,00	-0,38	0,48	P^1P^2	1:1	3,67
DF	6	18,00	D2-EM44090 - C-EM15100	2,62	71,22	1,02	2,15	-0,19	0,03	-0,54	0,31	P^1P^2	1:1	8,78
DF	8	21,34	D1-EM05158	2,22	71,14	0,64	1,64					P^1P^2	1:1	0,90
														16,33
CF	3	91,06	D2-PM05373	3,21	113,33	-0,77	0,37	0,85	0,29	-2,07	2,57	n.d.	1:1	3,53
CF	4	104,26	D1-PM06181	2,73	113,39	2,13	2,79	-0,68	0,42	0,57	0,15	P^1P^2	1:1	2,83
CF	6	18,28	C-EM15100	4,34	113,20	1,53	1,12	-1,43	1,11	-1,67	1,28	P^1P^2 x $\bar{Q}^2\bar{Q}^1$	3:1	8,68
														15,03
PF	6	18,00	D2-EM44090 C-EM15100	4,70	191,83	8,55	1,36	-8,48	1,50	-8,96	1,25	P^1P^2 x $\bar{Q}^2\bar{Q}^1$	3:1	3,67
														3,67
EC	1	164,66	D2-EM08373	2,52	9,76		0,16	1,91				P^1P^2	1:1	1,00
														1,00
PC	3	107,38	D1-EM13254	2,63	149,13	3,52	0,40	6,57	1,21	-6,43	1,41	$\bar{Q}^1\bar{Q}^2$	1:2:1	3,93
PC	4	135,43	A1-PE15204	2,27	148,79	9,36	2,57	-1,21	0,13	2,14	0,25	P^1P^2	1:1	2,93
PC	6	18,00	D2-EM44090 C-EM15100	2,43	149,88	7,60	1,63	-3,24	0,22	-4,89	0,39	P^1P^2	1:1	8,93
PC	7	85,94	D1-EM33294	2,10	149,83	6,56	2,10	2,73	0,32	-1,25	0,07	P^1P^2	1:1	4,04
														19,14
PP	2	1,32	D1-EM05377	4,63	43,71	0,02	0,00	2,13	1,34	-3,11	3,36	n.d.	1:1	3,20
PP	3	107,38	D1-EM13254	3,81	43,99	-0,13	0,00	1,63	0,95	-2,90	3,28	n.d.	1:1	3,14
PP	6	132,00	D2-EM59500 - D2-EM56230	2,68	43,18	-0,46	0,14	1,57	1,28	1,92	1,67	$\bar{Q}^1\bar{Q}^2$	1:2:1	7,42
PP	6	162,73	D2-EM01123	2,44	43,44	1,02	0,52	-1,61	1,55	-1,52	0,75	$\bar{Q}^2\bar{Q}^1$	1:1	4,41
														18,18

GL: grupo de ligação, cM: posição do primeiro marcador que flanqueia o QTL, Fase: genótipo do QTL e alelos.

 $\alpha_p^{*(1)}$ efeito marginal do genitor P (SV3), $\alpha_q^{*(2)}$ efeito marginal do genitor Q (2(12)), $\widehat{\delta_{pq}^{*(3)}}$ efeito devido à dominância

Tabela 19 – QTL mapeados conforme modelo CIM em Descalvado, SP

Caráter	Posição			Efeitos						Conclusão				
	GL	cM	Marcas flaqueadoras	LOD	$\hat{\mu}$	$\alpha_p^{*(1)}$	LOD	$\alpha_q^{*(2)}$	LOD	$\delta_{pq}^{*(3)}$	LOD	Fase	Seg	R ² (%)
SST	3	31,06	D1-PM03151	3,29	18,38	0,13	0,95	-0,04	0,12	-0,26	2,96	n.d.	1:1	3,07
SST	5	49,67	C-PM03890	2,39	18,33	0,19	1,25	-0,15	0,43	0,13	0,41	P ¹ P ²	1:1	4,30
SST	9	72,38	D1-EM33372	2,30	18,32	-0,24	1,71					P ² P ¹	1:1	0,97
														8,34
NF	1	53,29	B2-PE13332	2,38	182,96	-7,25	0,50	15,58	2,27	1,84	0,00	Q ¹ Q ²	1:1	6,86
NF	1	184,66	D2-EM19399	2,52	183,35			-16,71	1,90			Q ² Q ¹	1:1	0,91
NF	3	181,00	C-EM03140 - D1-EM08185	2,73	187,50	-11,55	1,68	3,41	0,18	-9,87	1,16	P ² P ¹	1:2:1	4,23
NF	6	66,75	D2-EM44090 C-EM15100	2,58	188,48	-10,29	1,38	-3,57	0,17	10,81	1,43	P ² P ¹	1:2:1	2,87
														14,86
PR	1	184,66	D2-EM19399	2,58	34,81			-2,88	1,96			Q ² Q ¹	1:1	0,95
PR	2	55,48	D2-EM57337	4,41	34,65	-0,15	0,85	0,50	0,12	-3,55	4,13	n.d.	1:1	6,54
PR	2	100,10	D1-EM56376	2,70	35,09	1,44	0,82	-0,11	0,00	2,79	2,46	n.d.	1:1	6,57
PR	3	191,00	D2-EM03233 D2-EM24136	2,68	34,57	1,40	0,49	2,10	0,30	-3,30	2,20	P ¹ P ²	1:1	3,06
PR	7	60,36	D1-EM13376	2,61	34,85	3,81	3,03	0,37	0,05	0,33	0,02	n.d.	1:1	5,48
PR	9	0,00	D1-PM04125	2,12	34,65	2,34	1,55					P ¹ P ²	1:1	1,02
														23,60

GL: grupo de ligação, cM: posição do primeiro marcador que flanqueia o QTL, Fase: genótipo do QTL e alelos.

 $\alpha_p^{*(1)}$ efeito marginal do genitor P (SV3), $\alpha_q^{*(2)}$ efeito marginal do genitor Q (2(12)), $\delta_{pq}^{*(3)}$ efeito devido à dominância

Tabela 20– QTL mapeados conforme modelo CIM na E. E. do Anhembi, SP

Caráter	Posição			Efeitos							Conclusão			
	GL	cM	Marcas flaqueadoras	LOD	$\hat{\mu}$	$\alpha_p^{*(1)}$	LOD	$\alpha_q^{*(2)}$	LOD	$\delta_{pq}^{*(3)}$	LOD	Fase	Seg	R ² (%)
DF	2	55,48	D2-EM57337	2,66	71,61	-0,15	0,11	0,26	0,10	-1,05	2,76	n.d.	1:1	2,92
DF	4	135,43	A1-PE15204	2,26	71,65	0,70	1,37	-0,72	1,51	-0,28	0,12	$P^1P^2 \times \bar{Q}^2\bar{Q}^1$	1:2:1	3,09
DF	7	168,41	D2-EM16138	2,06	71,67	0,07	0,02	-0,45	0,86	0,68	1,79	n.d.	1:1	3,15
CF	2	90,28	D1-PM08331	2,83	114,38	-0,30	0,13	0,09	0,02	-2,00	3,27	n.d.	1:1	9,15
CF	3	112,33	D2-EM10222	3,18	114,64	0,78	0,19	2,02	2,20	-1,22	0,81	$\bar{Q}^1\bar{Q}^2$	1:1	3,07
CF	4	125,80	D2-PM04620	2,46	114,39	1,25	1,34	-1,69	1,84	-0,01	0,00	$P^1P^2 \times \bar{Q}^2\bar{Q}^1$	1:2:1	3,95
PF	4	125,80	D2-PM04620	2,05	194,20	5,08	0,75	-10,45	1,94	0,25	0,00	$\bar{Q}^2\bar{Q}^1$	1:1	10,05
EC	1	53,29	B2-PE13332	2,24	10,33	0,10	0,78	0,00	0,00	-0,12	1,28	n.d.	1:1	7,15
EC	1	155,38	D2-EM28119	2,81	10,32			0,15	2,17			$\bar{Q}^1\bar{Q}^2$	1:1	8,90
EC	2	110,42	D2-EM24462	2,87	10,38	0,03	0,05	0,04	0,27	0,16	3,06	n.d.	1:1	0,93
EC	4	135,43	A1-PE15204	4,65	10,30	0,13	1,64	-0,10	1,14	-0,17	2,45	$P^1P^2 \times \bar{Q}^2\bar{Q}^1$	3:1	3,73
EC	9	72,38	D1-EM33372	2,41	10,30	-0,14	1,81					P^2P^1	1:1	3,02
PC	4	125,80	D2-PM04620	2,33	151,95	5,24	1,06	-8,83	1,97	-0,42	0,02	$P^1P^2 \times \bar{Q}^2\bar{Q}^1$	1:2:1	1,00
														17,58
														4,00
														4,00

GL: grupo de ligação, cM: posição do primeiro marcador que flanqueia o QTL, Fase: genótipo do QTL e alelos.
 $\alpha_p^{*(1)}$ efeito marginal do genitor P (SV3), $\alpha_q^{*(2)}$ efeito marginal do genitor $\bar{Q}$ (2(12)), $\delta_{pq}^{*(3)}$ efeito devido à dominância

Tabela 20 – QTL mapeados conforme modelo CIM na E. E. do Anhembi

Caráter	Posição			Efeitos					Conclusão					
	GL	cM	Marcas flanqueadoras	LOD	$\hat{\mu}$	$\alpha_p^{*(1)}$	LOD	$\alpha_q^{*(2)}$	LOD	$\widehat{\delta_{pq}^{*(3)}}$	LOD	Fase	Seg	R ² (%)
PP	2	83,14	D2-EM24135	2,21	42,45	-0,84	0,66	-0,39	0,09	-1,72	1,95	n.d.	1:1	4,23
PP	2	136,86	C-EM30220	2,19	43,19	-0,55	0,10	1,28	1,07	1,29	0,94	$\bar{Q}'\bar{Q}'$	1:2:1	11,26
PP	3	107,38	D1-EM13254	2,32	42,80	0,64	0,34	-0,06	0,01	-2,08	2,58	n.d.	1:1	3,00
PP	4	35,53	D2-EM32315	3,24	42,85			-2,16	2,57			$\bar{Q}^2\bar{Q}'$	1:1	0,85
PP	5	115,00	D2-PA132255	3,26	42,90			2,10	2,59			$\bar{Q}'\bar{Q}^2$	1:1	0,92
														20,26
SST	3	25,33	D2-EM39447	2,50	19,32	0,06	0,25	0,10	0,53	-0,21	2,30	n.d.	1:1	4,31
SST	3	62,06	D1-PM07365	3,20	19,29	-0,09	0,45	-0,18	1,88	0,18	1,39	$\bar{Q}^2\bar{Q}'$	1:2:1	3,52
SST	4	115,67	D2-EM39247	1,97	19,27	-0,12	0,98	0,06	0,18	-0,16	1,40	n.d.	1:1	4,09
SST	5	49,67	C-PM03890	4,73	19,30	0,07	0,01	-0,28	2,24	0,23	1,56	$\bar{Q}^2\bar{Q}'$	1:2:1	4,12
														16,04
NF	2	93,25	D2-EM03500	1,89	165,20	5,29	0,31	8,75	0,90	-9,96	1,08	n.d.	1:1	3,29
NF	3	62,06	D1-PM07365	2,58	165,12	-14,29	1,15	-8,68	0,62	-14,55	1,23	$\bar{Q}^2\bar{Q}'$	1:2:1	2,85
NF	6	132,00	D2-EM59500 D2-EM56230	2,76	166,34	0,82	0,00	-19,52	3,26	1,73	0,05	$\bar{Q}^2\bar{Q}'$	1:1	5,27
														11,41
PR	3	62,10	D1-PM07365	2,83	35,34	-4,19	2,18	-1,63	0,44	-2,52	0,62	P^2P'	1:1	2,91
PR	6	132,70	D2-EM56230	4,10	34,18	-0,19	0,02	-5,12	4,31	-1,09	0,13	$\bar{Q}^2\bar{Q}'$	1:1	4,92
														7,83

GL: grupo de ligação, cM: posição do primeiro marcador que flanquea o QTL, Fase: genótipo do QTL e alelos.
 $\alpha_p^{*(1)}$ efeito marginal do genitor P (SV3), $\alpha_q^{*(2)}$ efeito marginal do genitor Q (2(12)), $\delta_{pq}^{*(3)}$ efeito devido à dominância

QTL para diâmetro médio do fruto (DF)

Um total de sete QTL foi mapeado para DF, com quatro deles em Descalvado e três na E.E. do Anhembi. A proporção da variação fenotípica explicada (R^2) por estes QTL variou de 0,90 a 8,78% em Descalvado e de 2,92 a 3,15% na E.E. do Anhembi; conjuntamente, esta variação foi de 16,33% e 9,15 %, respectivamente (Tabela 19 e 20). Nota-se que o QTL mapeado em Descalvado localizado no GL-VI explica aproximadamente 50% (8,78%) do R^2 para aquele local e este apresenta o efeito marginal (α_p^*) significativo, tratando-se, portanto, de ação gênica aditiva; os alelos que conferem aumento no fenótipo estão no genitor *P* (SV3) e estes se apresentam em associação.

Na E.E. do Anhembi, em média, os QTL explicaram 33% da variação fenotípica encontrada naquele local, não havendo uma superioridade entre eles e, dentre os três QTL mapeados, um apresentou efeitos marginais significativos (α_q^* e α_p^*) e os outros dois apenas efeito de dominância significativos, com um deles contribuindo para a redução do caráter (Tabela 19 e 20). Moraes (2005) mapeou quatro QTL para DF em maracujá-amarelo na E.E. Anhembi, com o QTL de menor efeito explicando 6,4% e o de maior efeito 14,3% da variação fenotípica os quais conjuntamente, explicaram 43,44%.

Zhang et al. (2010) analisando uma população originária do cruzamento de dois acessos de cereja, sendo um cultivar e outro, acesso selvagem, identificou três QTL para diâmetro de fruto que explicaram de 4,2 a 39,4 % da variação fenotípica do caráter.

O padrão de segregação predominante nos QTL foi de 1:1; apenas o QTL do GL-IV mapeado na E.E. do Anhembi mostrou segregação 1:2:1. Observa-se na Figura 7, QTL específicos para cada ambiente exceto no GL-IV, onde se sobrepõem na mesma região genômica, com efeitos marginais significativos para o genitor SV3. Embora tal estudo seja preliminar, a região que compreende os QTL (DFd2 e DFa2) deve ser observada ao longo da próxima colheita.

Figura 7 – Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter DF; em vermelho QTL mapeados em Descalvado e, em preto, na E.E. do Anhembi

(continua)

Figura 7 – Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter DF; em vermelho, QTL mapeados em Descalvado e, em preto, na E.E. do Anhembi

(conclusão)

QTL para comprimento médio do fruto (CF)

Um total de seis QTL foi mapeado para CF, com três para cada localidade. A proporção da variação fenotípica explicada por estes QTL variou de 2,83% a 8,68% em Descalvado e de 3,03% a 3,95% na E.E. do Anhembi; conjuntamente, esta variação foi de 15,03% e 10,05%, respectivamente (Tabela 19 e 20). Nota-se que o QTL mapeado em Descalvado localizado no GL-VI explica aproximadamente 50% (8,68%) do R^2 estimado para aquele local, e este apresenta o efeito de dominância significativo (δ_{pq}^*), porém o efeito no fenótipo do caráter é negativo, ou seja, caso se pratique a seleção com base neste QTL espera-se redução na característica.

Na E.E. do Anhembi os QTL explicaram em média 33% do R^2 estimado para aquele local, não havendo uma superioridade observada entre eles (Tabelas 19 e 20). Moraes (2005) mapeou cinco QTL para DF em maracujá-amarelo na E.E. do Anhembi, com o QTL de menor efeito explicando 6,1% e o de maior efeito 13,6% da variação fenotípica; conjuntamente, explicaram 42,74%.

Zhang et al. (2010) encontraram três QTL controlando o comprimento do fruto em cereja que, em média, explicaram conjuntamente 24,91% da variação fenotípica.

O padrão de segregação predominante nos QTL foi de 1:1, com dois QTL com padrão 1:2:1 e 3:1, GL-IV e GL-VI, mapeados em Descalvado e na E.E. do Anhembi respectivamente. Na Figura 8 observa-se nos GL III e IV, dois QTL com sobreposição em regiões genômicas que os identificam em ambos os locais (CFd1 com CFa2 e CFd2 com CFa3).

(continua)

Figura 8 – Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter CF; em vermelho QTL mapeados em Descalvado, e, em preto, na E.E. do Anhembi

Figura 8 –Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter CF; em vermelho QTL mapeados em Descalvado, e, em preto, na E.E. do Anhembi

QTL para peso médio do fruto (PF)

Dois QTL foram mapeados para PF. A proporção da variação fenotípica (R^2) explicada por estes QTL variou de 3,67 a 7,15% em Descalvado e E.E. do Anhembi, respectivamente (Tabela 19 e 20). Moraes (2005) mapeou quatro QTL para PF em maracujá-amarelo na E.E. do Anhembi, com o QTL de menor efeito explicando 8,43% e o de maior efeito 10,38% da variação fenotípica; conjuntamente, estes explicaram 38,04%.

Zhang et al. (2010) encontraram três QTL controlando o peso do fruto em cereja que, em média, explicaram conjuntamente ao longo de três anos 17,73% , 25,20% e 43% da variação fenotípica do caráter.

Os QTL detectados para PF encontram-se nos GL-IV e VI com padrão de segregação 1:1 e 3:1, respectivamente. O QTL mapeado na E. E. do Anhembi apresentou apenas um efeito marginal significativo (α_q^*) e sem efeito de dominância. No entanto, tal QTL possui efeito negativo, ou seja, observa-se decréscimo da característica. Já o QTL mapeado em Descalvado apresentou efeitos marginais α_q^* negativo, α_p^* positivo e efeito de dominância negativo e significativos. Para ambos os QTL observou-se que a contribuição do genitor $Q, 2(12)$, é negativa para este caráter.

Embora os R^2 de alguns QTL sejam superiores, deve-se atentar para a direção e magnitude do efeito, pois para PF deseja-se incremento na característica. Na Figura 9 observa-se QTL mapeados para o caráter PF.

Figura 9 – Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter PF; em vermelho, QTL mapeados em Descalvado e, em preto, na E.E. do Anhembí

QTL para espessura da casca (EC)

Um total de seis QTL foi mapeado para EC, sendo um em Descalvado e cinco para a E.E. do Anhembi. O R^2 explicado por estes QTL foi de 1,00% em Descalvado e variou de 0,93% a 8,90% na E.E. do Anhembi; conjuntamente a variação foi de 17,58% na E.E. do Anhembi (Tabela 19 e 20). Nota-se que um dos QTL mapeados na E.E. do Anhembi, localizado no GL-I, explica, aproximadamente, 51% (8,90%) do R^2 estimado para aquele local. Este QTL apresentou efeito devido à dominância significativo e este contribui negativamente, ou seja, contribui para a redução do fenótipo deste caráter. Isso é muito importante visto que se deseja redução de EC. Outro ponto relevante deste QTL é que ele está associado a um marcador SSR (B2-PE13332) com segregação 1:2:1, proveniente de transferibilidade do maracujá-amarelo. Hipoteticamente, tal QTL pode estar associado ao mesmo caráter em maracujá-amarelo, necessitando um estudo de mapeamento nas mesmas condições apresentadas para verificar tal hipótese.

O padrão de segregação predominante nos QTL foi de 1:1, com um QTL com padrão 3:1 em GL-IV, mapeado na E.E. do Anhembi. Na Figura 10, observa-se em GL-I, dois QTL com sobreposição de regiões genômicas que os identificam em ambos os locais (ECa2 e ECd1).

QTL para peso da casca (PC)

Cinco QTL foram mapeados para PC, sendo quatro em Descalvado e um na E.E. do Anhembi. O R^2 explicado por estes QTL foi de 4,00% na E.E. do Anhembi e variou de 2,93% a 8,93% em Descalvado; conjuntamente, a variação foi de 19,14% em Descalvado (Tabela 19 e 20). Nota-se que o QTL mapeado em Descalvado localizado no GL-VI explica, aproximadamente, 47% (8,93%) da variação fenotípica encontrada naquele local. Porém, este QTL contribui para o incremento em peso de casca, o que não é desejável. Em contrapartida, dois outros QTL mapeados em GL-III (Descalvado) e GL-IV (E.E. do Anhembi) contribuem negativamente para este fenótipo, com o GL mapeado em Descalvado com efeito devido à dominância significativo e o mapeado na E.E. do Anhembi com efeito marginal significativo do genitor 2(12). Isto sugere que os alelos do genitor 2(12) contribuem para formação de frutos com menor peso de casca. O padrão de segregação predominante nos QTL foi de 1:1 e 1:2:1. Observam-se na Figura 11, os QTL mapeados para PC.

Figura 10 – Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter EC; em vermelho, QTL mapeados em Descalvado e, em preto, na E.E. do Anhembi

Figura 10 – Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter EC; em vermelho, QTL mapeados em Descalvado e, em preto, na E.E. do Anhembí

(conclusão)

Figura 11 – Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter PC; em vermelho, QTL mapeados em Descalvado e, em preto, na E.E. do Anhembi (continua)

Figura 11 – Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter PC; em vermelho, QTL mapeados em Descalvado e, em preto, na E.E. do Anhembi

(conclusão)

QTL para peso de polpa (PP)

Dentre os caracteres mapeados, PP apresentou o maior número de QTL, totalizando nove, sendo quatro em Descalvado e cinco mapeados na E.E. do Anhembi. O R^2 explicado por estes QTL variou de 3,14% a 7,42% em Descalvado e de 0,85% a 11,26% na E.E. do Anhembi; conjuntamente, esta variação foi de 18,18% e 20,26 % em Descalvado e na E.E. do Anhembi, respectivamente (Tabela 19 e 20). Nota-se que um dos QTL mapeados na E.E. do Anhembi (GL-II) explica aproximadamente 55% (11,26%) do R^2 estimado para aquele local. Embora seja o QTL mais importante para PP, este não apresentou efeitos marginais ou devido à dominância significativos. Em Descalvado, o QTL que explicou a maior parte do R^2 daquele local (7,42%) foi responsável por 40% da variação, mas apresentando valores significativos para o efeito marginal do genitor 2(12) (α_q^*) e efeito devido à dominância (δ_{pq}^*). Este caráter é de suma importância, pois como o maracujá-doce é um fruto exclusivamente de mesa, ou seja, para consumo *in natura* deseja-se incremento deste fenótipo.

Moraes (2005) mapeou quatro QTL para PP em maracujá-amarelo na E.E. do Anhembi, com o QTL de menor efeito explicando 6,56% e o de maior efeito 11,55% da variação fenotípica que conjuntamente explicaram 32,36%.

O padrão de segregação predominante nos QTL foi de 1:1, com dois QTL com padrão 1:2:1 (GL-VI e GL-II) mapeados em Descalvado e na E.E. do Anhembi, respectivamente. Observam-se na Figura 12, os QTL mapeados para esse caráter sendo que no GL- III há um QTL sobreposto em regiões genômicas que os identificam em ambos os locais (PPa3 e PPd2).

Figura 12 – Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter PP; em vermelho, QTL mapeados em Descalvado e, em preto, na E.E. do Anhembi

(continua)

Figura 12 – Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter PP; em vermelho, QTL mapeados em Descalvado e, em preto, na E.E. do Anhembi (continuação)

GL-VI

Figura 12– Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter PP; em vermelho, QTL mapeados em Descalvado e, em preto, na E.E. do Anhembi (conclusão)

QTL para sólidos solúveis totais (SST)

Sete QTL foram mapeados para o caráter SST, sendo três mapeados em Descalvado e quatro na E.E. do Anhembi. O R^2 explicado por estes QTL variou de 0,97% a 4,30% em Descalvado e de 3,52% a 4,31% na E.E. do Anhembi. Conjuntamente, esta variação foi de 8,34 e 16,04 %, respectivamente (Tabela 19 e 20). Moraes (2005) mapeou sete QTL para SST em maracujá-amarelo na E.E. do Anhembi, com o QTL de menor efeito explicando 6,53% e o de maior efeito 12,72% da variação fenotípica os quais conjuntamente explicaram 65,28%.

Causse et al. (2007) estudando qualidade de frutos em tomate mapearam três QTL associados a SST com o QTL de maior efeito explicando 31,9 % e o de menor 7,3 % da variação fenotípica.

Os efeitos marginais significativos foram dois para cada genitor, mas devido à dominância apenas dois QTL não apresentaram significância (Tabelas 19 e 20). No GL-III, foram mapeados dois QTL um na posição 25,33 cM e outro na posição 62,06 cM, QTL (SSTa1 e SSTa2), com R^2 de 4,31% e 3,52%, respectivamente. Embora SSTa2 tenha um menor R^2 , tal QTL apresenta efeito aditivo significativo e contribui para o incremento em SST enquanto que o SSTa1 contribui para o decréscimo no fenótipo.

O padrão de segregação predominante nos QTL foi de 1:1, com dois QTL com padrão 1:2:1 (GL-III e GL-V) mapeados na E.E. do Anhembi. Observam-se na Figura 13, os QTL mapeados para esse caráter, sendo que no GL-III e GL-V há sobreposição de QTL em regiões genômicas que os identificam em ambos os locais (SSTa1 com SSTd1 e SSTa4 com SSTd2).

Ritter et al. (2008) mapearam QTL para produção de sacarose, Brix, altura de planta, florescimento e matéria seca em sorgo sacarino em dois ambientes e estes apresentaram 14 QTL associados às mesmas regiões genômicas, nos dois ambientes, sendo três deles relacionados ao conteúdo de Brix.

Figura 13 – Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter SST; em vermelho, QTL mapeados em Descalvado e, em preto, na E.E. do Anhembi (continua)

Figura 13 – Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter SST; em vermelho, QTL mapeados em Descalvado e, em preto, na E.E. do Anhembi

QTL para número de frutos (NF)

Sete QTL foram mapeados para o caráter NF, sendo três mapeados na E.E. do Anhembi e quatro em Descalvado. A proporção da variação fenotípica explicada por estes QTL variou de 0,91% a 6,86% em Descalvado e de 2,85 a 5,27% na E.E. do Anhembi; conjuntamente, esta variação foi de 14,86% e 11,41 %, respectivamente (Tabela 19 e 20). Ambos os QTL que explicam a maior parte da variação fenotípica deste caráter apresentam efeito marginal significativo ($\hat{\alpha}_q^*$) no genitor 2(12), porém com efeito contrário incrementando o ganho em NF em Descalvado e baixando na E.E. do Anhembi.

Observou-se, de forma geral, com exceção do QTL mapeado no GL-I de Descalvado na posição 184,66 cM, que o efeito aditivo da ação gênica foi específica para cada ambiente, ou seja, efeitos significativos do efeito marginal do genitor SV3 colaboraram para redução do NF no ambiente Descalvado e efeito marginal do genitor 2(12) colaborou para redução do NF na E.E. do Anhembi e acréscimo em Descalvado. Tal fato pode ser explicado pelo fenômeno de interação existente entre os genótipos e o ambiente, bem como QTL e ambiente.

Moraes (2005) mapeou sete QTL para NF em maracujá-amarelo na E.E. do Anhembi, com o QTL de menor efeito explicando 4,55% e o de maior efeito 16,49% da variação fenotípica os quais conjuntamente explicaram 58,97%.

O padrão de segregação dos QTL foi de 1:1 e 1:2:1. Observam-se na Figura 14, os QTL mapeados para esse caráter.

Figura 14– Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter NF; em vermelho, QTL mapeados em Descalvado, e em preto, na E.E. do Anhembi (continua)

Figura 14 – Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter NF; em vermelho, QTL mapeados em Descalvado, e em preto, na E.E. do Anhembí

(conclusão)

QTL para produção (PR)

Foram mapeados oito QTL para o caráter PR, sendo dois mapeados na E.E. do Anhembi e seis em Descalvado. A proporção da variação fenotípica explicada por estes QTL variou de 0,95% a 6,57% em Descalvado e de 2,91% a 4,92% na E.E. do Anhembi. Conjuntamente, esta variação foi de 23,60% e 7,83 %, respectivamente (Tabela 19 e 20).

Moraes (2005) mapeou seis QTL para PR em maracujá-amarelo na E.E. do Anhembi, com o QTL de menor efeito explicando 6,60% e o de maior efeito 15,02% da variação fenotípica os quais, conjuntamente, explicaram 62,18%. Em Descalvado, foram mapeados os QTL com maior R^2 , sendo dois deles com efeito significativo devido à dominância, ambos no GL-II e um terceiro no GL-7, porém com efeito marginal do genitor SV3 significativo. Os QTL mapeados para este caráter foram específicos para cada local, não havendo regiões genômicas comuns.

Dentre os QTL mapeados para o caráter PR, três deles contribuem para redução do fenótipo. É importante ressaltar tal fato, visto que o interesse neste caráter é o incremento em produção.

O padrão de segregação dos QTL foi de 1:1. Observam-se na Figura 15, os QTL mapeados para esse caráter.

Figura 15 – Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter PR; em vermelho, QTL mapeados em Descalvado e, em preto, na E.E. do Anhembi (continua)

Figura 15– Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter PR; em vermelho, QTL mapeados em Descalvado e, em preto, na E.E. do Anhembi

(continuação)

Figura 15– Grupos de ligação mostrando QTL mapeados para o caráter PR; em vermelho, QTL mapeados em Descalvado e, em preto, na E.E. do Anhembi

(conclusão)

4.5 Análise crítica sobre o estudo dos QTL

O mapeamento de QTL utilizou o modelo CIM, segundo a metodologia proposta por Gazaffi (2009), utilizando um mapa integrado com marcadores com diferentes padrões de segregação (1:1, 3:1, 1:2:1 e 1:1:1:1).

As análises dos QTL revelaram que dos 37 efeitos marginais significativos, 19 eram referentes ao genitor SV3 e 18 referentes ao genitor 2(12). Porém, quando tais efeitos são separados por local observa-se que em Descalvado, 14 (66,66%) estão relacionados ao genitor SV3 e, na E.E. do Anhembi, 11 (68,75%) estão relacionados ao genitor 2(12). Isso pode ser explicado pelos QTL de cada ambiente estarem, em sua maioria, associados às regiões que continham apenas um tipo de marcador, no caso D1(alelo informativo no genitor SV3) e D2 (alelo informativo no genitor 2(12)).

Fato semelhante foi observado por Gazaffi (2009) que utilizou o mapeamento por intervalo composto para mapear QTL em cana-de-açúcar e dentre os 41 efeitos marginais significativos encontrados, 11 estavam associados ao genitor SP80-180 e os demais ao genitor SP80-4966. Também foi observado que as regiões que continham QTL havia apenas um tipo de marcador.

Dentre os nove caracteres mapeados observou-se predominância de ação gênica aditiva, pois, de forma geral, os maiores valores de LOD estavam associados aos efeitos marginais (α_q^* e α_p^*). Dos 57 QTL mapeados, 17 deles apresentaram apenas efeito devido à dominância (δ_{pq}^*) significativo, caracterizando dominância completa (Tabela 19 e 20).

Em relação às fases de ligação, observaram-se diferenças entre os genitores, pois o SV3 apresentou maior quantidade de QTL em associação (17) do que em repulsão (5), enquanto o genitor 2(12) apresentou menor quantidade de QTL em associação (7) do que em repulsão (16).

Embora a população de mapeamento (F_1) seja constituída de 100 indivíduos, as estimativas de R^2 propiciaram identificar QTL de efeito maior, pequeno e moderado. Também foram estimados efeitos marginais e de dominância significativos para todos os caracteres, bem como a direção e a magnitude dos efeitos.

Alwala et al. (2009) afirmam que o sucesso em detectar QTL depende em parte da magnitude dos efeitos dos QTL, da estrutura e do tamanho da população de mapeamento. Para se

fazer bom uso da informação gerada, deve-se atentar para a direção e a magnitude dos efeitos, pois o ganho desejado pode ser em redução em algum fenótipo, como é o caso dos caracteres EC e PC.

O conjunto de QTL identificado neste estudo permitiu identificar QTL específicos para cada ambiente e comuns aos dois, ou com indício de estabilidade. Os QTL localizados em região genômica comum ou sobreposta foram encontrados para CF (4), EC (2), PC (2), PP (2) e SST (4), com a maioria apresentando efeitos marginais e de dominância significativos e de mesma direção.

Conner et al. (1998), estudando macieiras no estágio juvenil, encontraram dez regiões genômicas associadas com incremento em altura de planta, durante três anos, quatro delas foram detectadas em dois anos e seis foram detectadas apenas em um ano. QTL principais para vigor de macieiras foram detectados em apenas um ano. Tah et al. (2010) utilizando o mapeamento por intervalo composto identificaram, usando dados de dois anos, três QTL associados à resistência à pinta preta em cevada e estes QTL foram mapeados na mesma região genômica, em dois ambientes.

Apesar do enorme potencial de marcadores moleculares em programas de melhoramento, a sua aplicação na prática tem sido limitada pela falta de informações sobre a estabilidade de QTL em diferentes ambientes, épocas, colheitas ou anos, dependendo da cultura.

Segundo Mesmmer et al. (2009) para um melhor entendimento sobre o mapeamento de locos quantitativos, é necessário estudá-los em diferentes ambientes e épocas, de modo a estimar o quanto da expressão do QTL é devida à interação com o ambiente e a sua estabilidade. Kenis et al. (2008) mapearam QTL para qualidade de frutos em macieira e sugerem como sendo de extrema importância a necessidade de se confirmar a estabilidade dos QTL mapeados em diferentes locais, anos e populações de mapeamento. Daí sim, a cosegregação de marcadores moleculares poderia ser considerada para a seleção de progênie em programas de melhoramento.

Embora os dados aqui apresentados sejam preliminares, tem-se o indicativo de que existem QTL específicos dentro dos locais avaliados e de comportamento estável, sendo necessária a avaliação destes durante pelo menos mais uma safra para sua validação. Caso se comprove a estabilidade de tais QTL, esta pode servir como ferramenta importante em estratégias de seleção assistida por marcadores, praticando uma seleção dirigida para cada local ou para ambos no caso dos QTL estáveis.

A distribuição dos QTL foi desuniforme havendo grupo de ligação com um QTL (GL-VIII) e outro com 12 QTL (GL-III). Observou-se, de modo geral, que os GL com poucos QTL foram aqueles que detêm mais de 90% de marcadores do tipo D (1 ou 2) no *framework*. Os GL que possuem uma melhor distribuição dos tipos de marcadores (A, B, C e D) apresentaram um maior número de QTL mapeados. Isto é facilmente compreensível visto que a falta de informação de um dos genitores em qualquer GL não permite que os alelos favoráveis para um determinado carácter sejam associados a um QTL. Para evitar a formação de GL com esse perfil, é necessária uma ampla cobertura do genoma, bem como a utilização de marcadores geneticamente mais informativos.

Para todos os caracteres analisados, foram mapeados, em pelo menos uma ocasião, QTL associados à mesma região genômica. No GL-I os QTL para PR e NF foram mapeados na mesma região (Figura 16). No GL-II, QTL para PR e DF, PP e DF e CF e NF foram mapeados em regiões coincidentes (Figura 17). No GL-III, QTL para CF, PC e PP, NF e PR, NF, PR e SST foram também mapeados em regiões coincidentes (Figura 18).

No GL-IV dos dez QTL mapeados, nove deles compartilham da mesma região genômica (Figura 19). No GL-VI (Figura 21), foram observados QTL para NF, PP e PR e CF, DF, PC e PF na mesma região e no GL-IX, foi observado QTL para EC e SST na mesma região genômica (Figura 23).

Um resumo dos QTL mapeados nos mapas de ligação de ambos os locais é apresentado nas Figuras 16 a 23.

Convém lembrar que Moraes (2005) identificou regiões coincidentes em diferentes grupos de ligação contendo QTL para NF, PR, CF, DF e formato do fruto em maracujá-amarelo. A coincidência de QTL aqui detectada tem uma relação direta com o coeficiente de correlação genética dos caracteres, ou seja, os QTL que se sobrepõem apresentam correlações genéticas altas e positivas, exceto o carácter SST que apresenta correlação nula ou negativa com os demais. Isto também foi relatado por Moraes (2005).

Aitken et al. (2006) mapearam QTL para conteúdo de sólidos solúveis totais (SST) e Pol, associados à mesma região genômica. Estes dois caracteres foram avaliados durante dois anos e a correlação genética desses caracteres foi superior a 0,90. Zhang et al. (2010) mapearam, em cerejeira, QTL para peso de fruto, formato e diâmetro de fruto em regiões genômicas coincidentes e estas apresentaram também correlações altas e positivas.

Isso sugere que a mesma região genômica é responsável pelo controle da expressão de vários caracteres, sendo um indício de pleiotropia.

Embora neste estudo tenha sido mapeado um número significativo de QTL o aumento do número de marcadores mais informativos como SSR e SNP poderia fazer com que regiões até então sem QTL fossem mapeadas, bem como melhorar a acurácia e a precisão das estimativas já obtidas, uma vez que marcadores mais informativos melhoram as estimativas da máxima verossimilhança, tanto para a construção do mapa como para a estimativa dos QTL. Também se faz necessário o entendimento da interação QTL $\times$ ambiente. Embora o presente estudo, seja preliminar observaram-se indícios fortes dessa interação.

Figura 16 – Posição dos QTL mapeados no GL-I para os caracteres espessura da casca (EC) número de frutos (NF) e Produção (PR), a = E.E. do Anhembi, d = Descalvado

Figura 17 – Posição dos QTL mapeados no GL-II para os caracteres espessura da casca (EC) número de frutos (NF), produção (PR), peso de polpa (PP), diâmetro do fruto (DF) e comprimento do fruto (CF), a = E.E. do Anhembi, d = Descalvado

Figura 18 – Posição dos QTL mapeados no GL-III para os caracteres peso de casca (PC), número de frutos (NF), produção (PR), peso de polpa (PP), sólidos solúveis totais (SST) e comprimento do fruto (CF), a = E.E. do Anhembi, d = Descalvado

Figura 19– Posição dos QTL mapeados no GL-IV para os caracteres peso de casca (PC), diâmetro do fruto (DF), peso de furto (PF), peso de polpa (PP), sólidos solúveis totais (SST) e comprimento do fruto (CF), a = E.E. do Anhembi, d = Descalvado

Figura 20 – Posição dos QTL mapeados no GL-V para os caracteres peso de polpa (PP) e sólidos solúveis totais (SST), a = E.E. do Anhembi, d = Descalvado

Figura 21 – Posição dos QTL mapeados no GL-VI para os caracteres peso de casca (PC), diâmetro do fruto (DF), peso de furto (PF), número de frutos (NF), peso de polpa (PP), produção (PR) e comprimento do fruto (CF), a = E.E. do Anhembi, d = Descalvado

Figura 22 – Posição dos QTL mapeados no GL-VII para os caracteres peso de casca (PC), diâmetro do fruto (DF) e produção (PR), a = E.E. do Anhembi, d = Descalvado

Figura 23 – Posição dos QTL mapeados nos GL-VIII e GL-IX para os caracteres diâmetro do fruto (DF), produção (PR), espessura de casca (EC) e sólidos solúveis totais (SST) a = E.E. do Anhembi, d = Descalvado

5.CONCLUSÕES

A população F_1 de maracujá-doce, derivada do cruzamento simples entre os acessos SV3 e 2(12), apresenta variabilidade genética suficiente para ser usada em programas de melhoramento;

A utilização da metodologia proposta por Wu et al. (2002a) é adequada para a construção e a integração de mapas de ligação de maracujá-doce, já que se trata de uma espécie não endogâmica;

O método mapeamento por intervalo composto (CIM) se mostra adequado para o mapeamento de QTL em população F_1 de maracujá-doce;

Os genitores SV3 e 2(12) apresentaram, em sua maioria, QTL associados à produção e à qualidade de frutos de maracujá-doce, com efeitos favoráveis e predomínio de ação gênica aditiva;

Existe a necessidade de se desenvolver maior número de marcadores codominantes para *Passiflora*, visando a uma melhor estimativa dos grupos de ligação e das frações de recombinação para a determinação dos grupos de ligação, bem como aumentar o poder de detecção de QTL e estimar seus efeitos.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, K.S.; HERMANN, S.; KARNO, K.; BONNETT, G.D.; MCINTYRE, L.C.; JACKSON, P.A. Genetic control of yield related stalk traits in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 117, n. 7, p. 1191-1203, 2008.
- AITKEN, K.S.; JACKSON, P.A.; MCINTYRE. Quantitative trait loci identified for sugar related traits in a sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivar x *Saccharum officinarum* population. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, p. 1306-1317, 2006.
- ALBERTINI, E.; PORCEDDU, A.; MARCONI, G.; BARCACCIA, G.; PALLOTTINI, L.; FALCINELLI, M. Microsatellite-AFLP for genetic mapping of complex polyploids. **Genome**, Ottawa, v. 46, p. 824-832, 2003.
- ALWALA, S.; KIMBENG, C.A.; VEREMIS, J.C.; GRAVOIS, K.A. Identification of molecular markers associated with sugar-related traits in a *Saccharum* interspecific cross. **Euphytica**, Wageningen, v. 167, p. 127-142, 2009.
- ALWALA, S.; KIMBENG, C.A.; VEREMIS, J.C.; GRAVOIS, K.A. Linkage mapping and genome analysis in a *Saccharum* interspecific cross using AFLP, SRAP and TRAP markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 164, p. 37-51, 2008.
- BARBIN, D. **Componentes de variância: teoria e aplicações**. 2nd ed. Piracicaba. 1993. 120p.
- BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: PINHEIRO, J.B.; CARNEIRO, I.F. (ED.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000. p. 63-224.
- BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FONSECA, K.G.; BRAGA, M.F. Variabilidade genética de acessos obtidos de populações cultivadas e silvestres de maracujazeiro doce com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, p. 197-202, 2009.
- BOKSZCZANIN, K.; DONDINI, L.; PRZYBYLA, A.A. First report on the presence of fire blight resistance in linkage group 11 of *Pyrus ussuriensis* Maxim. **Journal of Applied Genetics**, Austin, v. 50, n. 2, p. 99-103, 2009.
- BROMAN, K.W. Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. **Lab Animal**, New York, v. 30, n. 7, p. 44-52, 2001.
- BRUCKNER, C.H. Perspectivas do melhoramento genético do maracujazeiro. In: MANIACA, I. **Maracujá: temas selecionados (1): melhoramento, morte prematura, polinização, taxionomia**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. p. 25-46.

BRUCKNER, C.H.; SUASSUNA, T. de M.F.; RÊGO, de M.M.; NUNES, E.S. Auto-incompatibilidade do maracujá – implicações no melhoramento genético. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. e BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina; Embrapa Cerrados, 2005. cap. 13, p. 317-338.

BUNDOCK, P.C.; POTTS, B.M.; VAILLANCOURT, R.E. Detection and stability of quantitative trait loci (QTL) in *Eucalyptus globules*. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 4, p. 85–95, 2008.

BURDICK, R.K.; GRAYBILL, F.A. **Confidence intervals on variance components**. New York: Marcel Dekker. 1992. v. 127. 211p.

CAIXETA, E.T., OLIVEIRA, A.C.B. de.; BRITO, G.G. de.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: **Marcadores moleculares**. Viçosa:UFV, 2006. p. 9 – 78.

CARLSON, J.E.; TULSERIAM, 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**, Berlin, v. 83, n. 2, p. 194-200. 1991.

CARNEIRO, M.S.; CAMARGO, L.E.A.; COELHO, A.S.G.; VENCOSKY, 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**, Ottawa, v. 45, n. 4, p. 670-678, 2002.

CAUSSE, M.; CHAIB, J.; LECOMTE, L.; BURET, M.; HOSPITAL, F. Both additivity and epistasis control the genetic variation for fruit quality traits in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 115, n. 3, p. 429-442, 2007.

CERVERA, M.T.; STORME, V.; IVENS, B.; GUSMÃO, J.; LIU, B.H.; HOSTYN, V.; SLYCKEN, J.V.; VAN MONTAGU, M.; BOERJAN, W. Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. **Genetics**, Austin, v. 158, p. 787–809, 2001.

CHAPARRO, J.; BECKMAN, T. Detection of vegetative bud dormancy QTL in peach. **Hortscience**, Alexandria, v. 43, n. 4, p. 1269-1269, 2008.

CHEN, Q.J.; ZHANG, L.Q.; YUAN, Z.W.; YAN, Z.H.; ZHENG, Y.L.; SUN, G.L.; LIU, D.C. Empirical verification of heterogeneous DNA fragments generated from wheat genome-specific SSR primers. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 88, n. 6, p. 1065-1071, 2008.

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

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**, Berlin, v. 96, p. 1027-1035, 1998.

CRUZ, C.D. **Programa genes**: biometria. Viçosa: UFV, 2006. v. 1, 382p.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P. C. S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético: v 1- 3 ed.-Viçosa : UFV, 480p. 2004.

CUCO, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. **Czruologia**, Florence, v. 58, p. 220-228, 2005.

CUNHA, M.A.P.; BARBOSA, L.C. Aspectos botânicos. In: LIMA, A.A. **Maracujá produção: aspectos técnicos**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2002. cap.1, p. 11-14.

CUNHA, M.A.P.; BARBOSA, L.C.; JUNQUEIRA, N.T.V. Aspectos botânicos. In: LIMA, A.A. **Maracujá produção: aspectos técnicos**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2002. cap.1, p. 15-28.

DEMPSTER, A.P.; LAIRD N.M.; RUBIN, D.B. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. **Journal of the Royal Statistical Society, Series B**, v.39, p1-38, 1977.

DILLEN, S.Y.; STORME, V.; MARRON,N.; BASTIEN, C.; NEYRINCK, S.; STEENACKERS, M.; CEULEMANS, R.; BOERJAN, W. Genomic regions involved in productivity of two interspecific poplar families in Europe. 1. Stem height, circumference and volume. **Tree Genetics and Genomes**, Berlin, v. 5, n. 1, p. 147-164, 2009.

DUREL, C.E.; DENANCE, C.; BRISSET, M.N. Two distinct major QTL for resistance to fire blight co-localize on linkage group 12 in apple genotypes 'Evereste' and *Malus floribunda* clone 821. **Genome**, Ottawa, v. 52, n. 2, p. 139-147, 2009.

EISENHART, C. The assumptions underlying the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v.3 , n. 1, p. 1-21, 1974.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T. F. **Introduction to quantitative genetics**. [S.i. :s.n.],1996. 464p.

FAZIO, G.; KVIKLYS, D.; ROBINSON, T. QTL Mapping of root architectural traits in apple rootstocks. **Hortscience**, Alexandria, v. 44, n. 4, p. 986-987, 2009.

FERREIRA, T.G.T.; PENHA, H.A.; ZUCCHI, M.I.; SANTOS, A.A.; HANAI, L.R. JUNQUEIRA, N.; BRAGA, M.F.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Outcrossing rate in sweet passion fruit based on molecular markers. **Plant Breeding**, Berlin, v. 129, p. 1-4, 2010.

FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS. **Agrianual 2004**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo, p.3 59-365. 2004.

FONSECA, K.G. da; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SILVA, M.S.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, K.P.; VAZ, C. de F. Análise da recuperação do genitor recorrente em maracujazeiro-azedo por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 31, n. 1, p. 145-153, 2009.

FREMAN, J.S.; O'REILLY-WAPSTRA, J.M.; VAILLANCOURT, R.E.; WIGGINS, N.; POTTS, B.M. Quantitative trait loci for key defensive compounds affecting herbivory of eucalyptus in Australia. **New Phytologist**, Cambridge, v. 178, p. 846-851. 2008.

FUMIS, T.S.; SAMPAIO, A.C. Aspectos botânicos do maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryand). In: LEONEL, S.; SAMPAIO, A.C. (Ed.). **Maracujá-doce: aspectos técnicos e econômicos**. São Paulo: UNESP, 2007. cap. 2, p. 25-30.

FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores Moleculares. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L.A. (Org.). **Biotecnologia na Agricultura e Agroindústria**. Piracicaba: Guaíba, 2001. v. 1, p. 153-200.

GARDNER, C.O. An evaluation of effects of mass selection and seed irradiation with thermal neutrons on yield of corn. **Crop Science**, Madison p. 124-245, 1961.

GAUDET, M.; JORGE, V.; PAOLUCCI, I.; BERITOGNOLO, I. ; MUGNOZZA, G.S.; SABATTI, M. Genetic linkage maps of *Populus nigra* L. including AFLPs, SSRs, SNPs, and sex trait. **Tree Genetics and Genomes**, Berlin, v. 4, n. 1, p. 25-36, 2008.

GAZAFFI, R. **Desenvolvimento de modelo genético-estatístico para mapeamento de QTL em progênie de irmãos completos, com aplicação em cana-de-açúcar**. 2009. 103 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

GONÇALVES, G.M.; VIANA, A.P.; BEZERRA NETO, F.V. PEREIRA, M.G.; PEREIRA, T.N.S. Seleção e herdabilidade na predição de ganhos genéticos em maracujá-amarelo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 42, n. 2, p. 193-198. 2007.

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

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adeno viruses. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** New York, v. 39, p. 439-446. 1974.

HAN, Y.; CHAGNÉ, D.; GASIC, K.; RIKKERINK, E.H.A. ; BEEVER, J.E. GARDINER, S.E.; KORBAN, S.S. BAC-end sequence-based SNPs and Bin mapping for rapid integration of physical and genetic maps in Apple. **Genomics**, San Diego, v. 93, p. 282-288, 2009.

HAYWARD, M.D.; McADAM, N.J.; JONES, J.G.; EVANS, G.M.; FOSTER, J.W.; USTIN, A.; HOSSIN, K.G.; QUADER, B.; STAMMERS, M.; WILL, J.K. Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses. **Euphytica**, Wageningen, v. 77, n. 3, p. 269 -75, 1994.

IGARASHI, M.; ABE, Y.; HATSUYAMA, Y.; UEDA, T.; FUKASAWA-AKADA, T.; KON, T.; KUDO, T.; SATO, T.; SUZUKI, M. Linkage maps of the apple (*Malus X domestica* Borkh.) cvs 'Ralls Janet' and 'Delicious' include newly developed EST markers. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 22, p. 95–118, 2008.

JANSEN, R.C. A general Monte Carlo method for mapping multiple quantitative trait loci. **Genetics**, Austin, v. 192, p. 305-311, 1996.

JANSEN, R.C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. **Genetics**, Austin, v. 135, p. 205-211, 1993.

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

JIANG, C.; ZENG, Z-B. Mapping quantitative trait loci with dominant and missing markers in various crosses from two inbred lines. **Genetica**, Dordrecht, v. 101, p. 47-58.

JUNQUEIRA, K.P.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BELLON, G.; RAMOS, J.D.; BRAGA, M.F. ; SOUZA, L.S. Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora* por meio de Marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, p. 191-196, 2008.

JUNQUEIRA, N.T.V.; PEIXOTO, J.R.; BRANCHER, A.; JUNQUEIRA, K.P.; FIALHO, J. de F. Melhoramento genético do maracujá-doce. In: MANICA, I.; BRANCHER, A.; SANZONOWICZ, C.; ICUMA, I.M.; AGUIAR, J.L.P.; AZEVEDO, J.A.; VASCONCELLOS, M.A.S.; JUNQUEIRA, N.T.V. **Maracujá-doce: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2005. cap. 4, p. 39-46.

KAO, C-H.; ZENG, Z-B.; TEASDALE, R. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, Austin, v. 152, p. 1023-1216, 1999.

KEMPTHORNE, O.; CURNOW, R.N. The partial diallel cross. **Biometrics**, Washington, v. 17, p. 229-250, 1961

KENIS, K.; KEULEMANS, J.; DAVEY, M.W.; Identification and stability of QTL for fruit quality traits in apple. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 4, p. 647-661, 2008.

KNAPP, S.P.; STROUP, W.W.; ROSS, W.M. Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. **Crop Science**, Madison, v. 25, n. 1, p. 192-194, 1985.

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distance from recombination values. **Annuaire of Eugenetics**, v. 12, p. 172-175, 1944.

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

LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHANSON, 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**, San Diego, v. 1, p. 174-181, 1987.

LANTERI, S.; ACQUADRO, A.; COMINO, C.; MAURO, R.; MAUROMICALE, G.; PORTIS, E. A first linkage map of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) based on AFLP, S-SAP, M-AFLP and microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, p. 1532-1542, 2006.

LEE, H.R.; BAE, I.H.; PARK, S.W.; KIM, H.J.; MIN, W.K.; HAN, J.H.; KIM, K.T.; KIM, B.D. Construction of an integrated pepper map using RFLP, SSR, CAPS, AFLP, WRKY, rRAMP, and BAC end sequences. **Molecules and Cells**, Seoul, v. 27, n. 1, p. 21-37, 2009.

LIN, M.; LOU, X.Y.; CHANG, M.; WU, R. A general statistical framework for mapping quantitative trait loci in nonmodel systems: Issue for characterizing linkage phases, **Genetics**, Austin, v. 165, p. 901-913, 2003.

LIN, Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.; GUO, X. A high-density integrative linkage map for *Gossypium hirsutum*. **Euphytica**, Wageningen, v.166, p.35-45, 2009.

LITT, M.; LUTY, L.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, p. 398-401, 1989.

LOPES, R. Mapas de ligação AFLP e identificação de genes de resistência à *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em maracujá-amarelo. 2003. 126 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; CARNEIRO, M.S.; MATTA, F. de P.; CAMARGO, L.E.A.; VIEIRA M. L. C. Linkage and mapping of resistance genes to *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in yellow passion fruit. **Genome**, Ottawa, v. 49, n. 1, p. 17-29. 2006.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer, 1998, 980 p.

MALIEPAARD, C.; JANSEN, J.; VAN OOIJEN, J.W. Linkage analysis in a full-sib family of outbreeding plant species: Overview and consequences for applications. **General Research**, London, v. 70, p. 237-250, 1997.

- MANICA, I.; OLIVEIRA Jr., M.E. de. Maracujá no Brasil. In: MANICA, I.; BRANCHER, A.; SANZONOWICZ, C.; ICUMA, I.M.; AGUIAR, J.L.P.; AZEVEDO, J.A.; VASCONCELLOS, M.A. S.; JUNQUEIRA, N.T.V. **Maracujá-doce: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2005. cap. 1, p. 11-26.
- MANTOVANI, P.; MACCAFERRI, M.; SANGUINETI, M.C.; TUBEROSA, R.; CATIZONE, I.; WENZL, P.; THOMSON, B.; CARLING, J.; HUTTNER, E.; DEAMBROGIO, E.; KILIAN, A. An integrated DArT-SSR linkage map of durum wheat, **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 22, p. 629–648, 2008.
- MARGARIDO, G.R.A.; SOUZA, A.P.; GARCIA, A.A.F. One Map: software for genetic mapping in outcrossing species. **Hereditas**, Lund v. 144, p. 78-79, 2007.
- MATTA, F.P. **Maapeamento de QRL para *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae* em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. 2005. 230p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2005.
- MELETTI, L.M.M. Comportamento de híbridos e seleções de maracujazeiro (*Passifloraceae*) In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6. 2003, Campos dos Goytacazes, **Palestras...** Campos dos Goytacazes: Cluster Informática, 2003. 1 CD-ROM.
- MELETTI, L.M.M.; BRUCKNER, C.H. Melhoramento genético. In: BRUCKNER, C.H e PICANÇO, M.C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. cap.13, p. 345-386.
- MELETTI, L.M.M.; MAIA, M.L. **Maracujá: produção e Comercialização**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1999. 62 p. (Boletim Técnico, 181).
- MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOT, M.D.; PINTO-MAGLIO, C.A.F.; MARTINS, F.P. Caracterização de germoplasma de maracujazeiro (*Passiflora* sp). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 14, n. 2, p.1 57-62, 1992.
- MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; MARTINS, F.P. Caracterização de germoplasma de *Passiflora*. *P. amethystina* e *P. cincinnata*, In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS. 1997. Campinas. **Anais...** Campinas: IAC, 1997. p. 73-74.
- MELO, N.F.; CERVI, A.C.; GUERR, M. Kariology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (*Passifloraceae*). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 226, p. 69-84, 2001.
- MESSMER, R.; FRACHEBOUD, Y.; BANZIGER, M.; VARGAS, M.; STAMP, P.; RIBAUT, J-M. Drought stress and tropical maize: QTL-by-environment interactions and stability of QTL across environments for yield components and secondary traits. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 119, p. 913-930, 2009.

MOLLINARI, M.; MARGARIDO, G.R.A.; VENCovsky, R.; GARCIA, A.A.F. Evaluation of algorithms used to order markers on genetic maps. **Heredity**, London, v. 103, p. 494–502, 2009.

MORAES, M.C. **Mapas de ligação e mapeamento de QTL (Quantitative Trait Loci) em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. 2005. 141p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MORAES, M.C.; GERALDI, I.O.; MATTA, F.P.; VIEIRA, M.L.C. Genetic and phenotypic parameter estimates for yield and fruit quality traits from a single wide cross in yellow passion fruit. **HortScience**, Alexandria, v. 40, n. 7, p. 1978-1981, 2005.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with non-repetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, New York, v. 30, p. 194–200, 2002.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 115, p. 335-350, 1987.

MYBURG, A.A.; GRIFFIN, A.R.; SEDEROFF, R.R.; WHETTEN R.W. Comparative genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* and their F₁ hybrid based on a double pseudo-backcross mapping approach. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 107, p. 1028-1042, 2003.

NEGREIROS, J.R.S.; ARAÚJO NETO, S.E.; ÁLVARES, V.S.; LIMA, V.L.; OLIVEIRA, T. K. Caracterização de frutos de progênies de meios-irmãos de maracujazeiro-amarelo em Rio Branco - Acre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 431-437, 2008.

NIRENBERG, M.; MATTHAEI, J.H. Dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.47, p.1588-1602, 1961.

NUNES, E.S. **Seleção entre e dentro de famílias de irmãos completos de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*)**. 2006. 85f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, MG, 2006.

OLIVEIRA, E.J.; GARCIA, A.A.F.; MUNHOZ, C.F.; MARGARIDO, G.R.A.; CONSOLI, L.; MATTA, F.P.; MORAES, M.C.; ZUCCHI, M.I.; FUNGARO, M.P.H.; VIEIRA, M.L.C. An integrated genetic map of yellow passion fruit based on simultaneous maximum-likelihood estimation of linkage and linkage phases. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 133, p. 35–41, 2008.

OLIVEIRA, J.C., FERREIRA, F.R. Melhoramento genético do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R. **A cultura do maracujá no Brasil**. Vitória da Conquista-BA: UESB, 1991. p 211-239.

- OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, F.R. Variações observadas em frutos de *Passiflora alata* Ait. **Proceedings of the Tropical Region American Society for Horticultural Science**, Campinas, v. 25, p. 343-345, 1982.
- OYANT, L.H.S.; CRESPEL, L.; RAJAPAKSE, S.; ZHANG, L.; FOUCHER, F. Genetic linkage maps of rose constructed with new microsatellite markers and locating QTL controlling flowering traits. **Tree Genetics and Genomes**, Berlin, v. 4, p. 11-23, 2008.
- PHILIPP, U.; WEHLING, P.; WRICKE, G. A linkage map of rye. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 88, p. 243-238. 1994.
- PIPERIDIS, N.; JACKSON, P.A.; D'HONT, A.; BESSE, P.; HOARAU, J-Y ; COURTOIS, B.; AITKEN, K.S.; MCINTYRE, C.N. Comparative genetics in sugarcane enables structured map enhancement and validation of marker-trait associations. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 21, n. 2, p. 233-247, 2008.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2009. Disponível em: <http://www.R-project.org> Acesso: 13 maio. 2008.
- RAMALHO, M.A.P. **Eficiência relativa de alguns processos de seleção intrapopulacional no milho baseados em famílias não endógamas**. Piracicaba: ESALQ, 1977. 121p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1977.
- RITTER, E.; GEBHARDT, C.; SALAMINI, F. Estimation of recombination frequencies and construction of linkages maps from crosses between heterozygous parents. **Genetics**, Austin, v. 125, p. 645-654. 1990.
- RITTER, K.B.; JORDAN, D.R.; CHAPMAN, S.C.; GODWIN, I.D.; MACE, E.S.; McINTYRE, C.L. Identification of QTL for sugar-related traits in a sweet x grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) recombinant inbred population. **Molecular Breeding**, Dordrecht v. 22, p. 367-384, 2008.
- SAKAMOTO, Y.; ISHIGURO, M.; KITAGAWA, G. **Akaike information criterion statistics**. Tokyo: KTK Scientific Publishers, 1986, 290 p.
- SANGER, F. Croonian lecture, 1975- nucleotide-sequences in DNA. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, Great Britain, v. 191, p. 317-333, 1975.
- SANTOS, P.G.; SOARES, A.A.; RAMALHO, M.A.P. Predição do potencial genético de populações segregantes de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 4, p. 659-670, 2001.
- SATTERTHWAITE, R.E. An approximate distribution of estimates of variance components. **Biometrics**, Washington, v. 2, n. 6, p. 110-114, 1946.

SAVAZAKI, E.T. A cultura do maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryand) no Estado de São Paulo (compact disc) In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., 2003, Campos dos Goytacazes, **Palestras...** Campos do Goytacazes: Cluster Informática, 2003. p. 34- 56.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa: UFV, 2004. 568p.

SCHWARZ, G. Estimate the dimension of a model, **Annals of Statistics**, Hayward, v. 6, p. 461-464, 1978.

SHEPHERD, M.; KASEM, S.; LEE, D.J.; HENRY, R. Mapping species differences for adventitious rooting in a *Corymbia torelliana* x *Corymbia citriodora* subspecies variegata hybrid. **Tree Genetics and Genomes**, Berlin, v. 4, n. 4, p. 715-725, 2008.

SILVA, M.G. de M.; VIANA, A.P.; GONÇALVES, G.M.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; PERERIA, M.G. Seleção recorrente intrapopulacional no maracujazeiro amarelo: Alternativa de capitalização de ganhos genéticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 170-176, 2009.

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequence among DNA fragments separated by electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 98, p. 503-517, 1975.

SOUZA, M.M.; PALOMINO, G.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; VIANA, A.P. Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species. **Hereditas**, Lund, v. 141, p. 31-38, 2004.

STOECKLI, S.; MODY, K.; PATOCCHI, A.; KELLERHALS, M.; DORN, S. Rust mite resistance in apple assessed by quantitative trait loci analysis. **Tree Genetics and Genomes**, Berlin, v. 5, n. 1, p. 257-267, 2009.

STOREY, J.D.; TIBSHIRANI, R. Statistical significance for genomewide studies. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 5, p. 9440-9445. 2003.

STUBER, C.W. Biochemical and molecular markers in plant breeding. **Plant Breed Reviews**, Westport, v. 9, p. 37, 1992.

TAH, P.R.; LEHMENSIEK, A.; FOX, G.P.; MACE, E.; SULMAN, M.; BLOUSTEIN, G.; DAGGARD, G.E. Identification of genetic regions associated with black point in barley. **Field Crops Research**, Amsterdam v. 115, p. 61-66, 2010.

TANKSLEY, S.D.; RICK, C.M. Isozymic gene linkage map of the tomato: Applications in genetics and breeding. **Theoretical and Applied Genetics**. Berlin, v. 58, n. 2, p. 161-170, 1980.

TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review Genetics**, Palo Alto, v.27, p.205-233, 1993.

TRUCO, M.J.; ANTONISE, R.; LAVELLE, D.; OCHOA, O.; KOZIK, A.; WITSENBOER, H.; FORT, S.B.; JEUKEN, M.J.W.; KESSELI, R.V.; LINDHOUT, P.; MICHELMORE, R.W.; PELEMAN, J. A high-density, integrated genetic linkage map of lettuce (*Lactuca* spp.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.115, p.735–746, 2007.

VALLEJOS, C.E.; CHASE, C.D. Extended linkage map for the phaseolin linkage group of *Phaseolus vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 82, p. 353-357, 1991.

VALLEJOS, C.E.; SAKIYAMA, N.S. CHASE, C.D. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. **Genetics**, Austin, v. 131, p. 733–740. 1992.

VAN EIJK, M.; DE RUITER, M.; BROEKHOF, J.; PELEMAN, J. Discovery and detection of polymorphic microsatellites by microsatellite-AFLP. In: PLANT & ANIMAL GENOME IX, 10, 2001, San Diego. **Anais...** San Diego: IGGI, 2001. p. 143.

VASCONCELLOS, M. A. S., CEREDA, C. Cultivo do maracujá doce. In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.) **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista: UESB, 1994. cap. 8, p.71-83.

VENCOVSKY, R. Herança quantitativa. In: PATERNIANI, E. (Coord.). **Melhoramento e produção de milho no Brasil**. Piracicaba: Fund. Cargill, 1987. p. 1370-0214

VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; AMARAL JÚNIOR, A.T. do ; SOUZA, M.M. de; MALDONADO, J.F.M. Parâmetros genéticos em populações de maracujazeiro-amarelo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 51, n. 297, p. 541-551, 2004.

VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; SOUZA, M.M. de ; MALDONADO, J.F.M.; AMARAL JÚNIOR, A.T. do. Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas determinadas por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 489-493, 2003a.

VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; SOUZA, M.M. de; MALDONADO, J.F.M.; AMARAL JÚNIOR, A.T. Genetic diversity in yellow passion fruit populations. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 6, p. 87-94. 2006.

VIANNA, A.P.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; SOUZA, M.M. de; MALDONADO, J.F.M.; AMARAL JÚNIOR, A.T.T. Simple and canonic correlation between agronomical and fruit quality traits in yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 3, n. 2, p. 133-140, 2003b.

VIEIRA, M.L.C.; CARNEIRO, M.S. *Passiflora* spp. Passionfruit. In: LITZ, R.E. (Ed.). **Biotechnology of fruit and nut crops**. Oxford: CABI Publishing, 2004. p. 435-453.

VOS, P.; HAOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJAMS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRITJERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, p. 4407-4414. 1995.

- WANG, S.; BASTEN, C.J.; ZENG, Z.B. **Windows QTL Cartographer: Version 2.5**. Department of Statistics, North Carolina State University, North Caroline: Raleigh, 2007.
- WATSON, J.D.; CRICK, F.H.C. A structure for desoxyribose nucleic acids. **Nature**, London, v. 171, p. 737-738, 1953.
- WELLER, J.L. Maximum likelihood techniques for the mapping and analysis of quantitative trait loci with the aid of genetic markers. **Biometrics**, Washington, v. 42, p. 627-640, 1986.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELICK, 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**. Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WOOLBRIGHT, S.A.; DIFAZIO, S.P.; YIN, T.; MARTINSEN, G.D.; ZHANG, X.; ALLAN, G.J.; WHITHAM, T.G.; KEIM, P. A dense linkage map of hybrid cottonwood (*Populus fremontii* x *P. angustifolia*) contributes to long-term ecological research and comparison mapping in a model forest tree. **Heredity**, London, v. 100, p. 59-70, 2008.
- WU, R. L.; CHANG-XING, M. Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species . **Theoretical Population Biology**, New York, v. 61, p. 349-363. 2002a.
- WU, R.; MA, C.X.; WU, S.S.; ZENG, Z.B. Linkage mapping of sex-specific differences. **Genetical Research**, London, v. 79, p. 85-96, 2002b.
- YIN, T.M.; DIFAZIO, S.P.; GUNTER, L.E.; RIEMENSCHNEIDER, D.; TUSKAN, G.A. Large-scale heterospecific segregation distortion in *Populus* revealed by a dense genetic map. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 109, p. 451-463, 2004.
- ZENG, Z-B. Theoretical basis of separation of multiple linked gene effects on mapping quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy Science**, Washington, v. 90, p. 10972-10976, 1993.
- ZENG, Z-B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, Austin, v. 136, p. 1457-1468, 1994.
- ZHANG, G.; SEBOLT, A.M.; SOORIYAPATHIRANA, S.S.; WANG, D.; BINK, M. CAM.; OLMESTEAD, J.W.; IEZZONI, A.F. Fruit size QTL analysis of an F₁ population derived from a cross between a domesticated sweet cherry cultivar and a wild forest sweet cherry. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 6, p. 25-36, 2010.