**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*) associados à resposta
do maracujá-doce à bacteriose usando a abordagem de modelos
mistos**

Cassia Renata Pinheiro

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

**Piracicaba
2015**

Cassia Renata Pinheiro
Engenheira Agrônoma

**Mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*) associados à resposta do
maracujá-doce à bacteriose usando a abordagem de modelos mistos**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Pinheiro, Cassia Renata

Mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*) associados à resposta do maracujá-doce à bacteriose usando a abordagem de modelos mistos / Cassia Renata Pinheiro. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015. 122 p. : il.

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

1. *Passiflora alata* 2. *Xanthomonas axonopodis* 3. Mapeamento genético 4. Locos quantitativos I. Título

CDD 634.425
P654m

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

*A Deus que sempre ouve e atende minhas orações, confortando
minha mente e meu coração e*

*À minha família que, mesmo longe, sempre esteve tão perto,
dedico.*

*Aos meus amigos,
verdadeiros e leais,
ofereço.*

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela estrutura, oportunidade e excelência do ensino.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo e suporte financeiro ao projeto.

À Profa. Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira, pela orientação, paciência, ensinamentos e oportunidade.

Aos professores e alunos do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ, pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Doutorando João Ricardo Bachega Feijó Rosa pela prestatividade, pelos ensinamentos e contribuição indispensável nas análises estatísticas.

Ao Dr. Marcelo Fideles Braga (Embrapa Cerrados) pelo auxílio na condução do trabalho e conhecimentos compartilhados;

À minha família, pelo seu amor incondicional, compreensão pela distância, e apoio em todos os momentos da minha vida.

A Mozart e à Florisbella Pinheiro, companheiros de lágrimas e sorrisos, fonte de alegria e certeza de amor incondicional ao fim de cada dia.

Ao amigo Carlos Alberto de Oliveira pela amizade, paciência e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular de Plantas Cultivadas: Alessandra, Anselmo, Augusto, Bruno, Carla, Carmelice, Guilherme, Helen, Lourdes, Luciane, Luiz e Zirlane, pelo aprendizado mútuo e convívio sempre agradável.

Às minhas amigas especiais: Brenda Neves, Carol Santos, Daniele Cardoso, Gabrielen Dias, Glacy Silva, Ingrid Heimbek, Mirele Cavalcante, Nádia Campos e Tatiana Costa, por estarem sempre presentes, me apoiando e fortalecendo.

Aos amigos de Piracicaba Alexandre, Carol, Devair, Isaías e Rodrigo, por tornarem os dias mais agradáveis.

Aos amigos mineiros Mariza e Carlos Alberto, pelo estímulo e positividade.

À Marcos Xavier pelo carinho, companheirismo e apoio, mas, principalmente, por estar ao meu lado de forma singular e especial.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 A cultura do maracujazeiro-doce	17
2.2 Interação <i>Xanthomonas axonopodis</i> -hospedeiro	24
2.3 Mapeamento de QTL (<i>Quantitative Trait Loci</i>) visando à resistência genética a bactérias fitopatogênicas.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 População de Mapeamento	37
3.2 Seleção dos isolados bacterianos.....	38
3.3 Procedimentos para a inoculação bacteriana	38
3.4 Quantificação das áreas foliares	39
3.5 Análise estatística dos dados.....	40
3.6 Variância genética e herdabilidade	43
3.7 Mapa de ligação.....	44
3.8 Detecção de QTLs associados à resposta à <i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	46
4 RESULTADOS.....	51
4.1 Condições ambientais.....	51
4.2 Reação dos genótipos de maracujazeiro-doce à inoculação bacteriana	52
4.3 Análise estatística dos dados.....	56
4.4 Variância genética e herdabilidade	83
4.5 Detecção de QTL associados à resposta à <i>X. axonopodis</i>	84
5 DISCUSSÃO.....	95
6 CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS.....	109
ANEXOS	119

RESUMO

Mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*) associados à resposta do maracujá-doce à bacteriose usando a abordagem de modelos mistos

O maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) é uma espécie de cruzamento e diploide ($2n = 18$) que vem se destacando no Brasil por alcançar melhores cotações no mercado de frutas. Apesar disso, é sensível às adversidades em monocultura, sendo extremamente afetada por variações climáticas, pragas e doenças, dentre elas, a bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. O patógeno é endêmico no país, apresentando considerável variabilidade genética nas populações naturais. O presente trabalho teve como objetivo contribuir para o melhoramento genético do maracujazeiro-doce por meio do mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*) relacionados à resistência à bacteriose de uma população F₁ segregante, composta de 100 indivíduos e oriunda do cruzamento simples entre dois acessos não endogâmicos. A população foi mantida em casa de vegetação, em delineamento em blocos ao acaso, e foi inoculada com três isolados bacterianos, M129, PA8-2 e AP302, durante 2010, 2012 e 2013, respectivamente. Aos 14 dias após a inoculação, as folhas foram fotografadas e a partir das imagens digitalizadas foram mensuradas as áreas: sadia, de clorose, necrose e lesão (soma das áreas de clorose e necrose), além da área total da folha. Inicialmente, foi realizada uma análise exploratória dos dados e subsequentemente foram selecionados os caracteres área de necrose e de lesão foliar para fins de mapeamento de QTL. Para tanto foi usada uma estratégia desenvolvida para a detecção de QTL em F₁ segregantes, com base em modelos mistos, considerando diferentes estruturas de variância e covariância, visando explicar os padrões de variação existentes. A herdabilidade variou de 14% a 64% para o caráter necrose, e se manteve estável (28%) para o caráter área de lesão, nos três anos de avaliação. Com base em um mapa de ligação integrado previamente construído, foi realizado o mapeamento de QTL por intervalo composto. Foram identificados 20 QTL, sendo 9 deles referentes à necrose e 11 referentes à lesão. Os efeitos individuais variaram de 0,2% a 15,7%, sendo que dois QTL de maior efeito ($R^2 = 15,7\%$) foram identificados em resposta ao isolado PA8-2, um localizado no grupo de ligação III e o outro no IV do mapa genético integrado do maracujazeiro-doce. Essas informações, aliadas a outros estudos relacionados à produção de frutos, devem contribuir para o melhoramento do maracujazeiro-doce.

Palavras-chave: *Passiflora alata*; *Xanthomonas axonopodis*; Mapeamento genético; Loci quantitativos

ABSTRACT

QTL mapping (*Quantitative Trait Loci*) associated with sweet passion fruit response to bacterial leaf spot using mixed models

The sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis) is an outcrossing and diploid ($2n = 18$) species that is achieving a competitive advantage in the fruit markets in Brazil. Nevertheless, the crop is sensitive to monoculture, being greatly affected by weather changes, pests and diseases, among them the bacterial disease caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. The pathogen is endemic in the country, with considerable genetic variability in natural populations. The present study aimed to contribute to genetic improvement of sweet passion fruit through QTL (*Quantitative Trait Loci*) mapping associated with bacterial resistance using a F_1 segregating population containing 100 individuals, which resulted from a single cross between two outbred accessions. The population was kept in a greenhouse, arranged in a randomized block design, and inoculated with three bacterial isolates, M129, PA8-2 and AP302, during 2010, 2012 and 2013, respectively. At 14 days after inoculation, the inoculated leaves were photographed, and the following areas from the scanned images were measured: healthy, with chlorosis, necrosis and leaf lesion (sum of the areas with chlorosis and necrosis), in addition to the total area of the leaf. Initially all data were investigated through an exploratory analysis and those relative to necrotic and leaf lesion areas were subsequently used for QTL mapping. For that we used a strategy developed for QTL detection in F_1 segregating populations based on composite interval mapping and mixed models considering different variance and covariance structures in order to explain the existing patterns of variation. Heritabilities ranged from 14% to 64% for the trait necrosis, and remained stable (28%) for the trait leaf lesion for the three years of evaluation. Based on an integrated linkage map previously constructed, we performed a composite interval mapping of QTL. Twenty QTL were identified, 9 of them related to necrosis and 11 related to the leaf lesion. The individual effects ranged from 0,2% to 15,7%, and two large-effect QTL ($R^2 = 15,7\%$) were identified in response to isolate PA8-2, one assigned to linkage group III and other to linkage group IV of the integrated genetic map of sweet passion fruit. This information combined with other studies related to fruit production may contribute to sweet passion fruit breeding.

Keywords: *Passiflora alata*; *Xanthomonas axonopodis*; Genetic mapping; Quantitative loci

1 INTRODUÇÃO

Passiflora é o gênero mais numeroso da família Passifloraceae, contendo cerca de 520 espécies, sendo esta estimativa variável na literatura devido à inclusão de novas espécies (WETZEL et al., 2011). O Brasil é considerado um dos principais centros de origem das passifloras, pois abriga aproximadamente 150 espécies tropicais e subtropicais (BERNACCI et al., 2013), dentre elas incluem-se o maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims) e o maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). Estas espécies se destacam principalmente no mercado de frutas *in natura* devido às características peculiares de seus frutos como aroma, sabor, presença de vitaminas A, C e do complexo B, além de uma boa quantidade de sais minerais, destacando o ferro, sódio, cálcio e fósforo (LIMA, 2002). Cabe informar que a maior parte da produção de frutos é destinada à indústria de sucos concentrados (SEBRAE, 2014). Algumas espécies do gênero *Passiflora* também são conhecidas tradicionalmente por seu uso como ansiolítico e sedativo (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004), entretanto, apenas *P. alata* é citada pela revista Farmacopéia Brasileira, sendo constituinte de diversos medicamentos fitoterápicos comercializados no Brasil (ANVISA, 2012). Embora o maracujá-doce ainda não seja tão difundido quanto o maracujá-azedo, ele vem se destacando no cenário nacional, ganhando cada vez mais importância dentro do mercado de frutas *in natura*, uso fitoterápico e em projetos paisagísticos (veja: DA CONCEIÇÃO et al., 2011; FALEIRO et al., 2011; NORIEGA et al., 2011; PROVENSI, 2007).

A produção brasileira de maracujá em 2013 foi de 838.244 toneladas, numa área de 58.089 ha (IBGE, 2015). O estado da Bahia é o maior produtor de maracujá sendo responsável por cerca da metade da produção brasileira. Esta expansão é consequência da lavoura gerar renda em áreas relativamente pequenas e oferecer um rápido retorno dos investimentos aos produtores rurais.

Em monocultura, a lavoura de maracujá tem sido fortemente ameaçada durante o seu desenvolvimento por doenças de etiologia viral, fúngica e bacteriana. No Brasil, um dos seus principais agressores é a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* causadora da bacteriose do maracujazeiro, sendo comum a destruição total de pomares (JUNQUEIRA et al., 2005), principalmente em condições de alta temperatura, com precipitação intensa, clima típico das regiões produtoras, propiciando condições ideais para o desenvolvimento e a dispersão da doença nos

pomares. A severidade da doença causa enorme dano à produção de frutos. Por se tratar de uma doença foliar, o uso de suas folhas como matéria prima farmacêutica fica totalmente comprometida (ZUIN; YARIWAKE; BICCHI, 2001).

Uma alternativa para a melhoria das lavouras seria o desenvolvimento de cultivares melhoradas que aliassem resistência e alta produtividade; dessa forma a renda do produtor não seria afetada pelas perdas devido à doença, além de solucionar os problemas relacionados à segurança alimentar, já que o uso de defensivos seria diminuído e conseqüentemente a produção de frutos teria menores teores de resíduos nocivos. Para tanto, estudos genéticos são necessários com o intuito de conhecer a herança da resistência e a agressividade de isolados do patógeno e assim desenvolver a melhor estratégia a ser seguida em um programa de melhoramento. Seguindo por esse caminho, estudos realizados por Lopes et al., 2006 indicaram que a herança da resistência à bacteriose é oligogênica, ou seja, trata-se de uma característica de herança complexa que necessita ser melhor compreendida.

Nesse contexto, a construção de mapas de ligação, com base em marcadores moleculares, aliado ao mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*), são tecnologias que otimizam o trabalho do melhorista, permitindo elucidar a estrutura genética e aprimorar o conhecimento sobre o número de locos que atuam no controle dos caracteres quantitativos, sua distribuição no genoma e a intensidade de seus efeitos.

Entretanto, para espécies em que é praticamente inviável se obter linhagens endogâmicas, como o maracujazeiro-doce, devido à autoincompatibilidade, as análises de ligação são mais complexas, sendo realizadas em progênies de irmãos completos obtidos do cruzamento simples entre indivíduos não endogâmicos. A população gerada por esse procedimento (dita F_1 segregante) apresenta uma mistura de diferentes padrões de segregação para os locos marcadores (WU et al., 2002a); neste caso, também se desconhece a fase de ligação entre os marcadores, o que dificulta a construção de mapas genéticos e o mapeamento de QTL (LIN et al., 2003).

Métodos estatísticos têm sido propostos para contornar esse problema; assim WU et al., (2002a) propuseram um método baseado em máxima verossimilhança que permite estimar simultaneamente a fração de recombinação e as fases de ligação entre diferentes tipos de marcadores, sendo que esta abordagem foi

expandida (WU et al., 2002b) para o contexto multiponto, permitindo utilizar a informação de todos os marcadores em um mesmo grupo de ligação e, conseqüentemente, aumentar a precisão das estimativas. A disponibilidade de um mapa em que as fases de ligação foram estimadas adequadamente é importante para o mapeamento de QTL pois permite a aplicação de uma abordagem mais precisa para a estimação das fases de ligação entre marcadores e QTL.

A primeira população de maracujazeiro-doce gerada para a construção de mapas de ligação e o mapeamento de QTL foi obtida por Nunes (2010), sendo composta por 180 indivíduos provenientes do cruzamento entre dois acessos divergentes. No trabalho de Nunes (2010), foi construído um mapa genético compilando 322 marcadores (298 AFLP, 4 M-AFLP e 20 SSR), alocados em nove grupos de ligação, com comprimento total de 1.725,3 cM e distância média entre as marcas de 5,37 cM. Este mapa foi posteriormente enriquecido (LAPERUTA, 2011), passando a alocar 429 marcadores, (248 AFLP, 106 M-AFLP, 69 SSR, 5 RGA e 1 SNP), apresentando um comprimento total de 1786,11 cM e distância média entre as marcas de 4,16 cM. Ainda visando à melhoria do mapa genético, Pereira et al., (2013) acrescentaram mais marcadores que passou a conter 549 marcadores (376 AFLP, 115 M-AFLP, 51 SSR, 5 RGA, 1 SSR-SSCP e 1 SNP), alocados em nove grupos de ligação, com comprimento total de 2073,0 cM e distância média entre os marcadores de 3,8 cM. O autor ressalta que o mapa gerado tem boa cobertura para o mapeamento de QTL e que a população de mapeamento foi proveniente do cruzamento de dois acessos que diferiam na resposta à inoculação por *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (veja (MUNHOZ et al., 2011), tornando-a promissora para estudos que explorem fontes de resistência.

Com essa mesma população foram realizados estudos de mapeamento de QTL relacionados à produção e qualidade dos frutos, sendo avaliados os caracteres número de frutos por parcela, peso, comprimento e diâmetro médio de frutos, espessura e peso médio da casca, peso médio da polpa e teor de sólidos solúveis totais. Para tal, Nunes (2010) e Laperuta (2011) avaliaram 100 genótipos dessa população em dois ambientes sendo que o mapeamento de QTL foi realizado usando o método de mapeamento por intervalo composto (CIM).

Braga (2011) estudando essa mesma população, identificou QTL associados à reposta à infecção por *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Um total de 26 QTL foi

identificado, sendo que a proporção da variação fenotípica (R^2) explicada pelos QTL variou de 0,8% a 16,7%.

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi dar continuidade ao estudo realizado por Braga (2011), visando avaliar a resposta da mesma população (F_1 segregante) em dois anos subsequentes, com a finalidade de identificar genótipos superiores. Para tal, foram usados dois isolados bacterianos denominados AP302 e PA8-2. Posteriormente à infecção, foram geradas imagens digitalizadas para mensurar as áreas foliares afetadas. Daí procedeu-se ao mapeamento de locos quantitativos associados à área de necrose e de lesão foliar com base no mapa de ligação gerado por Pereira et al. (2013) e a abordagem de modelos mistos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do maracujazeiro-doce

A espécie *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae), conhecida como maracujazeiro-doce, pertence ao subgênero *Passiflora*. Dentro do gênero, é a segunda espécie de importância econômica no Brasil, particularmente no Estado de São Paulo; sua importância econômica é crescente devido ao seu potencial em atender às várias opções de mercado, incluindo o segmento ornamental, a indústria farmacêutica e o mercado de frutas frescas (MANICA et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2005). Os frutos de maracujá-doce apresentam preços que chegam a ser três vezes superiores aos de maracujá-azedo (Figura 1), fato que tem atraído a atenção de alguns produtores (CEASA, 2014).

Figura 1 – Preços de maracujá-doce e maracujá-azedo comercializados no CEASA de Campinas, SP
Fonte: CEASA

O maracujazeiro-doce é uma vinha escandente, glabra, com caule quadrangular de arestas aladas (Figura 2a). Possui gavinhas axilares robustas, estípulas lanceoladas, pecíolos com 2 a 4 glândulas e folhas ovadas inteiras (7 a 15 cm de comprimento e 5 a 10 cm de largura). Os botões florais são pilosos e as flores são grandes (10 a 12 cm de diâmetro) (Figura 2b), com sépalas e pétalas de cor carmim na face adaxial e coroa com filamentos bandeados de branco e roxo. Os frutos são ovóides, obovoides, oblongos ou piriformes de coloração amarela a laranja (Figura 2c), quando maduros, com massas entre 95,97 e 331,83 g (ALVES et al., 2012). As sementes são cordadas e faveoladas, em geral, de 7 a 8 mm de

comprimento (BERNACCI et al., 2013), e são encontradas uma média de 263 sementes por fruto (MARTINS et al., 2003). O arilo é sucoso, de coloração bege e de sabor doce, com baixa acidez. Ainda segundo Bernacci e colaboradores (2013), é uma espécie heliófita e seletiva higrófito, que ocorre principalmente em capoeiras e restingas litorâneas, sendo raramente encontrada em orlas de florestas. A planta é de ocorrência ao longo de toda a América Latina, especialmente na América do Sul, sendo o Brasil e a Colômbia considerados os centros de diversidade do gênero *Passiflora*, contendo aproximadamente, 150 e 170 espécies de passifloras, respectivamente (veja BERNACCI et al., 2013).

Figura 2 – Maracujazeiro-doce. (a) Caule e folhas; (b) Flores e botões florais; (c) Frutos
Fonte: (a), (b) Cassia R. Pinheiro; (c) Larissa di Cassia Laperuta

Os pomares comerciais de maracujazeiro-doce apresentam acentuada variabilidade genética; como consequência, pronunciadas variações ocorrem nos indivíduos, produzindo frutos de formas, tamanhos e pesos variados (ALVES et al., 2012; LAPERUTA, 2011; MARTINS et al., 2003; BERNACCI et al., 2013). Essa alta variabilidade é acentuada pela propagação da maioria dos pomares comerciais de maracujazeiro-doce se dar por via sexuada, através de sementes, resultante da falta de cultivares comerciais no mercado. Praticamente inexistem programas de melhoramento genético para a espécie, sendo os pomares comerciais plantados com material silvestre ou decorrente de seleção fenotípica simples. Devido a isso, a monocultura é ainda muito afetada por pragas e doenças, já que nenhuma seleção genética, tanto para a produção como para a tolerância/resistência, tem sido conduzida.

2.1.1 A bacteriose dos maracujazeiros e sintomatologia

O patógeno causador da bacteriose do maracujazeiro, também conhecida como mancha bacteriana, foi descrito pela primeira vez no Brasil por Pereira (1968) como *Xanthomonas passiflorae*. Em 1980, uma nova classificação foi proposta e a bactéria passou a ser denominada *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. Em 1993, Vauterin e colaboradores propuseram uma reclassificação para o gênero, resultando na sua divisão em 20 espécies. As principais alterações foram em *X. campestris*, da qual foram retirados alguns patovares, pois foram elevados ao status de espécie e em *X. axonopodis* que passou a conter 48 patovares. Entretanto, 66 patovares de *X. campestris*, classificados no sistema anterior, não participaram desse estudo, sendo proposta sua denominação como *Xanthomonas* spp., mais o respectivo patovar, provisoriamente, até que pudessem ser adequadamente caracterizados de acordo com os critérios descritos. Dentre esses 66 patovares estava *X. campestris* pv. *passiflorae*. Em 2000, Goncalves e Rosato propuseram, baseados em estudos de homologia de sequências de DNA, que *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* passasse a ser denominada *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, forma aceita até os dias atuais.

O patógeno *X. axonopodis* pv. *passiflorae* exibe o fenótipo típico do gênero, sendo uma bactéria gram-negativa, aeróbica restrita, em forma de bastonete, medindo 9,5 x 1,5 mm e móvel, dada a presença de um flagelo polar. A substância capsular é composta por xanthana (polissacarídeo extracelular – EPS), de coloração amarela, devido ao pigmento xanthomonadina, exclusivo do gênero *Xanthomonas*. Devido às propriedades da xanthana, as colônias aparecem amarelas, circulares, convexas e mucóides. Não forma esporos, filamentos e nem estruturas de resistência. Produz amônia, não reduz nitrato, não produz indol e apresenta grande variabilidade em relação à produção de H₂S. Liquefaz gelatina, hidrolisa fortemente amido, utiliza citrato, galactose, frutose, manose e trealose como fontes de carbono, mas não utiliza asparagina como fonte de carbono ou nitrogênio. O crescimento ótimo se dá aos 27°C (AGRIOS, 2005).

Tradicionalmente, o patógeno é identificado em função da sintomatologia constatada no hospedeiro e por meio de bioensaios de laboratório (caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica) que permitem a identificação do patógeno até o nível de espécie, sendo que a denominação do patovar está relacionada ao

hospedeiro que afeta. Este sistema apresenta grande limitação por não possibilitar identificar a variabilidade genética dentro das populações do patógeno, além de outras limitações. Um sistema rápido de detecção foi proposto por Munhoz e colaboradores (2011), por meio da amplificação com primers nomeados “Xapas” capazes de detectar efetivamente o patovar *passiflorae*.

No Brasil, a bacteriose, também conhecida como crestamento bacteriano, mancha angular ou mancha oleosa do maracujazeiro, é um dos principais patógenos da parte aérea de passifloras, responsável por perdas expressivas em maracujazeiro-doce e maracujazeiro-azedo durante os períodos mais quentes e úmidos do ano (JUNQUEIRA et al., 2008).

O sintoma típico da doença é o aparecimento de lesões foliares do tipo anasarca. São lesões de formato irregular, geralmente delimitadas pelas nervuras foliares, com aspecto de manchas encharcadas, de coloração verde-escura e circundadas por um halo amarelo (clorose). Devido à delimitação por nervuras e formação de halos, as manchas podem ser denominadas de manchas angulares aureoladas. Na medida em que as lesões evoluem, a área central da mancha apresenta tonalidades de marrom-claro, caracterizando o sintoma de necrose. As lesões podem surgir a partir de vários pontos esparsos no limbo foliar, que ao crescerem, podem coalescer e formar grandes lesões, como podem surgir e evoluir a partir da borda das folhas. Em estágios avançados, as lesões deformam a folha, que exibe um aspecto típico, denominado crestamento. As lesões também podem ocorrer em frutos e chegam a atingir as sementes. Em condições de alta umidade e temperatura, a infecção pode atingir e se disseminar sistemicamente através dos feixes vasculares dos pecíolos e ramos, causando intensa desfolha, seca descendente a partir das ponteiros, grande redução na frutificação e subsequente morte da planta (JUNQUEIRA, 2010; JUNQUEIRA et al., 2005)

Todas as regiões produtoras de maracujá apresentam inóculos da doença, principalmente pelo fato do patógeno ser endêmico em várias regiões do país, como no Cerrado, onde a bactéria pode ser vista em várias passifloras silvestres, principalmente em *P. amethystina*, *P. cincinnata* e *P. alata*. Por esta razão, todos os plantios neste bioma, por mais isolados que estejam, acabam adquirindo a doença (JUNQUEIRA et al., 2008). A disseminação do patógeno é frequentemente associada à água e ao vento, podendo também ocorrer por contaminantes aderidos à superfície de insetos e pelo homem, por contato manual ou uso de máquinas e

ferramentas contaminadas. A grande distância, a disseminação pode ser feita por frutos, sementes e mudas contaminadas (ROMEIRO, 2005). A penetração do patógeno nas folhas de maracujazeiro ocorre através de estômatos, hidatódios ou ferimentos. Nos frutos, o patógeno penetra através de lenticelas ou ferimentos alcançando o pedúnculo e o mesocarpo.

2.1.2 Diversidade genética de *Xanthomonas*

O trabalho clássico de Singh (1986) e outros mais recentes (ARSHIYA et al., 2014; GARDINER et al., 2014; MISHRA et al., 2013; TARDIANI et al., 2014) afirmam que o conhecimento sobre a estrutura e diversidade genética do patógeno é determinante nos estudos de epidemiologia e para orientar os programas de manejo da doença, já que a variabilidade do patógeno está diretamente relacionada a sua habilidade de quebrar a resistência do hospedeiro.

Munhoz e colaboradores (2011) encontraram considerável diversidade genética entre 87 isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (*Xap*), agrupando-os em 12 grupos com similaridade superior a 70%, usando como base o coeficiente de Jaccard e marcadores moleculares (AFLP). A coleção foi formada por isolados coletados em dez cidades do estado de São Paulo, nove cidades do estado de Minas Gerais, dois isolados do distrito federal e um isolado de São Sebastião da Amoreira, no estado do Paraná.

Embora não tenha sido detectada correlação positiva entre a formação dos grupos e a origem geográfica (cidades) dos isolados, alguns grupos foram constituídos exclusivamente por isolados de determinadas cidades e a análise dos componentes de variância indicou que a variação entre estados foi de apenas 14,0%, enquanto entre cidades foi de 49,4% e dentro de cidades de 36,0%. Os autores também realizaram um teste de atribuição para verificar a estrutura genética das populações e a participação de cada genótipo nos clusteres genotípicos, possibilitando identificar quais regiões possuíam genótipos similares ou distintos. Foram identificados 13 clusters genotípicos (veja figura 3), sendo possível observar que certas populações de isolados se mostraram geneticamente diversas (A, B e C) enquanto outras uniformes (D, F, G, H e U). Apenas um único isolado foi detectado em 10 localidades, embora 8 desses isolados tenham sido atribuídos a diferentes clusteres ($Q \leq 66\%$).

Figura 3 – **A**, Mapa de localização geográfica das cidades (A–V) de onde os isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* foram coletados (1 ao 87). DF, Distrito Federal; MG, Minas Gerais; SP, São Paulo; e PR, Paraná. **B**, Gráfico resultante do teste de atribuição, sendo que cada barra vertical representa um isolado bacteriano e cada cor representa um cluster genotípico. A coordenada Y mostra o coeficiente de participação (Q) de um isolado no cluster

Fonte: Munhoz et al. (2011)

Tardiani e colaboradores (2014) caracterizaram molecularmente e fenotipicamente um banco de isolados de *Xanthomonas albilineans* de diferentes regiões do Brasil, utilizando 15 pares de primers desenhados para amplificar sequências simples repetidas, a partir da análise do genoma de *X. albilineans*, que amplificaram um total de 54 alelos. A análise de agrupamento mostrou a existência

de variabilidade genética entre os isolados coletados em diferentes estados brasileiros, os quais foram divididos em três grupos principais, embora não foi possível agrupar esses indivíduos por local de coleta.

Arshiya e colaboradores (2014) avaliaram a diversidade genética de 20 isolados de *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) originários da Índia, por meio de rep-PCR, possibilitando a separação dos isolados por região geográfica. Ainda na Índia, Raghavendra e colaboradores (2013) estudaram a diversidade genética de 24 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), de diferentes regiões, usando REP e BOX-PCR, e constataram uma ampla diversidade entre os isolados.

Embora tenha sido constatada ampla diversidade entre isolados de patovares de *Xanthomonas*, isso não significa haver uma associação com a patogenicidade ou agressividade dos isolados; entretanto é um bom indicativo da ocorrência de diversidade genética para a adaptação.

Como mencionado acima, os estudos sobre a diversidade genética de bactérias tem sido baseados em marcadores moleculares, como o rep-PCR, SSR, AFLP, entre outros. Entretanto, é crescente o uso de análises genômicas em bactérias fitopatogênicas; neste contexto, Gardiner et al. (2014) realizaram a análise comparativa de 18 diferentes isolados de *Xanthomonas* e revelaram 84 proteínas exclusivas relacionadas a patogênese em arroz e 60 relacionadas a patogênese em trigo e cevada. Os genes que codificam estas proteínas foram encontrados agrupados no genoma de *X. translucens*, sugerindo ilhas de patogenicidade específicas.

Mishra et al. (2013) identificaram 10 genes (*Xa1*, *Xa3*, *Xa4*, *Xa5*, *Xa7*, *Xa8*, *Xa10*, *Xa11*, *Xa13*, *Xa21*) associados à resistência de arroz contra diversos isolados de *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), o agente causal do crestamento bacteriano. Foram coletados 1024 isolados de *Xoo* de 20 regiões diferentes da Índia. O gene *Xa21* apareceu como o mais eficaz, conferindo resistência contra 88% dos isolados, seguido por *Xa13* (84%), *Xa8* (64%), *Xa5* (30%), *Xa7* (17%) e *Xa4* (14%). Linhagens de arroz contendo os genes *Xa21*, *Xa5* e *Xa13* foram consideradas resistentes para todas as estirpes testadas; com isso, os autores sugerem que a combinação de três genes é a mais adequada para ser inserida em cultivares indianos de arroz.

Em citrus, Pruvost et al. (2015) analisaram a estrutura genética de isolados causadores do cancro cítrico no Iran, utilizando as técnicas de MLSA e MLVA; neste estudo os autores distinguiram isolados atípicos e identificaram dois grupos bem

estabelecidos de *X. citri* pv. *citri*, sendo que um desses grupos de isolados, geneticamente, geograficamente e patologicamente relacionados, não havia tido sua ocorrência relatada em nenhuma outra parte do mundo.

2.2 Interação *Xanthomonas axonopodis*-hospedeiro

As interações patógeno-hospedeiro podem ser classificadas em compatíveis e incompatíveis. A interação compatível é aquela de um patógeno virulento e um hospedeiro suscetível; neste caso, o sistema de defesa da planta é tardiamente ativado, ou não ativado, levando à doença. Na interação incompatível o patógeno é avirulento e o hospedeiro resistente e, neste caso, o sistema de defesa da planta é ativado eficientemente, conduzindo à resposta de resistência.

Durante a interação patógeno-hospedeiro, o patógeno coloniza a planta a fim de se nutrir e se reproduzir, porém, o sucesso desta colonização dependerá dos mecanismos de patogenicidade e virulência do patógeno e das respostas de defesa da planta (WULFF, 2008). No caso de *Xanthomonas*, a maioria possui fatores de virulência estruturais em sua superfície externa ou os mesmos são secretados da célula para o ambiente, sendo que estes fatores podem ser enzimas bacterianas degradadoras de parede celular, toxinas, moléculas sinalizadoras, hormônios, sideróforos, flagelos, pili, lipopolissacarídeos, etc. (RYAN et al., 2011; SURICO, 2013).

Quando ocorre o reconhecimento desses fatores pela planta, eles passam a ser denominados ‘padrões moleculares associados a patógenos’ ou PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (NÜRNBERGER; BRUNNER, 2002) e dentre os processos de defesa vegetal que são alvos dessas moléculas estão: a morte celular programada, a defesa baseada na parede celular, a sinalização hormonal, a expressão de genes de defesa e outras respostas basais.

Xanthomonas spp. contém genes codificadores de proteínas secretadas por todos os sistemas conhecidos em bactérias Gram-negativas, porém, a importância desses sistemas de secreção na virulência não são totalmente conhecidos. No entanto, sabe-se que o SST3 é essencial para a patogenicidade de *Xanthomonas* spp. A maioria das proteínas secretadas pelo SST3, denominadas efetores tipo III, também conhecidas por proteínas de avirulência (Avr), são translocadas diretamente

para o interior da célula vegetal, mas a ação molecular da maioria delas ainda não foi totalmente elucidada (RYAN et al., 2011).

As plantas são dotadas de sistemas de defesa que lhes conferem resistência a patógenos, por meio da interação dos mesmos, intensificando e suplementando um ao outro. Dentre os vários tipos de classificações usados para diferenciar as respostas de defesa, um deles classifica a resistência de plantas a patógenos em duas categorias: resistência qualitativa e resistência quantitativa (DMITRIEV, 2003; KOU; WANG, 2010). A resistência qualitativa é mediada por um ou poucos genes de resistência (R), e permite o reconhecimento de raças distintas de patógenos e desencadeia reações de defesa no sítio da infecção (EULGEM, 2005). A resistência quantitativa ou poligênica permite à planta utilizar-se da combinação de mecanismos de defesa pré-existentes ou induzidos para se defender parcial ou quase completamente dos patógenos. Por isso, quando as condições para a infecção e o desenvolvimento de uma doença são favoráveis, o genótipo da planta e o do patógeno serão determinantes para a ocorrência (em estágio moderado ou grave) ou não da doença (AGRIOS, 2005).

Estudos de genômica tem demonstrado que os genes associados à patogenicidade estão presentes no genoma de forma agrupada, formando clusters gênicos. A maioria dos genomas sequenciados de *Xanthomonas* spp. contém um conjunto de nove genes que codificam efetores do tipo III (*xopR*, *avrBs2*, *xopK*, *xopL*, *xopN*, *xopP*, *xopQ*, *xopX* e *xopZ*). Em *X. axonopodis* ainda são observados quatro genes conservados adicionais (*Ptha*, *xopF1*, *xopE2* e *avrXacE3*) que também codificam efetores do tipo III (veja RYAN et al., 2011).

Em maracujazeiro-doce, Braga (2011) analisou a severidade de quatro isolados (M129, PA8-2, AP302, Br6d) da coleção de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", selecionados de acordo com a publicação de Munhoz et al. (2011), levando-se em conta os critérios de divergência genética, locais de origem e hospedeiros (*P. edulis* e *P. alata*) (Tabela 1). Os isolados foram inoculados nas folhas dos genitores da população de mapeamento de maracujá-doce (veja NUNES, 2010).

Tabela 1 - Isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* da coleção pertencente ao Laboratório de Genética Molecular de Plantas Cultivadas do Departamento de Genética da ESALQ/USP

Código	Agrupamento	Hospedeiro original	Município de coleta	Estado
M129	VIII	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Araguari	MG
AP302	-	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Adamantina	SP
Br6-d	II	<i>P. alata</i>	Planaltina	DF
PA8-2	XII	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Piratiniga	SP

Fonte: Munhoz et al. (2011)

A análise dos dados da área foliar lesionada foi realizada comparando a agressividade dos isolados contra os genitores 2(12) e SV3 (veja Tabela 2). O isolado M129 foi o único capaz de revelar respostas dos genitores estatisticamente diferentes. Contra o genótipo 2(12), os isolados foram discriminados em três grupos, sendo o isolado AP302 o mais agressivo e o PA8-2 o menos agressivo. Contra o genótipo SV3, apenas o isolado PA8-2 mostrou-se estatisticamente diferente dos demais, sendo o menos agressivo.

Tabela 2 – Média da área da lesão (cm²) resultante da inoculação de quatro isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* nos genitores da população de mapeamento

Isolado	2(12)	SV3	p.vr
M129	8.1 b	16,8 a	0.03
AP302	20.0 a	13,7 a	ns
Br6-d	14.4 ab	11,8 a	ns
PA8-2	1.2 c	1,9 b	ns

Letras diferentes, na mesma coluna, indicam que as médias são estatisticamente distintas a 5% pelo teste de Tukey; nível de significância entre médias da mesma linha pelo teste F; ns: diferenças não significativas

Fonte: Braga (2011)

O recente estudo de Munhoz et al. (2015) sobre expressão de genes de maracujazeiro-azedo (*P. edulis*) em resposta à infecção por *X. axonopodis* pv. *passiflorae* revelou que, na fase inicial de interação (24 h), as taxas de expressão diferencial variaram de 0,51x a 1,83x. Em estágios avançados, quando os sintomas associados à doença são visíveis, o gene que respondeu mais fortemente ao ataque do patógeno codifica uma lipoxygenase 2, e sua expressão foi induzida 500x e 300x, aos 5 e 9 dias após a inoculação, respectivamente, em comparação com as plantas controles, sugerindo um papel relevante desta enzima na resposta de defesa do maracujazeiro. Além disso, os autores afirmam que a maioria dos genes envolvidos nas vias de reconhecimento e sinalização do patógeno foram reprimidos

por *Xap* e isso dá sustentação à idéia de que a via de sinalização do ácido jasmônico deixa de ser ativada durante as primeiras horas desta interação compatível.

2.3 Mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*) visando à resistência genética a bactérias fitopatogênicas

Como dito anteriormente, a resistência genética de plantas a fitopatógenos pode ser classificada segundo o número de genes responsáveis pelo caráter, sendo definida como resistência qualitativa, ou monogênica, quando o efeito de um único gene pode ser identificado e sua segregação provoca variações discretas no fenótipo e como resistência quantitativa, ou poligênica, quando vários genes estão envolvidos, ocasionando variações contínuas e não individualizáveis. A distinção entre o tipo de resistência, qualitativa ou quantitativa, é importante para definir o método de seleção a ser empregado (veja: CAMARGO, 1995, 2001).

Do ponto de vista epidemiológico, a resistência de plantas foi inicialmente classificada por Van der Plank (1963) em dois tipos: vertical e horizontal. Resumidamente, pode-se dizer que a resistência vertical é efetiva contra algumas raças do patógeno, neste caso, a cultivar apresentará imunidade ou hipersensibilidade contra determinadas raças do patógeno. Já a resistência horizontal é efetiva contra todas as raças do patógeno e os isolados irão diferir apenas quanto à agressividade. Essa distinção é importante pois permite inferir sobre as consequências da utilização dos tipos de resistência no progresso da doença e na durabilidade da resistência. Em ambos os casos, a resistência pode ter origem monogênica ou oligogênica, entretanto, são comumente encontrados relatos de resistência vertical associada ao padrão de segregação monogênico e relatos de resistência horizontal associada a poligenes (veja CAMARGO, 1995).

A resistência vertical monogênica é mais facilmente quebrada e, por isso, é considerada de menor durabilidade. Ao contrário, a resistência horizontal poligênica é mais difícil de ser vencida pelo patógeno. Isso ocorre pois, nos sistemas monogênicos, é necessário que o patógeno sofra mudanças apenas em um loco de patogenicidade, enquanto nos sistemas poligênicos vários locos precisam sofrer mudanças (veja: CAMARGO, 1995, 2001).

Nos programas de melhoramento, a resistência vertical é a mais fácil de ser manipulada, geralmente compreende a transferência de um gene de resistência (identificado em uma cultivar, linhagem ou em germoplasma silvestre) para uma cultivar suscetível, mas que apresente outros caracteres agronomicamente favoráveis. Já o melhoramento para resistência quantitativa ocorre pelo acúmulo gradual de alelos favoráveis durante os ciclos de seleção.

No caso da resistência genética, é importante o conhecimento sobre a estrutura genética da característica e a sua natureza epidemiológica, aspectos fundamentais na definição dos métodos de seleção a serem aplicados. Uma estratégia amplamente utilizada para estudos de resistência poligênica é o mapeamento de QTL.

Contextualizando, *Quantitative Trait Loci* (QTL) são locos quantitativos clusterizados em uma região do genoma, responsáveis, pelo menos em parte, pela variação fenotípica do caráter sob estudo. A identificação de QTL consiste em procurar regiões genômicas que apresentem associações com a variação fenotípica, de tal forma que outras informações como a localização cromossômica, o modo de ação gênica (aditividade, dominância, heterose e epistasia), a interação genótipo $\times$ ambiente e a estabilidade do efeito do QTL possam ser incorporadas no programa de melhoramento (veja revisões de CARNEIRO; VIEIRA, 2002; MOLLINARI, 2008).

Vários autores adotaram a abordagem de mapeamento de QTL para estudar resposta a *Xanthomonas* em diversas culturas, como, por exemplo, em feijão (TARLAN; MICHAELS; PAULS, 2001), trigo (LILLEMO et al., 2013), pêssego (YANG et al., 2013), damasco (SOCQUET-JUGLARD et al., 2013) e crucíferas (KIFUJI et al., 2013; TONU et al., 2013). Em crucíferas, Tonu e colaboradores (2013) mapearam QTL relacionados a resistência à podridão negra na couve (*Brassica oleracea*) causada por *X. campestris* pv. *campestris*; neste estudo foi possível mapear três QTL, sendo um deles responsável por cerca de 34% da variação fenotípica. Já Kifuji e colaboradores (2013) estudando a mesma interação mapearam três QTL relacionados à resistência e sugerem a seleção assistida por marcadores. Em ambos os trabalhos os autores relatam a contribuição para o melhor entendimento do controle genético da resistência.

Em fruteiras, como o pêssego, Yang e colaboradores (2013) mapearam QTL associados à mancha bacteriana causada por *X. arboricola* pv. *pruni* em folhas e frutos e identificaram 5 QTL principais, sendo dois relacionados apenas a folha, dois

relacionados a doença em frutos e apenas um QTL relacionado a ambos os órgãos. A partir disso, os autores sugerem haver uma resposta diferenciada para a doença em folhas e frutos, bem como a expressão de genes envolvidos na resposta da planta ao estresse biótico. Em damasco, Socquet-Juglard e colaboradores (2013) estudaram a interação de damasco e *X. arboricola* pv. *pruni*, causador da mancha marrom, e identificaram um QTL principal associado à incidência da doença, sendo responsável por ~53% da variação fenotípica; nesse mesmo estudo, os autores avaliaram duas populações que foram divididas de acordo com os alelos que segregaram para a resistência e obtiveram uma redução de 35,6% na incidência da doença na população que continha o alelo favorável para a resistência.

Em maracujazeiro-azedo, Lopes et al. (2006) localizou um QTL relacionado a resistência a *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, em uma população F₁ oriunda de um cruzamento biparental entre acessos de maracujazeiro-azedo. Um dos marcadores, alocado ao grupo de ligação II, explicou 15,8% da variação fenotípica do caráter área de lesão. Segundo esses autores, a seleção baseada nos genótipos dos marcadores associados a QTL levaria a uma eficiência de seleção de 35% em relação à seleção apenas pelo fenótipo. Ainda é um índice pequeno, inclusive porque apenas um QTL de maior significado foi identificado. Entretanto, na medida em que mais QTL forem identificados, índices de eficiência maiores poderão viabilizar a seleção assistida por marcadores. Matta (2005), utilizando a progênie avaliada por Lopes et al. (2006), também detectou QTL com magnitude de efeitos semelhantes na mesma região do grupo de ligação II indicada por Lopes et al. (2006). Além desse QTL, Matta (2005) encontrou um QTL no grupo de ligação VI e outro no grupo de ligação VIII, com efeitos expressivos. Também encontrou diversos QTL de pequeno efeito em mais de um grupo de ligação, considerando diferentes períodos de avaliação e diferentes posições de folhas inoculadas. Esses resultados indicam a existência de variabilidade genética de natureza poligênica a ser explorada no melhoramento do maracujazeiro-azedo visando à resistência a bacteriose. Recentemente, Braga (2011) relata que foram mapeados locos quantitativos relacionados à resistência de plantas de maracujazeiro-doce à *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Este autor identificou regiões associadas a 16 QTL para as áreas de clorose, necrose e lesão foliar, sendo que um desses locos responde por cerca de 16,7% da variação fenotípica para resistência.

Mapeamento de QTL em populações F_1 segregantes

A grande maioria das metodologias estatísticas desenvolvidas para a construção de mapas genéticos é destinada às populações obtidas a partir de linhagens homozigóticas, como as populações F_2 derivadas de F_1 por autofecundação, populações de RIL (*Recombinant Inbreed Lines*), aquelas obtidas por retrocruzamento (RC) e as populações de duplos haplóides, que resultam da duplicação artificial do genoma haplóide. Porém, para algumas fruteiras, espécies florestais e cana-de-açúcar, é difícil ou até mesmo inviável obter linhagens endogâmicas. A incidência de autoincompatibilidade, por exemplo, leva as populações à alogamia obrigatória e, conseqüentemente, pode ocorrer depressão devido à prática da endogamia, inviabilizando o estabelecimento de plantas autofecundadas em experimentos a campo. Outra dificuldade em se trabalhar com linhagens homozigóticas deve-se a existência de genomas complexos e de origem híbrida, como no caso da cana-de-açúcar, ou de um longo ciclo reprodutivo, como no eucalipto, tornando impraticável a realização de autofecundações sucessivas. Desse modo, para populações derivadas de genitores não endogâmicos ou de espécies de cruzamento (do inglês, *outcrossing species*), tem-se usado populações F_1 segregantes ou famílias de irmãos completos (do inglês, *full sib-family*) para a geração de mapas de ligação.

No caso dos maracujás cultivados, devido à ocorrência de autoincompatibilidade, uma população segregante (F_1 segregante) pode ser obtida pelo cruzamento entre dois genitores não-endogâmicos, fenotipicamente contrastantes. Neste caso, as análises genético-estatísticas relacionadas à construção de mapas genéticos (e por consequência ao mapeamento de QTL) baseiam-se nessas progênies segregantes de irmãos completos. Neste caso, até quatro alelos podem segregar em cada loco heterozigótico e vários padrões de segregação podem ocorrer, sendo possível até 18 tipos de segregação (WU et al., 2002a). No entanto, a maior dificuldade está na determinação das fases de ligação existentes entre locos marcadores e os QTL.

Para viabilizar a construção de mapas genéticos nessas populações F_1 segregantes, inicialmente, foi proposta a estratégia do duplo pseudocruzamento-teste (do inglês, *two-way pseudo-testcross*) (RITTER; GEBHARDT; SALAMINI,

1990). Esta abordagem tem o inconveniente de gerar dois mapas, sendo um para cada genitor, e isso se deve ao fato da metodologia aproveitar apenas marcadores moleculares dominantes, ou seja, os que segregam na proporção 1:1. Usando desta abordagem, dois mapas genéticos de maracujazeiro-azedo foram construídos para a mesma população, o primeiro com base em polimorfismos de RAPD (CARNEIRO et al., 2002) e o outro em polimorfismos de AFLP (LOPES et al., 2006). Ambos os trabalhos geraram dois mapas, um para o genitor 'IAPAR-123' e outro para o genitor 'IAPAR-06'.

Com o intuito de contornar esse problema, utilizam-se marcadores biparentais ou locos codominantes, cujos alelos estão presentes em ambos os genitores para a construção de um mapa único, integrando os grupos de ligação. Podem ser aproveitados marcadores biparentais dominantes com segregação 3:1 e 1:1 e codominantes com segregação 1:2:1 e 1:1:1:1 os quais são usados como ponte, sendo estes últimos os mais informativos (WU et al., 2002a). Os marcadores codominantes são de extrema importância, pois possibilitam a construção de um mapa integrado, porém não devem ser desprezados os marcadores dominantes, pois os mesmos contribuem para a saturação dos grupos de ligação e uma maior caracterização genômica da espécie.

Com esses avanços foi possível construir um mapa único para o maracujazeiro-azedo com base em dados de AFLP e SSR (OLIVEIRA et al., 2008). Esta integração só foi possível devido ao emprego da metodologia proposta por Wu et al. (2002a) e marcadores SSR.

O primeiro mapa genético desenvolvido para o maracujazeiro-doce (NUNES, 2010) consiste de um arcabouço de marcadores do tipo AFLP e M-AFLP, além de SSR (298 AFLP, 4 M-AFLP e 20 SSR), sendo que 91% das marcas mostraram proporção de segregação 1:1 e apenas os 9% restantes (29 marcadores) mostraram proporção de segregação de 3:1, 1:2:1 ou 1:1:1:1.

Com o intuito de enriquecer o mapa genético do maracujazeiro-doce, Pereira et al., (2013) acrescentaram mais marcas ao mapa gerado por Nunes (2010) que passou a conter 549 marcadores sendo 376 AFLP, 115 M-AFLP, 51 SSR, além de 5 RGA, 1 SSR-SSCP e 1 SNP, alocados em nove grupos de ligação, sendo 2% deles com segregação 1:1:1:1, 1,3% com segregação 1:2:1, 27,3% com segregação 3:1 e 69,4% 1:1. O comprimento total do mapa é de 2073,0 cM com uma distância média entre marcas de 3,8 cM.

De posse de um mapa de ligação integrado, a dificuldade relacionada à determinação das fases de ligação entre marcadores e QTL pode ser resolvida: neste sentido, Gazaffi e colaboradores (2014) propuseram uma metodologia para detecção de QTL em mapas oriundos de populações F_1 segregantes, baseada no método de mapeamento por intervalo composto, que permite a detecção de QTL com diferentes padrões de segregação, além de identificar as fases de ligação e os efeitos aditivos e dominantes dos poligenes.

Para o maracujazeiro-doce, foram mapeados locos quantitativos utilizando 100 genótipos da mesma população estudada por Pereira et al. (2013) para vários caracteres relacionados à produção e qualidade dos frutos, quais sejam: número de frutos por parcela, peso, comprimento e diâmetro médio de frutos, espessura e peso médio da casca, peso médio da polpa e teor de sólidos solúveis totais. O método CIM foi capaz de detectar um total de 57 QTL sendo que a proporção da variação fenotípica (R^2) explicada pelos QTL variou de 0,9% para diâmetro médio do fruto a 11,2% para peso médio da polpa (NUNES, 2010). Em seguida, a população foi avaliada em dois locais, utilizando a mesma metodologia de mapeamento e se encontrou um total de 39 QTL, sendo que a proporção da variação fenotípica (R^2) explicada pelos QTL variou de 5,7% para produção de frutos a 23,5% para sólidos solúveis totais (LAPERUTA, 2011).

Considerações adicionais sobre as metodologias de mapeamento de QTL

Em uma definição mais simples, mapear QTL significa identificar sua posição no genoma e quantificar seus efeitos (TOLEDO et al., 2008). A tecnologia de mapeamento de QTL compreende diversas metodologias, adequadas a cada tipo de análise, partindo-se, basicamente de três premissas. A primeira premissa é de que os genes que controlam caracteres quantitativos podem ser mapeados no genoma, da mesma forma que os marcadores genéticos. A segunda premissa implica que, se os marcadores cobrem uma grande porção do genoma, então existe uma boa chance de que alguns dos genes que controlam caracteres quantitativos estejam ligados fisicamente a alguns desses marcadores. A terceira premissa considera que se os genes e os marcadores segregam numa população geneticamente definida, então as relações de ligação entre eles podem ser deduzidas pela associação entre a variação do caráter e o padrão de segregação dos marcadores (LIU, 1998).

Entre as metodologias mais comuns de análise de QTL estão teste de marca-isolada, mapeamento por intervalo, mapeamento por intervalo composto e mapeamento de múltiplas características.

A abordagem mais simples para a detecção de um QTL é o teste de marca-isolada, ou marca única, que consiste em indicar quais marcadores estão associados com a característica quantitativa e apontar para existência de um QTL potencial. As marcas são testadas isoladamente e a hipótese nula a ser testada é de que a média da característica independe do genótipo do marcador. Neste caso podem ser utilizados o teste t, ANOVA e a regressão linear simples. Entretanto, estes testes não permitem estimar a localização do QTL, de forma que o efeito e a localização do loco quantitativo ficam confundidos (a localização interfere no seu efeito). Esse método ainda pode ser usado a título de análise preliminar, visando identificar as marcas mais significativamente relacionadas à característica. É uma estratégia eficiente para rastrear QTL em grandes populações (BRAGA, 2011; BROMAN; SEN, 2009; COELHO; SILVA, 2002; DOERGE, 2002; LIU, 1998; WU; MA; CASELLA, 2007).

O mapeamento por intervalo simples foi proposto por Lander e Botstein (1989) e nesta metodologia utiliza-se um mapa genético como base para a localização de loco quantitativo. O intervalo delimitado por um par de marcas ordenadas é rastreado em incrementos na unidade de distância de mapa e métodos estatísticos são utilizados para testar se um loco é esperado dentro do intervalo. Este método testa um único loco em cada incremento dentro do intervalo das marcas ordenadas. Os resultados do teste são expressos em “LOD score” (LIU, 1998), que compara a avaliação da função de verossimilhança sob a hipótese nula de não haver QTL. O rastreamento é feito ao longo das marcas genéticas ordenadas, de uma forma sistemática e linear, testando a mesma hipótese nula e utilizando a mesma fórmula de verossimilhança a cada incremento. Os “LOD score” acumulados representam o “LOD profile” ao longo do mapa genético. A localização do máximo “LOD score” tem o potencial de indicar múltiplos QTL, quando um modelo de loco único é utilizado. Determinar qual dos muitos picos indicam um loco único leva a um problema de determinar quais resultados são estatisticamente significativos. É difícil declarar um loco com segurança, devido à verossimilhança ser uma função de misturas de normais (distribuições normais). Esta função quando maximizada sob as hipóteses nula ou alternativa pode levar a erros, mesmo quando

múltiplos testes e as premissas estatísticas são levados em consideração. Esta questão pode ser resolvida por reamostragem (permutação ou *bootstrapping*). Mesmo representando um avanço em relação os testes de marca-isolada, o mapeamento por intervalo é limitado (DOERGE, 2002). O método de mapeamento por intervalo foi usado em estudos relacionados à resistência a doenças. Em trigo, a mancha marrom, causada por *Bipolaris sorokiniana*, foi avaliada em seis ambientes e foi possível a identificação de 3 QTL, sendo que um deles (Lr34) explicou 55% da variação fenotípica (LILLEMO et al., 2013). Pacheco e colaboradores (2014) encontraram 3 QTL relacionados à resistência de pêssego à podridão causada por *Monilinia fructigena*, sendo que um deles explicou 31,5% da variação fenotípica. Rex e colaboradores (2014) relataram a ocorrência de 2 QTL relacionados à resistência à podridão negra (causada por *Guignardia bidwellii*) dos porta enxertos de videira, que explicaram cerca de 30% da variação fenotípica relacionada à doença. QTL relacionados a interação da maçã e *Erwinia amylovora* (WÖHNER et al., 2014) e pimentão e *Phytophthora capsici* (NAEGELE et al., 2014) também foram mapeados, evidenciando que essa metodologia é adequada nos casos em que os genitores são conhecidos e as fases de ligação são estimadas.

O mapeamento por intervalo composto, proposto por Jansen (1993) e Zeng (1993), consiste na inclusão de marcas adicionais como cofatores no modelo do mapeamento por intervalo. Estes cofatores são constituídos por marcas significativamente associadas a efeitos de outros QTL e servem para remover os efeitos da variação aleatória. Entretanto, marcas adjacentes às marcas do intervalo em avaliação não são incluídas como cofatores. Estas marcas adjacentes estão numa região denominada de *window size* conhecida como janela de exclusão, cuja função é eliminar o efeito de interação das marcas da região da janela com o loco do intervalo principal. O benefício de definir esta janela é que a variação associada ao ponto de análise (dentro do intervalo investigado) é restrita aos efeitos do loco associado, ficando livre de efeitos de QTL ligados e de QTL fantasmas. A limitação dessa abordagem é ser restrita à procura unidimensional através do mapa de ligação e não tem sensibilidade para detectar os múltiplos efeitos epistáticos dos QTL (DOERGE, 2002).

O mapeamento por intervalo composto tem sido o procedimento mais usado em plantas (veja GAZAFFI, 2009). Assim, Tonu e colaboradores (2013) utilizaram a metodologia para mapear QTL relacionados à resistência à podridão negra em

couve causada por *X. campestris* pv. *campestris*: neste estudo foi possível mapear três QTL, sendo um deles responsável por cerca de 34% da variação fenotípica. Em pêssago, Yang e colaboradores (2013) mapearam QTL associados à mancha bacteriana causada por *X. arboricola* pv. *pruni* em folhas e frutos e identificaram 5 QTL principais, sendo um deles responsável por ~46% da variação fenotípica. Esta mesma bactéria causa perdas consideráveis em damasco, motivo pelo qual Socquet-Juglard et al. (2013) estudaram essa interação e um loco quantitativo principal foi identificado, sendo responsável por ~53% da variação fenotípica. Como já mencionado, em maracujazeiro-doce foi realizado o mapeamento de QTL por CIM para caracteres relacionados à produção e qualidade dos frutos, e à reposta da população à infecção por *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

A abordagem estatística para localizar múltiplos QTL foi proposta por Kao, Zeng e Teasdale (1999) e tem como objetivo principal localizar não apenas um único loco quantitativo por vez, fazendo uma busca simultânea em todo o genoma, permitindo que seja realizada a análise de epistasia entre múltiplos QTL. Este método foi usado para identificar QTL em soja (GUANG-YU et al., 2011) e cana-de-açúcar (MARGARIDO, 2011). No caso da cana-de-açúcar, aplicou-se a metodologia visando estudar vários caracteres (percentual de fibra, conteúdo de sacarose e produtividade) em múltiplos ambientes (duas localidades) durante três anos. Neste estudo, foram detectados 13 QTL com efeitos principais e oito interações epistáticas, que só foram detectadas devido à abordagem adotada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População de Mapeamento

A população de mapeamento foi derivada do cruzamento entre os acessos de *Passiflora alata*, 2(12) (progenitor feminino) e SV3 (progenitor masculino), efetuado por Nunes (2010), resultando em uma progênie F_1 composta de 180 indivíduos. O acesso 2(12) pertence a uma progênie de meios-irmãos obtida a partir de seleções da Embrapa Cerrados (veja detalhes em FERREIRA et al., 2010) e o acesso SV3 foi obtido em uma propriedade produtora de maracujá-doce do município de Piracicaba - SP. Para a inoculação com o patógeno *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, posterior fenotipagem e análise de QTL, foram utilizados 100 indivíduos dessa população mais os dois genitores. Estes 102 indivíduos foram clonados de tal forma a estabelecer um experimento, em casa de vegetação, composto de 4 blocos casualizados, sendo que cada bloco continha 102 plantas e cada planta foi considerada uma parcela. No ano de 2012 a população foi inoculada com o isolado PA8-2 e no ano de 2013 com o isolado AP302. Em cada inoculação a população foi mantida por 11 meses em casa de vegetação.

A obtenção dos clones foi feita por propagação vegetativa, via estaquia. As estacas foram plantadas em vasos de 1,0 L contendo substrato organomineral, à base de vermiculita, e mantidas em ambiente sob microaspersão intermitente em estufa agrícola. No dia do plantio, foi feita uma aplicação de fungicida à base de tebuconazole (Folicur 1ml/L + 0, 5ml/L de espalhante adesivo). A aplicação foi repetida após uma semana, aos 30 e 45 dias. Aos 30 dias após a estaquia, as mudas foram adubadas por cobertura com 1g de mistura granulada NPK (14-14-14), marca comercial Osmocote. Aos 60 dias, foram adubadas com 1g de sulfato de amônio e os 90 dias, mais 1g da mistura NPK (15-0-16). Durante esse período, foram realizadas as podas de formação. Antes da inoculação com o fitopatógeno, as plantas foram colocadas em câmara úmida por 72 h, constituída por um período de microaspersão mais frequente, de forma a manter a umidade relativa acima de 80%. Após esse período, a microaspersão foi interrompida e quando não havia mais água livre nas folhas, as mesmas foram inoculadas. A partir desta fase, as plantas foram irrigadas por gotejamento, por um período de 21 dias. As plantas foram irrigadas por gotejamento (50 min diários, 250 ml de água por vaso por dia). A condição de

umidade dos substratos dos vasos era diariamente verificada para que fossem feitos eventuais ajustes quanto ao volume de água aplicado.

3.2 Seleção dos isolados bacterianos

Foram usados dois isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, AP302 E PA8-2, escolhidos a partir dos trabalhos de Munhoz et al. (2011) e Braga (2011). Optou-se por usar isolados geneticamente divergentes, segundo a informação publicada por Munhoz e colaboradores (2011), apresentada na Revisão de Literatura, e a partir dos resultados de Braga (2011) que selecionou 5 daqueles isolados e os avaliou quanto à agressividade contra os genitores SV3 e 2(12) (Tabela 3). No seu trabalho, o autor optou por utilizar o isolado M129 para fins de inoculação contra a mesma progênie aqui avaliada, já que apresentou severidade moderada contra ambos os genitores e foi o único capaz de diferenciá-los segundo os testes estatísticos aplicados. Os dados de Braga (2011) foram reanalisados em conjunto com os aqui obtidos.

O isolado PA8-2 foi o único que se destacou estatisticamente dos demais quanto à severidade, embora baixa. Já o isolado AP302 foi o que compartilhou mais locos com os demais isolados, segundo o agrupamento em clusters genotípicos realizado por Munhoz et al. (2011) e ilustrado na Figura 3.

Tabela 3 - Isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* da coleção de trabalho do Laboratório de Genética Molecular de Plantas Cultivadas do Departamento de Genética da ESALQ/USP

Código	Número do Cluster*	Hospedeiro original	Município de coleta	Estado	Severidade**
M129	60	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Araguari	MG	Moderada
AP302	33	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Adamantina	SP	Moderada
PA8-2	44	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Piratininga	SP	Baixa

* Munhoz et al. (2011).

** Braga (2011).

3.3 Procedimentos para a inoculação bacteriana

Para o preparo da solução de inoculação, seguiu-se o procedimento adotado por Braga (2011). Inicialmente foram vertidos 25 mL de solução salina a 0,85% em placa de petri contendo colônias do isolado que foram incubadas por 48 h à 28°C, com auxílio de uma espátula de Drigalski esterilizada. As colônias foram raspadas

superficialmente para que se diluíssem na solução salina, sem afetar o meio de cultura (Nutriente Agar). O sobrenadante obtido foi então transferido para um tubo Falcon, sob agitação moderada para homogeneização da solução bacteriana. Em seguida, amostra de 3 mL dessa solução foi vertida em recipiente apropriado para se proceder a leitura de densidade ótica no espectrofotômetro, ajustado à uma frequência de 600 nm, com o objetivo de obter soluções bacterianas com densidade ótica de 0,3A (absorbância), o que corresponde a uma concentração de 10^8 ufc/mL. A solução ajustada foi denominada de solução de inoculação. Todos os procedimentos de obtenção da solução bacteriana foram executados dentro de câmara de fluxo laminar, com instrumentos e soluções devidamente esterilizados.

Para promover a infecção bacteriana, primeiramente foi usado um perfurador metálico de papel, com 6 mm de diâmetro (Figura 4a), sobre o limbo foliar. O perfurador foi esterilizado em solução de álcool 70% ao final de cada parcela. Imediatamente após a perfuração, um cotonete esterilizado foi embebido na solução de inoculação e passado nas bordas internas do ferimento para que ocorresse a inoculação bacteriana (Figura 4b).

Figura 4 – Procedimentos adotados para a infecção foliar: (a) perfuração; (b) inoculação

3.4 Quantificação das áreas foliares

Decorridos 14 dias após a inoculação (dai), as folhas (sem que fossem destacadas da planta) tiveram a sua face abaxial aderida a uma plataforma adesiva de cor branca (feita com isopor de 10 mm), disposta de tal forma que o limbo foliar

ficasse plano para evitar distorções da imagem capturada (Figura 5a). Além disso, a plataforma continha um retângulo azul (3 x 1 cm) para servir de escala das imagens.

Os arquivos contendo as imagens foram nomeados e enquadrados. Em seguida, as áreas foram coloridas para garantir contraste adequado e consequente otimização da quantificação das áreas lesionadas. A área foliar foi dividida em sadia (verde), clorose (amarelo) e necrose (vermelho), sendo que as duas últimas constituem a área de lesão, e a escala foi colorida de azul (Figura 5b). O procedimento de coloração foi realizado pelo software GIMP, versão 2.6.8 (KIMBALL et al., 2008). Após o tratamento, as imagens foram processadas pelo software AFsoft versão 1.1 (JORGE; SILVA, 2009), onde as áreas foram quantificadas com base na escala fornecida ao programa, sendo que cada imagem teve seus valores ajustados a partir escala contida na própria foto, possibilitando que as áreas fossem mensuradas em cm².

Figura 5 - Tratamento digital das imagens: (a) imagem original; (b) imagem tratada pronta para a quantificação das áreas

3.5 Análise estatística dos dados

Os dados foram organizados de forma a realizar as análises usando o ambiente de programação R (DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014). Inicialmente foi conduzida uma análise exploratória e a partir do resultado, os modelos estatísticos foram ajustados para cada uma das variáveis selecionadas de interesse. Para tanto foram usados os pacotes computacionais: *psych* (REVELLE, 2015), *corrgram* (WRIGHT, 2014), *agricolae* (MENDIBURU, 2013), *lattice* (SARKAR, 2008), *MASS*

(VENABLES; RIPLEY, 2002), *nlme* (PINHEIRO et al., 2015), *nlmeU* e *nlmeUpdK* (GALECKI; BURZYKOWSKI, 2013).

Análise exploratória

Foi conduzida uma análise exploratória dos dados com a finalidade de visualizar graficamente os padrões de variações existentes. Para tanto, foram utilizados gráficos de dispersão, distribuições de probabilidade e correlações entre todas as variáveis, duas a duas, usando o coeficiente de correlação de Pearson e o procedimento de Bonferroni. As áreas relacionadas à resposta da planta à inoculação, quais sejam, clorose, necrose e lesão foram selecionadas para estudo. Entretanto, como será apresentado mais detalhadamente no item Resultados, as variáveis clorose e lesão se apresentaram altamente correlacionadas. Com isso, as variáveis selecionadas para os ajustes estatísticos e o subsequente mapeamento de QTL foram necrose e lesão.

Ajuste de modelos

Para a análise dos dados fenotípicos, ou seja, das áreas foliares (necrose e lesão), foi usada a abordagem de modelos mistos e os efeitos genéticos foram tratados como aleatórios, com o intuito de investigar os padrões de variação dos genótipos. O modelo teve como efeitos fixos os fatores de variação ano e bloco, e a variável área total foi considerada covariável no modelo. Para tanto, oito diferentes estruturas de variância-covariância (VCOV) para o efeito genético das variáveis área de necrose e de lesão foram investigadas.

Inicialmente, foram avaliadas quatro diferentes estruturas de variância-covariância para a matriz de efeitos aleatórios (**G**) do modelo. Com a estrutura mais provável da matriz **G**, foram avaliadas quatro diferentes estruturas de variâncias e covariâncias para a matriz de efeitos residuais (**R**), possibilitando o uso da variabilidade residual para a predição do vetor de variáveis aleatórias do modelo. As estruturas de matrizes são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Estruturas examinadas para a matriz de variâncias-covariâncias

Matriz	Descrição
Identidade	Homogeneidade de variâncias e ausência de correlações.
Diagonal	Heterogeneidade de variâncias e ausência de correlações.
Simetria Composta Homogênea	Homogeneidade de variâncias e presença de correlações genéticas iguais.
Não estruturada	Heterogeneidade de variâncias e presença de correlações genéticas diferentes.
Simetria Composta Heterogênea	Homogeneidade de variâncias e presença de correlações residuais iguais.
Autoregressiva de primeira ordem	Homogeneidade de variâncias e presença de Autocorrelações temporais.

Nos quatro primeiros modelos, a matriz de efeitos residuais ($\mathbf{R}$) foi estruturada no modelo tradicional *Identidade*, para que a partir da melhor estrutura de variância-covariância para a matriz de efeitos aleatórios ($\mathbf{G}$), a matriz dos resíduos pudesse ser ajustada. Para o 1º ajuste, foi considerada a estrutura mais simples que é o modelo *Identidade*; o 2º modelo considerou haver heterogeneidade de variâncias genéticas entre os anos 2010, 2012 e 2013 e ausência de correlações genéticas entre os mesmos, estrutura essa definida pelo modelo *Diagonal*; o 3º modelo considerou haver homogeneidade de variâncias genéticas entre os anos e presença de correlações genéticas iguais, estrutura definida pelo modelo de *Simetria composta homogênea*. Finalmente, o 4º modelo considerou haver heterogeneidade de variâncias genéticas para os três anos (2010, 2012 e 2013) e presença de correlações genéticas diferentes para os anos 2 a 2, sendo esse definido como *Não estruturada*.

A partir dos resultados do ajuste para a matriz de efeitos aleatórios ($\mathbf{G}$), a melhor estrutura foi mantida e foi investigada a estrutura de variâncias e covariâncias para a matriz de efeitos residuais ($\mathbf{R}$). Neste contexto, o 5º modelo considerou haver heterogeneidade de variâncias residuais e ausência de correlações residuais; o 6º considerou haver homogeneidade de variâncias e presença de correlações residuais iguais; o 7º, haver homogeneidade de variâncias e presença temporal de autocorrelações residuais e, finalmente, o último (8º) considerou haver heterogeneidade de variâncias residuais e presença de correlações residuais. As estruturas dos oito modelos testados podem ser visualizadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Modelos de estruturas de variâncias-covariâncias para as matrizes de efeitos aleatórios (**G**) e de efeitos residuais (**R**)

Modelo	Matriz G	Matriz R
Mod1	Identidade	Identidade
Mod2	Diagonal	Identidade
Mod3	Simetria composta homogênea	Identidade
Mod4	Não estruturada	Identidade
Mod5	*	Diagonal
Mod6	*	Simetria composta heterogênea
Mod7	*	Autoregressiva de primeira ordem
Mod8	*	Não estruturada

*Estrutura definida a partir do modelo que melhor se ajustar dentre os quatro testados.

As diferentes estruturas foram comparadas buscando avaliar qual se ajustava melhor à variação dos dados usando os critérios AIC (Akaike Information Criteria), BIC (Bayesian Information Criteria) e teste de razão de verossimilhanças.

O AIC é definido conforme eq. (2):

$$AIC_p = -2 \log(L_p) + 2[(p + 1) + 1], \quad (2)$$

e o BIC é definido conforme eq. (3):

$$BIC_p = -2 \log(L_p) + [(p + 1) + 1] \log(n), \quad (3)$$

tanto em AIC quanto em BIC o L_p é a função de máxima verossimilhança do modelo e p é o número de variáveis explicativas consideradas no modelo.

O teste de razão de verossimilhanças (LRT) foi usado com a finalidade de comparar os modelos. Nesse teste, um dos modelos é considerado a versão restrita do outro, ou seja, um modelo tem r parâmetros adicionais e o teste verificará se esses parâmetros adicionais melhoram significativamente o modelo. A hipótese a ser testada é de que os dois modelos são equivalentes, ou seja, que os parâmetros extras não diferem de zero. A desvantagem desse teste consiste na limitação de comparar apenas dois modelos por vez.

3.6 Variância genética e herdabilidade

Uma vez que os modelos mais prováveis para explicar a variação dos dados sejam ajustados, é possível estimar os parâmetros genéticos de interesse, tais como

variância genética (eq. (4)) e herdabilidade (eq. (5)). A estimativa dos parâmetros é realizada para cada um dos anos de avaliação que correspondem a isolados bacterianos diferentes. A herdabilidade estimada é a do tipo ampla a nível de médias.

$$\sigma_f^2 = \sigma_g^2 + \frac{\sigma^2}{r} \quad (4)$$

$$h_a^2 = \frac{100\sigma_g^2}{\sigma_f^2} \quad (5)$$

Onde:

h_a^2 é a herdabilidade ampla a nível de médias;

σ_g^2 é a estimativa da variância genotípica;

σ_f^2 é a variância fenotípica a nível de médias;

σ^2 é a estimativa da variância residual;

r é o número de repetições por tratamento.

3.7 Mapa de ligação

No presente estudo, utilizou-se o mapa de genético integrado obtido por Pereira et al. (2013) que é baseado na análise de segregação de 180 indivíduos da população F_1 contendo 549 marcadores, sendo 376 AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*), 115 M-AFLP (Microsatélite – AFLP), 51 SSR (*Simple Sequence Repeats*), 5 RGA (*Resistance Genes Analogs*), 1 SSR-SSCP (SSR – *Singlestrand Conformation Polymorphisms*) e 1 SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*), alocados em nove grupos de ligação sendo 2% deles com segregação 1:1:1:1, 1,3% com segregação 1:2:1, 27,3% com segregação 3:1 e 69,4% 1:1. O comprimento total do mapa é 2073,0 cM e a distância média entre marcadores de 3,8 cM. O mapa é apresentado na Figura 6.

Figura 6 – Mapa de ligação do maracujazeiro-doce. Os grupos de ligação basearam-se em AFLP (preto), M-AFLP (verde), SSR (vermelho), RGA (azul), SSCP e SNP (ambos em rosa)

3.8 Detecção de QTLs associados à resposta à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

As análises de QTL foram realizadas utilizando-se as médias fenotípicas ajustadas dos caracteres área de necrose e de lesão correspondentes à resposta dos 100 genótipos de maracujazeiro-doce à infecção por *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Para tanto, foram utilizados os dados fenotípicos coletados no ano de 2012, em que a população foi inoculada com o isolado PA8-2 e no ano de 2013 em que população foi inoculada com o isolado AP302. Importante ressaltar que os dados fenotípicos obtidos por Braga (2011) referentes à inoculação realizada em 2010 com o isolado M129 também foram reanalisados e incorporados ao estudo de mapeamento.

Como dito, o mapeamento por intervalo composto tomou por base o mapa de ligação de *P. alata* apresentado na Figura 6 e o modelo genético-estatístico proposto por Gazaffi et al. (2014) para progênie de irmãos-completos oriundos de genitores diplóides não-endogâmicos, incluindo os marcadores como cofatores (ou covariáveis). Assim, a busca por QTL, dentro de determinado intervalo, para cada posição assumida, é realizada controlando os efeitos externos que possam causar a detecção equivocada de associações. São considerados os marcadores que apresentam associações significativas com os fenótipos, sendo que a quantidade de marcas pode ser ajustada com base nos critérios de seleção de variáveis; no presente trabalho, a seleção dos marcadores/cofatores foi feita com base no critério AIC.

A partir de uma progênie de irmãos-completos oriunda do cruzamento dos genitores P e Q, não aparentados (Figura 7), diplóides e com mapa de ligação conhecido, sendo m e m+1 os marcadores que flanqueiam um intervalo definido, com alelos 1 ou 2, é possível obter 4 diferentes arranjos para os genótipos desse locus $P^{\{1,2\}}_m, P^{\{1,2\}}_{m+1}, Q^{\{1,2\}}_m, Q^{\{1,2\}}_{m+1}$, 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.

Figura 7 - Representação do cruzamento entre os genitores P e Q , com os quatro arranjos para os genótipos dos locos quantitativos $P\{1,2\}_m$, $P\{1,2\}_{m+1}$, $Q\{1,2\}_m$, $Q\{1,2\}_{m+1}$, sendo os alelos dos marcadores m e $m+1$, e P^1 , P^2 , Q^1 e Q^2 os alelos dos QTL

O modelo estatístico tem como premissa a presença de pelo menos um QTL segregando na progênie. A configuração genotípica do QTL (heterozigótico) nos genitores 2(12) e SV3, respectivamente, contem os alelos P^1P^2 e Q^1Q^2 , os quais segregam na progênie dando origem a quatro classes genotípicas na proporção 1:1:1:1, que são: P^1Q^1 , P^1Q^2 , P^2Q^1 e P^2Q^2 . Portanto, é possível definir três contrastes ortogonais entre as médias genotípicas destas classes:

$$\begin{aligned}\alpha_p^* &= P^1Q^1 + P^1Q^2 - P^2Q^1 - P^2Q^2 \\ \alpha_q^* &= P^1Q^1 - P^1Q^2 + P^2Q^1 - P^2Q^2 \\ \delta_{pq}^* &= P^1Q^1 - P^1Q^2 - P^2Q^1 + P^2Q^2\end{aligned}\tag{6}$$

Os dois primeiros contrastes referem-se aos efeitos aditivos dos QTL nos genitores P e Q , respectivamente, e o terceiro contraste refere-se à dominância entre os efeitos aditivos de cada genitor. A probabilidade de ocorrência de cada classe será obtida por abordagem multiponto, e a seleção dos cofatores, por regressão linear múltipla, via "stepwise", utilizando critério bayesiano, conforme descrito por Gazaffi (2009), sendo o genótipo de cada QTL inferido com base nos genótipos dos marcadores flaqueadores. O modelo estatístico adotado é descrito à seguir (eq.(7)):

$$y_j = Z_j\gamma + \alpha_p^*x_{pj}^* + \alpha_q^*x_{qj}^* + \delta_{pq}^*x_{pj}^*x_{qj}^* + \varepsilon_j\tag{7}$$

y_j é o valor fenotípico do j -ésimo indivíduo, sendo $j = 1, 2, \dots, n$;

Z_j é a linha j da matriz indicadora Z (cofatores), contendo as variáveis indicadoras dos genótipos dos marcadores que estão fora da região em mapeamento;

γ é o vetor de parâmetros contendo o intercepto e os coeficientes de regressão linear múltipla para os cofatores;

α_p^* é o efeito aditivo para o QTL no genitor P , 2(12);

α_q^* é o efeito aditivo para o QTL no genitor Q , SV3;

δ_{pq}^* é o efeito de dominância entre os alelos do loco considerado;

ε_j é o erro experimental.

Como já dito, na análise, o genitor P refere-se a 2(12) e o genitor Q refere-se a SV3. Na Tabela 6 são apresentados os valores que x_{pj}^* e x_{qj}^* podem assumir.

Tabela 6 – Valores de x_{pj}^* e x_{qj}^* de acordo com a configuração genotípica dos genitores P e Q

Condição	Valor	
	x_{pj}^*	x_{qj}^*
$P^1 Q^1$	1	1
$P^1 Q^2$	1	-1
$P^2 Q^1$	-1	1
$P^2 Q^2$	-1	-1

O modelo verifica a existência de QTL através do teste de razão de verossimilhança (LTR, porém convertida em "LOD-score", LOD, qual foi obtido usando nível de significância de 0,95 e 1000 permutações, de acordo com Chen e Storey, 2006)) considerando a hipótese alternativa (H_a) em que pelo menos um dos efeitos difere de zero, contra a hipótese nula (H_0) em que os efeitos são nulos.

A segregação dos QTL depende das relações de dominância entre os alelos. Para inferi-las, diversas hipóteses estatísticas apropriadas foram definidas por Gazaffi (2009). Tais hipóteses foram testadas apenas nas posições para as quais QTL são mapeados numa primeira etapa, evitando, dessa forma, os problemas de realização de múltiplos testes. Por isso, foi estabelecido um procedimento em duas etapas, identificando os efeitos, a fase de ligação e o padrão de segregação dos QTL.

Na primeira etapa, uma vez que consiste na busca pelo genoma por possíveis QTL, testa-se simultaneamente a significância dos efeitos α_p^* , α_q^* e δ_{pq}^* . Nas posições com evidências da presença de QTL, testes complementares são conduzidos para verificar quais dos efeitos são significativos:

$$H_1: \alpha_p^* = 0 \quad (8)$$

$$H_2: \alpha_q^* = 0$$

$$H_3: \delta_{pq}^* = 0$$

Se apenas um dos efeitos for significativo, conclui-se que a segregação é de 1:1. Caso haja dois ou três efeitos significativos, são realizados, respectivamente mais um ou três testes complementares.

$$H_4: |\alpha_p^*| = |\alpha_q^*| \quad (9)$$

$$H_5: |\alpha_p^*| = |\delta_{pq}^*|$$

$$H_6: |\alpha_q^*| = |\delta_{pq}^*|$$

Para o mapeamento de QTL foi usado o pacote *fullsibQTL* em que os modelos aqui apresentados estão implementados. Este pacote é o único disponível para realização de mapeamento de QTL em progênies F_1 segregantes (GAZAFFI et al., 2014).

4 RESULTADOS

4.1 Condições ambientais

Na Figura 8 é apresentado o gráfico de temperatura e umidade, durante os meses de jan/fev/mar/abr nos anos de 2010, 2012 e 2013. A temperatura e umidade mantiveram-se de acordo com o esperado para o período em que ocorreram as inoculações e avaliações. A Figura 9 mostra o experimento de 2012 disposto na casa de vegetação. Durante o período em que as plantas permaneceram na casa de vegetação os tratos culturais foram realizados, sem nenhum problema aparente que pudesse causar danos ou falhas experimentais.

Figura 8 - Umidades relativas (em azul, valores no eixo da direita) e temperatura (em vermelho, valores correspondentes ao eixo da esquerda) diárias, no ambiente dos experimentos, durante o período de 01/01/2010 a 22/04/2013. Os marcadores ■ e ▲ indicam, respectivamente, a data inicial de cada inoculação e a data de início de avaliação, em cada ano

Figura 9 – Condução da população de mapeamento em casa de vegetação

4.2 Reação dos genótipos de maracujazeiro-doce à inoculação bacteriana

Os isolados produziram lesões características nas folhas em que foram inoculados, na Figura 10 são visualizadas lesões obtidas nas folhas do genótipo SV3, no ano de 2013 com a inoculação do patógeno AP302.

Figura 10 – Lesões típicas no genótipo SV3 aos 14 dai com o isolado AP302 de *X. axonopodis*

Quantificação da área foliar

O procedimento de captura das imagens foi realizado aos 14 dias após a inoculação (dai). Aos oito dias já foi possível verificar a formação de um halo amarelo, referente ao sintoma de clorose nas folhas inoculadas e, aos 14 dias, a maioria das plantas já apresentava lesões típicas formadas por áreas de clorose e necrose. Após os 14 dias, as folhas inoculadas sofreram queda, fenômeno esse atribuído à resposta de resistência do hospedeiro à invasão pelo patógeno.

O processamento computacional das imagens exigiram cautela e paciência. As 816 imagens tiveram suas áreas delineadas com cuidado na tentativa de minimizar erros na mensuração. A metodologia proposta por Braga (2011) utilizada nesse trabalho mostrou-se adequada para o tratamento das imagens e consequente mensuração das áreas lesionadas pelo patógeno.

Após os procedimentos de tratamento de imagem e cálculo das áreas foliares, os dados foram organizados para que fossem conduzidas as análises estatísticas.

O tamanho das áreas de necrose variou de 0,00 cm² a 3,55 cm² no ano de 2012 em resposta ao isolado PA8-2 e de 0,00 cm² a 14,19 cm² no ano de 2013 em resposta ao isolado AP302. No ano de 2010, a variação observada por Braga (2011) foi de 0,00 cm² a 12,64 cm², em resposta ao isolado M129. Nota-se que a ocorrência de valores zero ou muito próximos de zero foi verificada para este caráter (necrose), entretanto como as plantas continham áreas lesionadas bem distinguíveis, esses valores também foram incluídos na análise estatística.

O tamanho das áreas foliares lesionadas variou de 0,16 cm² a 18,14 cm² no ano de 2012 (PA8-2) e 0,21 cm² a 52,24 cm² no ano de 2013 (AP302). No ano de 2010 a variação observada por Braga (2011) foi de 0,27 cm² a 22,42 cm² (M129).

Nas figuras 11 e 12 são visualizadas imagens tratadas a partir das folhas dos genitores, 2(12) e SV3 e dos genótipos de maior e menor área nominal afetada, sendo respectivamente o 17 e o 95 para o ano de 2012 (PA8-2) e o 53 e o 124 para o ano de 2013 (AP302).

Figura 11 – Tratamento das imagens de alguns dos genótipos afetados, 14 dai com o isolado PA8-2, no ano de 2012. A área foliar está dividida em sadia (verde), clorose (amarelo) e necrose (vermelho), sendo que as duas últimas constituem a área de lesão. Em azul, o retângulo de 3x1 cm representa a escala

Figura 12 – Tratamento das imagens de alguns dos genótipos afetados, 14 dai com o isolado AP302, no ano de 2013. A área foliar está dividida em sadia (verde), clorose (amarelo) e necrose (vermelho), sendo que as duas últimas constituem a área de lesão. Em azul, o retângulo de 3x1 cm representa a escala

4.3 Análise estatística dos dados

4.3.1 Análise exploratória

Através dos gráficos de dispersão, distribuições de probabilidades e correlações envolvendo as variáveis sadia, clorose, necrose, lesão e total (Figura 13) é possível observar que existe uma tendência linear positiva e clara entre as áreas sadia e total das folhas.

Figura 13 - Gráficos de dispersão, distribuições de probabilidades e correlações envolvendo todas as variáveis (2 a 2)

Entre as áreas afetadas pela presença do patógeno é possível observar tendências lineares entre clorose e lesão e entre necrose e lesão. Nenhuma tendência clara é verificada entre as áreas sadia e total com as demais áreas afetadas pelo patógeno.

Os gráficos de dispersão (Figura 13) mostram que os dados apresentam tanto pontos de alavanca (observações discrepantes tendo como base o eixo x) quanto pontos outliers (observações discrepantes tendo como base o eixo y), sendo que nenhum dado foi desconsiderado nas análises, pois se observou que os mesmos são eventuais respostas dos genótipos às condições experimentais.

Apenas as áreas sadia e total apresentaram distribuições que parecem se aproximar do modelo normal. No entanto, é importante lembrar que as pressuposições de normalidade se referem à análise dos resíduos obtidos a partir de um modelo estatístico ajustado, não sendo apropriado julgar se os métodos tradicionais podem ser empregados com base na distribuição dos dados originais. Esses resultados fornecem apenas uma ideia do comportamento e da distribuição dos dados, tendo sido necessário investiga-los com maior acuidade.

Na Figura 13 é possível observar os coeficientes de correlação de Pearson entre todas as variáveis (duas a duas). Para evitar o erro do tipo I, em que certas correlações possam ser indevidamente consideradas como significativas, foi usada uma correção, sendo mais apropriado o procedimento de Bonferroni (Tabela 7).

Tabela 7 – Coeficiente de correlação de Pearson entre todas as variáveis (2 a 2) usando o procedimento de correção de Bonferroni com nível de significância de 5%

Variável 1	Variável 2	Coeficiente de Correlação	p-vr	Significância
Sadia	Total	0,99	0.000e+00	*
Sadia	Lesão	-0,16	3,145e-08	*
Sadia	Clorose	-0,15	2,475e-07	*
Sadia	Necrose	-0,13	7,852e-06	*
Clorose	Necrose	0,54	0,000e+00	*
Clorose	Lesão	0,94	0,000e+00	*
Clorose	Total	-0,01	6,846e-01	ns
Necrose	Lesão	0,79	0,000e+00	*
Necrose	Total	-0,01	6,249e-01	ns
Lesão	Total	-0,01	6,246e-01	ns

Levando em conta o procedimento de Bonferroni, apenas as correlações entre as variáveis lesão e total, necrose e total e clorose e total não foram estatisticamente significativas. No entanto, quatro correlações foram estatisticamente significativas: moderada a fortemente positiva, sadia e total (0,99); clorose e lesão (0,94); necrose e lesão (0,79); e clorose e necrose (0,54); e três

fracamente negativas, sadia e lesão (-0,16); sadia e clorose (-0,15); e sadia e necrose (-0,13). Isto sugere que informações de ambas, simultaneamente, podem ser consideradas redundantes. A correlação negativa entre a área sadia e as demais áreas afetadas faz sentido, visto que o aumento de uma acarreta a diminuição da outra área. Maiores ou menores redundâncias dependem dos graus de correlações encontrados e no presente estudo os ajustes estatísticos foram realizados para as variáveis necrose e lesão, visto que o principal objetivo foi mapear QTL relacionados à resposta da população de maracujazeiro-doce à inoculação por *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. A utilização de modelos mistos em genética quantitativa permite a estimativa de parâmetros genéticos importantes, como variância genética e herdabilidade, de forma mais adequada (veja MEYER, 2007). As plantas inoculadas com o patógeno permaneceram em casa de vegetação pelo período de 11 meses e a folha inoculada foi a quinta a partir do ápice. Mesmo com a padronização de idade das plantas e posição das folhas, algumas se apresentaram maiores, consequentemente mais velhas e por esse motivo o tamanho da folha foi utilizado como covariável para a seleção do modelo.

4.3.2 Ajuste de Modelos: análise dos resíduos

Para que fosse possível investigar a distribuição dos resíduos dos caracteres necrose e lesão considerou-se quatro estruturas de variâncias e covariâncias para as matrizes dos efeitos aleatórios (**G**) e residuais (**R**), ilustradas na Tabela 8. Esta análise preliminar teve como principal objetivo verificar a distribuição residual quanto aos padrões de normalidade.

Tabela 8 – Estruturas de variâncias e covariâncias para as matrizes dos efeitos aleatórios (**G**) e residuais (**R**) utilizados para o caráter necrose e lesão

Modelo	Matriz efeitos aleatórios (G)	Matriz de efeitos residuais (R)
1	Identidade	Simetria composta heterogênea
2	Diagonal	Simetria composta heterogênea
3	Identidade	Autoregressiva de ordem 1 heterogênea
4	Diagonal	Autoregressiva de ordem 1 heterogênea

A Figura 14 apresenta os gráficos dos resíduos contra os valores preditos dos quatro modelos mistos ajustados para a variável necrose. Apesar dos resíduos terem

mostrado padrões relativamente aleatórios, em alguns segmentos das dispersões há ainda fortes concentrações entre os resíduos, visualizadas nas grandes massas escuras de pontos.

Figura 14 – Resíduos ordinários contra valores preditos dos quatro modelos mistos testados para a variável necrose

Para a variável lesão também foram observadas fortes concentrações de resíduos, mesmo após o uso de modelos supostamente mais confiáveis que consideram diferentes estruturas de matrizes para explicar a variação dos dados (Figura 15).

Figura 15 – Resíduos ordinários contra valores preditos dos quatro modelos mistos testados para a variável lesão

Esses padrões sugerem a ausência de normalidade dos resíduos, e por isso foi aplicado o teste de Shapiro-Wilks para os quatro modelos mistos ajustados (Tabela 9), confirmando que os resíduos não apresentavam distribuição normal. Daí procedeu-se a transformação dos dados com base no procedimento de Box-Cox.

Tabela 9 – Teste de Shapiro-Wilks (W) para as variáveis necrose e lesão

Modelo	W		p-vr
	Necrose	Lesão	
1	0,6498	0,7383	2,2e-16
2	0,7614	0,8015	2,2e-16
3	0,6754	0,7368	2,2e-16
4	0,7377	0,7802	2,2e-16

Transformação dos dados – necrose e lesão

A Figura 16 mostra os perfis de verossimilhança correspondentes à transformação de Box-Cox. Para a variável necrose o valor de λ mais provável à luz dos dados originais correspondeu a -1,2. Para a variável lesão o valor de λ mais provável à luz dos dados originais correspondeu a -0,2.

Figura 16 – Perfis de verossimilhança correspondentes as transformações Box-Cox para as variáveis necrose (à esquerda) e lesão (à direita)

Ajustando um modelo fixo tradicional a partir dos dados transformados foi possível obter um novo conjunto de resíduos que são visualizados na Figura 17 na qual se nota que a distribuição apresentou-se mais aleatória em torno do eixo médio e com uma amplitude mais constante.

Contudo, é possível observar que padrões de dispersão ainda se mantiveram, sugerindo que as variâncias residuais podem não ser homogêneas e que os resíduos podem estar correlacionados. Com isso, foram investigadas novas estruturas de variâncias e covariâncias dos efeitos aleatórios para definir o modelo mais plausível para as variáveis necrose e para lesão.

Figura 17 – Resíduos contra os valores preditos e QQPlots dos modelos com transformação para as variáveis necrose e lesão

Ajuste do modelo misto para a variável necrose

A análise do 1º modelo ajustado Mod1.necrose (Figura 18) não indicou haver distribuição aleatória dos resíduos em torno da média e amplitude constante em torno do eixo y. No caso da amplitude ocorreu um aumento para o eixo correspondente aos valores preditos, diminuindo a partir desse valor. Logo, pode-se dizer que houve um afunilamento dos resíduos com o aumento dos valores preditos, sugerindo que não apresentaram homogeneidade de variancias e ausência de correlações residuais.

O gráfico de QQPlot dos resíduos do modelo Mod1.necrose (Figura 18) mostrou que a vasta maioria coincidiu com a reta linear (em vermelho) correspondente à quantidade esperada, sugerindo que os resíduos tenderam à distribuição normal.

Figura 18 – Resíduos ordinários contra valores preditos e QQPlot dos resíduos ordinários: Mod1.necrose

As variâncias genéticas para os três isolados M129 (2010), PA8-2 (2012) e AP302 (2013) foram iguais a 0,04336, enquanto as covariâncias foram nulas, demonstrando a estrutura do modelo considerado.

A análise de resíduos e diagnósticos do modelo Mod2.necrose é apresentada na Figura 19. Assim como foi visto no modelo anterior, os resíduos não parecem indicar distribuição aleatória em torno da média nula, apesar da amplitude poder ser considerada como constante ao longo do eixo y.

O gráfico de QQPlot dos resíduos do modelo Mod2.necrose é mostrado na Figura 19. Como foi observado para o modelo anterior, a vasta maioria dos resíduos coincidiu com a reta linear (em vermelho) correspondente à quantidade esperada, sugerindo que os mesmos tenderam à distribuição normal.

Figura 19 – Resíduos ordinários contra valores preditos e QQPlot dos resíduos ordinários: Mod2.necrose

A estrutura da matriz de variâncias e covariâncias dos efeitos aleatórios do modelo Mod2.necrose apresentou variâncias genéticas diferentes para os três isolados sendo iguais a 0,07554 (M129), 1,622e-09 (PA8-2) e 0,08033 (AP302), mostrando que a variância genética para o isolado PA8-2 (2012) foi bastante inferior, considerando este modelo. As covariâncias entre os isolados (anos) continuam sendo nulas, de acordo com a estrutura esperada para o modelo proposto (*Diagonal*) e a matriz de correlações genéticas entre os isolados 2 a 2 apresentou correlações genéticas nulas.

A comparação entre os modelos Mod1.necrose e Mod2.necrose, usando os critérios AIC e BIC, mostrou que o 2º se ajustou melhor à variação dos dados. Isto significa que o modelo que considerou variâncias genéticas diferentes para os isolados M129 (2010), PA8-2 (2012) e AP302 (2013) foi o mais provável comparativamente ao que considerou variâncias genéticas iguais. Na Tabela 10 verificam-se os menores valores de AIC e BIC para o modelo Mod2.necrose, bem como o p-valor significativo ($< .0001$) para o teste de razão de verossimilhança.

Tabela 10 – Valores de AIC, BIC, logaritmo da função de verossimilhança e teste da razão de verossimilhança (LRT)

	AIC	BIC	LogLik	Comparações	LRT	p-vr
Mod1.necrose	1.904	1.950	-943,2	Mod1 vs Mod2	32,75*	<,0001
Mod2.necrose	1.876	1.931	-926,8			

A análise de resíduos e diagnósticos do modelo Mod3.necrose é apresentada na Figura 20. Novamente, os resíduos não mostraram uma distribuição aleatória em relação ao eixo médio, apesar da amplitude poder ser considerada como constante ao longo do eixo y. Uma inspeção mais apurada do gráfico mostra que os resíduos tenderam a se agrupar até mais ou menos o valor de 1,5 para os preditos; estas tendências sugerem que os padrões dos resíduos podem estar mais relacionados à heterogeneidade de variâncias do que às correlações propriamente ditas.

O gráfico de QQPlot dos resíduos do modelo Mod3.necrose é mostrado na Figura 20. Como nos modelos anteriores, foi possível observar que a maioria dos resíduos coincidiu com a reta linear (em vermelho) correspondente à quantidade esperada, sugerindo que os mesmos tenderam à distribuição normal.

Figura 20 - Resíduos ordinários contra valores preditos e QQPlot dos resíduos ordinários: Mod3.necrose

As variâncias genéticas para os três isolados M129 (2010), PA8-2 (2012) e AP302 (2013) foram iguais a 0,04299, diferente do modelo anterior que apresentou variâncias genéticas diferentes para os três isolados. Além disso, também foi possível notar a presença de covariâncias genéticas iguais (0,01755) entre os três isolados (anos) 2 a 2, algo que não foi considerado no modelo anterior, no qual as covariâncias genéticas foram nulas entre os isolados. A matriz de correlações genéticas entre os isolados (anos) apresentou correlações genéticas iguais a 0,4083, seguindo a estrutura do modelo proposto (*Simetria composta homogênea*).

Comparando o modelo Mod3.necrose com o modelo Mod2.necrose (Tabela 11), considerado mais provável até então, verifica-se que o modelo Mod2.necrose

continuou melhor explicando a variação dos dados, pois possui menores valores de AIC e BIC, além de um valor maior de verossimilhança (-926,8), sendo, portanto, o mais provável.

Tabela 11 – Valores de AIC, BIC, logaritmo da função de verossimilhança e teste da razão de verossimilhança (LRT)

	AIC	BIC	LogLik	Comparações	LRT	p-vr
Mod2.necrose	1.876	1.931	-926.8	Mod2 vs Mod3	25.59*	<.0001
Mod3.necrose	1.899	1.950	-939.6			

A análise de resíduos e diagnósticos do modelo Mod4.necrose é apresentada na Figura 21. Observou-se que os resíduos mostraram uma distribuição levemente mais aleatória em relação ao eixo médio, além de apresentarem amplitude que pode ser considerada como constante ao longo do eixo y.

O gráfico de QQPlot dos resíduos do modelo Mod4.necrose (Figura 21) mostrou que a maioria coincidiu com a reta linear (em vermelho) correspondente à quantidade esperada, sugerindo que os mesmos tenderam à distribuição normal.

Figura 21 - Resíduos ordinários contra valores preditos e QQPlot dos resíduos ordinários: Mod4.necrose

As variâncias genéticas para os três isolados M129 (2010), PA8-2 (2012) e AP302 (2013) foram diferentes, sendo 0,07632, 0,001613 e 0,079534, respectivamente, mostrando que a variância genética relativa ao isolado PA8-2 (2012) foi bastante inferior as demais. Além disso, também foi possível notar a presença de covariâncias genéticas diferentes entre os três isolados 2 a 2, sendo

0,011093 entre os isolados M129 (2010) e PA8-2 (2012), 0,032881 entre os isolados M129 (2010) e AP302 (2013), e, por fim, 0,004902 entre os isolados PA8-2 (2012) e AP302 (2013). A matriz de correlações genéticas apresenta valores diferentes entre os pares de isolados, sendo 0,9999 entre os isolados M129 (2010) e PA8-2 (2012), 0,4220 entre os isolados M129 (2010) e AP302 (2013) e 0,4329 entre os isolados PA8-2 (2012) e AP302 (2013).

Comparando-se o modelo Mod4.necrose com o modelo Mod2.necrose (Tabela 12), mais provável até então, verifica-se que o modelo Mod4.necrose se ajustou e explicou melhor a variação dos dados. Apesar do valor de BIC ter sido menor para o modelo Mod2.necrose, a quantidade de parâmetros computada foi inferior comparativamente ao modelo Mod4.necrose. No entanto, o modelo Mod4.necrose apresentou menor valor de AIC e, também, maior verossimilhança (-923,1), sugerindo que, de fato, pode ser considerado o mais provável.

Tabela 12 - Valores de AIC, BIC, logaritmo da função de verossimilhança e teste da razão de verossimilhança (LRT)

	AIC	BIC	LogLik	Comparações	LRT	p-vr
Mod2.necrose	1.876	1.931	-926,8	Mod2 vs Mod4	7,458*	0,0586
Mod4.necrose	1.874	1.945	-923,1			

O ajuste do modelo Mod5.necrose não atingiu convergência, de modo que não pôde ser computado, provavelmente, em função da grande quantidade de parâmetros a ser estimada, algo intratável do ponto de vista computacional. De maneira geral, é mais recomendado buscar modelos mais parcimoniosos e menos complexos para explicar de forma simplificada uma realidade complexa.

A análise de resíduos e diagnósticos do modelo Mod6.necrose (Figura 22) evidenciou uma distribuição mais aleatória em torno do eixo médio, com amplitude considerada como constante ao longo do eixo y.

O gráfico de QQPlot dos resíduos do modelo Mod6.necrose (Figura 22) mostrou que a maioria dos resíduos coincidiu com a reta linear (em vermelho) correspondente à quantidade esperada, sugerindo que tendem à distribuição normal. Os desvios das quantidades observadas em relação à reta linear (em vermelho) pareceram ser ainda menores comparativamente aos desvios dos modelos anteriores.

Figura 22 - Resíduos ordinários contra valores preditos e QQPlot dos resíduos ordinários: Mod6.necrose

As variâncias genéticas estimadas para os isolados M129 (2010), PA8-2 (2012) e AP302 (2013) foram 0,09833, 0,009077 e 0,10016, respectivamente. Nesse caso, foi possível verificar que a variância genética para o isolado PA8-2 (2012) foi bastante inferior comparativamente aos demais. Além disso, também foi possível notar a presença de covariâncias genéticas diferentes entre os três isolados 2 a 2, sendo 0,029109 entre os isolados M129 (2010) e PA8-2 (2012), 0,00,05510 entre os isolados M129 (2010) e AP302 (2013), e, por fim, 0,02195 entre os isolados PA8-2 (2012) e AP302 (2013). A matriz das correlações genéticas apresentou valores diferentes entre os pares de isolados (anos), sendo 0,9744 entre os isolados M129 (2010) e PA8-2 (2012), 0,5553 entre os isolados M129 (2010) e AP302 (2013) e 0,7281 entre os isolados PA8-2 (2012) e AP302 (2013).

A comparação entre os modelos Mod6.necrose e Mod4.necrose (Tabela 13), evidenciou que o Mod6.necrose se ajustou e explicou melhor a variação dos dados. Isso pode ser constatado com base no menor valor de AIC e na maior verossimilhança do modelo Mod6.necrose (-920.3), apesar do valor de BIC ter sido pouco superior para este modelo em função da maior quantidade de parâmetros.

Tabela 13 - Valores de AIC, BIC, logaritmo da função de verossimilhança e teste da razão de verossimilhança (LRT)

	AIC	BIC	LogLik	Comparações	LRT	p-vr
Mod4.necrose	1.874	1.945	-923,1	Mod4 vs Mod6	5,455	0,0195
Mod6.necrose	1.871	1.947	-920,3			

A análise de resíduos e diagnósticos do modelo Mod7.necrose (Figura 23) evidenciou que os resíduos deste modelo não mostram distribuição aleatória em torno da média zero, apesar da amplitude poder ser considerada como constante ao longo do eixo y.

O gráfico de QQPlot dos resíduos do modelo Mod7.necrose (Figura 23) mostrou que a maioria dos resíduos coincidiu com a reta linear (em vermelho) correspondente à quantidade esperada, sugerindo tendência à distribuição normal.

Figura 23 - Resíduos ordinários contra valores preditos e QQPlot dos resíduos ordinários: Mod7.necrose

A matriz de variâncias e covariâncias dos efeitos apresentou variâncias genéticas estimadas diferentes para os isolados M129 (2010), PA8-2 (2012) e AP302 (2013), sendo 0,07999, 0,001860 e 0,083333, respectivamente. Verificou-se que a variância genética para o isolado PA8-2 (2012) foi bastante inferior comparativamente aos demais. Além disso, também foi possível notar a presença de covariâncias genéticas diferentes entre os três isolados 2 a 2, sendo 0,012194 entre os isolados M129 (2010) e PA8-2 (2012), 0,032695 entre os isolados M129 (2010) e AP302 (2013), e, por fim, 0,005241 entre os isolados PA8-2 (2012) e AP302 (2013).

A matriz de correlações genéticas entre os isolados (anos) 2 a 2 mostrou correlações genéticas diferentes entre os pares de isolados, sendo 0,9998 entre os isolados M129 (2010) e PA8-2 (2012), 0,4004 entre os isolados M129 (2010) e AP302 (2013), e 0,4209 entre os isolados PA8-2 (2012) e AP302 (2013).

Comparando o modelo Mod7.necrose com o modelo Mod6.necrose (Tabela 14), mais provável até o momento, foi possível verificar que o modelo Mod6.necrose

continuou explicando mais satisfatoriamente a variação dos dados, pois apresentou menores valores de AIC e BIC. Além disso, é importante observar que o teste de razão de verossimilhança não pode ser realizado entre esses modelos, mostrando que os mesmos não são modelos encaixados/aninhados.

Tabela 14 - Valores de AIC, BIC e Logaritmo da função de verossimilhança

	AIC	BIC	LogLik
Mod6.necrose	1.871	1.947	-920,3
Mod7.necrose	1.875	1.951	-922,4

O 8º modelo ajustado (Mod8.necrose) não apresentou convergência e isso provavelmente ocorreu em função da grande quantidade de parâmetros estimados.

Portanto, dentre todos os modelos que foram investigados no presente trabalho, o Mod6.necrose é o mais provável para explicar a variação dos dados de necrose. Os valores genéticos preditos de necrose para os 102 genótipos da população (BLUPs) encontram-se no anexo A e estão graficamente representados na Figura 24.

Figura 24 – BLUPs dos 102 genótipos correspondentes à variável necrose. (a) isolado M129 (2010); (b) isolado PA8-2 (2012); (c) isolado AP302 (2013)

De posse do modelo mais adequado, foi possível investigar os efeitos fixos, representados pelos fatores isolado (ano) e bloco, e pela covariável área total (Tabela 15).

Tabela 15 – Quadro resumo da análise de variância para os efeitos fixos do modelo contendo o valor de F e o p-valor respectivo

Fonte de Variação	F-value	p-vr
Isolado	203	<,0001
Bloco	4	0,0051
Área total	23	<,0001

Com base no resultado do teste F (Tabela 15), verificou-se que os efeitos de bloco, isolado e área total foram estatisticamente significativos ($p \geq 0,05$). Esses resultados sugerem que: i) o delineamento em blocos casualizados foi apropriado para o controle local e, assim, para a realização do experimento; ii) a área de necrose apresentada pelos genótipos diferiu em pelo menos um dos três isolados inoculados; iii) a área total mostrou-se uma covariável importante no modelo, pois, em geral, os genótipos apresentaram áreas foliares de tamanhos diferenciados, podendo sugerir que a área total pode também ser considerada como área disponível para a ação bacteriana.

Ajuste do modelo misto para a variável lesão

A análise de resíduos e diagnósticos do 1º modelo ajustado Mod1.lesão é apresentada na Figura 25. Claramente, os resíduos formaram dois grupos ao centro do gráfico. No entanto, num primeiro momento, a distribuição dos mesmos, em relação à média zero, apresentou-se maneira aleatória, e a amplitude foi considerada constante ao longo do eixo y.

O gráfico de QQPlot dos resíduos do modelo Mod1.lesão (Figura 25) mostra um leve desvio dos resíduos na região superior, contudo a grande maioria dos resíduos coincidiu com a reta linear mostrada (em vermelho), correspondente a quantidade esperada, sugerindo que os mesmos tenderam à distribuição normal.

Figura 25 - Resíduos ordinários contra valores preditos e QQPlot dos resíduos ordinários: Mod1.lesão

As variâncias genéticas para os três isolados M129 (2010), PA8-2 (2012) e AP302 (2013) foram iguais a 0,001587, enquanto as covariâncias foram nulas. A matriz de correlações genéticas apresentou valores nulos de acordo com a estrutura do modelo considerado.

A análise de resíduos e diagnósticos do modelo Mod2.lesão é apresentada na Figura 26. Diferenças pouco perceptíveis foram verificadas em relação ao modelo anterior. Contudo, em geral, a distribuição dos resíduos apresentou-se aleatória em relação a média e a amplitude constante ao longo do eixo y.

O gráfico de QQPlot dos resíduos do modelo Mod2.lesão é mostrado na Figura 26. Como no modelo anterior, foi observado um leve desvio na região superior, mas a vasta maioria dos resíduos coincidiu com a reta linear (em vermelho) correspondente à quantidade esperada, sugerindo que os mesmos tenderam à distribuição normal.

Figura 26 - Resíduos ordinários contra valores preditos e QQPlot dos resíduos ordinários: Mod2.lesão

A estrutura da matriz de variâncias e covariâncias dos efeitos aleatórios do modelo Mod2.lesão apresentou variâncias genéticas diferentes para os três isolados sendo 0,001794 (M129), 0,001629 (PA8-2) e 0,001336 (AP302). As covariâncias entre os isolados (anos) continuam sendo nulas, de acordo com a estrutura esperada para o modelo proposto (*Diagonal*) e a matriz de correlações genéticas entre os isolados (anos) 2 a 2 apresentou correlações genéticas nulas.

A comparação entre os modelos Mod1.lesão e Mod2.lesão (Tabela 16), usando os critérios AIC e BIC, mostrou que o 1º se ajustou melhor à variação dos dados. Isto foi constatado pelos menores valores de AIC e BIC para o modelo Mod1.lesão, bem como o teste de razão de verossimilhança que não foi estatisticamente significativo.

Tabela 16 – Valores de AIC, BIC, logaritmo da função de verossimilhança e teste da razão de verossimilhança (LRT)

	AIC	BIC	LogLik	Comparação	LRT	p-vr
Mod1.lesão	-1.333	-1.288	675,7	Mod1 vs Mod2	0,1592	0,9235
Mod2.lesão	-1.330	-1.274	675,8			

A análise de resíduos e diagnósticos do modelo Mod3.lesão é apresentada na Figura 27. Novamente, diferenças pouco perceptíveis foram verificadas em relação aos modelos anteriores, mostrando que os padrões mantiveram-se bastante similares.

O gráfico de QQPlot dos resíduos do modelo Mod3.lesão é mostrado na Figura 27. Como nos modelos anteriores, observou-se um leve desvio dos resíduos

na região superior do gráfico, entretanto, a maioria dos resíduos coincidiu com a reta linear (em vermelho) correspondente à quantidade esperada, sugerindo que os mesmos tenderam à distribuição normal.

Figura 27 - Resíduos ordinários contra valores preditos e QQPlot dos resíduos ordinários: Mod3.lesão

As variâncias genéticas para os três isolados M129 (2010), PA8-2 (2012) e AP302 (2013) foram iguais a 0,0015725. Assim como as covariâncias genéticas, que foram iguais a 0,0009041. As correlações genéticas entre os isolados (anos) 2 a 2 foram iguais a 0,575, de acordo com o modelo proposto de *Simetria composta homogênea*.

Comparando o modelo Mod3.lesão com o modelo Mod1.lesão (Tabela 17), considerado mais provável até o momento, verificou-se que o modelo Mod3.lesão se ajustou e explicou mais satisfatoriamente a variação dos dados, isso pode ser constatado pelo menor valor de AIC e na maior verossimilhança do modelo, bem como no teste de razões de verossimilhança que foi significativo a 5% de nível de significância.

Tabela 17 – Valores de AIC, BIC, logaritmo da função de verossimilhança e teste da razão de verossimilhança (LRT)

	AIC	BIC	LogLik	Comparações	LRT	p-vr
Mod1.lesão	-1.333	-1.288	675,7	Mod1 vs Mod3	6,672*	0,0098
Mod3.lesão	-1.338	-1.288	679,0			

A análise de resíduos e diagnósticos do modelo Mod4.lesão é apresentada na Figura 28. Foi possível observar que os resíduos mostraram uma distribuição levemente mais aleatória em relação aos demais modelos apresentados até o momento.

O gráfico de QQPlot dos resíduos do modelo Mod4.lesão (Figura 28) mostrou, como nos modelos anteriores, um leve desvio foi observado na região superior do gráfico, entretanto, a maioria dos resíduos coincidiu com a reta linear (em vermelho) correspondente à quantidade esperada, sugerindo que os mesmos tenderam à distribuição normal.

Figura 28 - Resíduos ordinários contra valores preditos e QQPlot dos resíduos ordinários: Mod4.lesão

As variâncias genéticas foram diferentes para os três isolados M129 (2010), PA8-2 (2012) e AP302 (2013) sendo 0,0018318, 0,0015711 e 0,0013120, respectivamente. Da mesma forma, as covariâncias genéticas entre os pares de isolados apresenta valores diferentes, sendo 0,0013476 entre os isolados M129 (2010) e PA8-2 (2012), 0,0005808 entre os isolados M129 (2010) e AP302 (2013), e 0,0008192 entre os isolados PA8-2 (2012) e AP302 (2013).

A matriz de correlações genéticas do modelo Mod4.lesão apresentou valores diferentes entre os isolados M129 (2010) e PA8-2 (2012), M129 (2010) e AP302 (2013), e PA8-2 (2012) e AP302 (2013), correspondendo a 0,7944, 0,3747 e 0,5706, respectivamente.

Comparando o modelo Mod4.lesão com o modelo Mod3.lesão (Tabela 18), mais provável até então, verificou-se que o modelo Mod3.lesão continua sendo o

que se ajustou e explicou melhor a variação dos dados. Isso foi constatado pelos menores valores de AIC e BIC, bem como no teste de razão de verossimilhanças que não foi estatisticamente significativo a 5% de nível de significância.

Tabela 18 - Valores de AIC, BIC, logaritmo da função de verossimilhança e teste da razão de verossimilhança (LRT)

	AIC	BIC	LogLik	Comparação	LRT	p-vr
Mod3.lesão	-1.338	-1.288	679.0	Mod3 vs Mod4	1.17	0.8831
Mod4.lesão	-1.331	-1.260	679.6			

A análise de resíduos e diagnósticos do modelo Mod5.lesão (Figura 29) evidenciou uma distribuição mais aleatória em torno do eixo médio comparativamente aos modelos anteriores.

O gráfico de QQPlot dos resíduos do modelo Mod5.lesão (Figura 29) mostrou que, apesar de apresentar um leve desvio na região superior do gráfico, a maioria dos resíduos coincidiu com a reta linear (em vermelho) correspondente à quantidade esperada, sugerindo que os mesmos tenderam à distribuição normal.

Figura 29 - Resíduos ordinários contra valores preditos e QQPlot dos resíduos ordinários: Mod5.lesão

As variâncias genéticas para os isolados M129 (2010), PA8-2 (2012) e AP302 (2013) foram iguais a 0,0017056. Da mesma forma, as covariâncias genéticas entre os isolados M129 (2010) e PA8-2 (2012), M129 (2010) e AP302 (2013), e PA8-2 (2012) e AP302 (2013) foram iguais a 0,0001424. A matriz de correlações genéticas do modelo apresentou valores iguais a 0,08349 entre os isolados 2 a 2.

A comparação entre os modelos Mod5.lesão e Mod3.lesão (Tabela 19), mais provável até então, evidenciou que o modelo Mod3.lesão continuou sendo o que mais se ajustou e explicou a variação dos dados. Isso pode ser constatado com base nos valores bem menores de AIC e BIC.

Tabela 19 - Valores de AIC, BIC, logaritmo da função de verossimilhança e teste da razão de verossimilhança (LRT)

	AIC	BIC	LogLik	Comparação	LRT	p-vr
Mod3.lesão	-1.338	-1.288	679,0	Mod3 vs Mod5	130,1	0,027
Mod5.lesão	-1.266	-705	744,1			

A análise de resíduos e diagnósticos do modelo Mod6.lesão (Figura 30) evidenciou que os resíduos deste modelo se distribuíram de maneira menos aleatória, quando comparado aos modelos anteriores.

O gráfico de QQPlot dos resíduos do modelo Mod6.lesão (Figura 30) mostrou que, mesmo apresentando um leve desvio dos resíduos na região superior do gráfico, a maioria dos resíduos coincidiu com a reta linear (em vermelho) correspondente à quantidade esperada, sugerindo que os mesmos tenderam à distribuição normal.

Figura 30 - Resíduos ordinários contra valores preditos e QQPlot dos resíduos ordinários: Mod6.lesão

As variâncias genéticas do modelo Mod6.lesão apresentou valores iguais a 0,0010221 para os três isolados M129 (2010), PA8-2 (2012) e AP302 (2013) e as covariâncias genéticas também foram iguais entre os isolados 2 a 2 correspondendo

a 0,0003537. A matriz de correlações genéticas do modelo Mod6.lesão apresentou valores iguais a 0,3461 entre os isolados 2 a 2.

Comparando o modelo Mod6.lesão com o modelo Mod3.lesão (Tabela 20), mais provável até o momento, foi possível verificar que o modelo Mod3.lesão continuou explicando mais satisfatoriamente a variação dos dados, pois apresentou menores valores de AIC e BIC, bem como no teste de razão de verossimilhanças, que não foi significativo.

Tabela 20 - Valores de AIC, BIC, logaritmo da função de verossimilhança e teste da razão de verossimilhança (LRT)

	AIC	BIC	LogLik	Comparação	LRT	p-vr
Mod3.lesão	-1.338	-1.288	679	Mod3 vs Mod6	7.776e-11	1
Mod6.lesão	-1.336	-1.280	679			

A análise de resíduos e diagnósticos do modelo Mod7.lesão (Figura 31) mostrou diferenças poucos perceptíveis quando comparado aos modelos anteriores.

O gráfico de QQPlot dos resíduos do modelo Mod7.lesão (Figura 31) mostrou que mesmo apresentando um leve desvio dos resíduos na região superior do gráfico, a maioria dos resíduos coincidiu com a reta linear (em vermelho) correspondente à quantidade esperada, sugerindo que os mesmos tenderam à distribuição normal.

Figura 31 - Resíduos ordinários contra valores preditos e QQPlot dos resíduos ordinários: Mod7.lesão

As variâncias genéticas para os três isolados M129 (2010), PA8-2 (2012) e AP302 (2013) foram iguais a 0,0016675. As covariâncias genéticas entre os isolados 2 a 2 foram iguais a 0,0009093. As correlações genéticas entre os isolados 2 a 2 corresponderam a 0,5453.

Comparando o modelo Mod7.lesão com o modelo Mod3.lesão (Tabela 21), mais provável até o momento, foi possível verificar que o modelo Mod3.lesão continuou explicando mais satisfatoriamente a variação dos dados, pois apresentou menores valores de AIC e BIC, bem como no teste de razão de verossimilhanças, que não foi estatisticamente significativo.

Tabela 21 - Valores de AIC, BIC, logaritmo da função de verossimilhança e teste da razão de verossimilhança (LRT)

	AIC	BIC	LogLik	Comparação	LRT	p-vr
Mod3.lesão	-1.338	-1.288	679,0	Mod3 vs Mod7	0,07082	0,7901
Mod7.lesão	-1.336	-1.280	679,1			

Para o 8º modelo ajustado (Mod8.lesão) não houve convergência. Isso provavelmente ocorreu em função da grande quantidade de parâmetros a serem estimados.

Portanto, dentre todos os modelos que foram investigados no presente trabalho, o modelo Mod3.lesão foi o mais provável para explicar a variação dos dados de lesão.

Os valores genéticos preditos de lesão para os 102 genótipos da população (BLUPs) encontram-se no anexo b e estão graficamente representados na Figura 32.

Figura 32 – BLUPs dos 102 genótipos correspondentes a necrose. (a) 2010, (b) 2012 e (c) 2013

A partir dos valores genéticos preditos para o caráter lesão foi possível selecionar os genótipos mais resistentes e susceptíveis para cada inoculação e conjuntamente. Para tanto, os valores genéticos preditos dos genótipos foram ranqueados e encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22 – Ranking dos genótipos mais resistentes e mais susceptíveis, considerando os diferentes isolados (M129, PA8-2 e AP302), conjuntamente e as respectivas áreas de lesão

	M129 (2010)		PA8-2 (2012)		AP302 (2013)		Análise conjunta
	Genótipo	Área (cm²)	Genótipo	Área (cm²)	Genótipo	Área (cm²)	
Mais resistentes	73	1,70	96	0,67	53	1,25	73
	17	1,61	135	1,09	82	2,34	17
	2(12)	2,03	73	0,65	96	1,39	82
	82	1,00	17	0,52	135	1,73	135
	135	0,99	2(12)	0,33	2(12)	5,13	2(12)
Mais susceptíveis	59	8,54	59	2,35	136	13,21	59
	150	9,72	136	2,34	59	13,54	136
	SV3	9,30	88	2,63	127	7,71	88
	136	6,41	95	6,77	145	7,41	127
	127	6,39	145	1,97	103	11,4	145

Foram considerados genótipos mais resistentes os que possuíam menores áreas lesionadas pelo ataque do patógeno. Nota-se que os genótipo 2(12) (genitor feminino da população) e 135 tiveram um bom desempenho nos 3 anos avaliados, apresentando menores índices de severidade. Braga (2011) relatou melhores desempenhos para os genótipos 135, 82, 111, 151 e 58, utilizando um teste não paramétrico para ranquear os genótipos. O genótipo 111 ficou em 8ª posição na análise conjunta, mostrando que também tem um bom desempenho. Esses resultados podem ser aproveitados em um programa de melhoramento de maracujazeiro, desde que esses genótipos com maior resistência sejam avaliados quanto a caracteres agronômicos e posteriormente selecionados como genitores para constituir novas populações.

De posse do modelo mais provável após investigar e considerar as matrizes de efeitos aleatórios e residuais, foi possível investigar os efeitos fixos do modelo, representado pelos fatores isolado (ano) e bloco, e pela covariável área total (Tabela 23).

Tabela 23 – Quadro resumo da análise de variância para os efeitos fixos do modelo contendo o valor de F e o p-valor respectivo

Fonte de Variação	F-value	p-vr
Isolado (Ano)	207*	<.0001
Bloco	7*	2e-04
Área Total	37*	<.0001

Com base no resultado do teste F (Tabela 23), verificou-se que os efeitos de bloco, ano (isolado) e área total foram estatisticamente significativos ao nível de 5% de significância. Esses resultados sugerem que: i) o delineamento em blocos casualizados foi apropriado para o controle local e, assim, para a realização do experimento; ii) a área de lesão apresentada pelos genótipos diferiu em pelo menos um dos três anos avaliados, mostrando que a ação fitopatogênica de pelo menos um dos isolados foi diferente dos demais; iii) a área total foi covariável bastante importante no modelo, mostrando que, em geral, os genótipos apresentaram áreas foliares de tamanhos diferenciados, e que o mesmo tem influencia na ação bacteriana, provavelmente pela disponibilidade.

4.4 Variância genética e herdabilidade

Uma vez que os modelos mais adequados foram obtidos, foi possível estimar os parâmetros genéticos de interesse, tais como variância genética e herdabilidade (Tabela 24). Estes parâmetros foram estimados para cada um dos anos de avaliação, pois traduzem a variação genética da população modulada pelo ataque dos três isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

Tabela 24 – Estimativas da variância genética, fenotípica e residual ($\hat{\sigma}_g^2$, $\hat{\sigma}_f^2$, σ^2) e herdabilidade ($\hat{h}_a^2$) para as áreas de necrose e lesão para cada um dos isolados (anos) avaliados

	Isolado (Ano)	$\hat{\sigma}_g^2$	$\hat{\sigma}_f^2$	σ^2	$\hat{h}_a^2$
Necrose	M129 (2010)	0,0983	0,154	0,2228	0,64
	PA8-2 (2012)	0,0091	0,0648	0,2228	0,14
	AP302 (2013)	0,1002	0,1559	0,2228	0,64
Lesão	M129 (2010)	0,0016	0,005655	0,01622	0,28
	PA8-2 (2012)	0,0016	0,005655	0,01622	0,28
	AP302 (2013)	0,0016	0,005655	0,01622	0,28

É importante que, para fins de melhoramento, seja determinada a proporção da variação fenotípica que é explicada pela variação genética. Os valores estimados para herdabilidade variaram de 14% a 64% para necrose, sendo 14% referente a inoculação com o isolado de menor agressividade (PA8-2) e 64% para os dois isolados moderadamente agressivos (M129 e AP302) e se mantiveram em 28% para o caráter lesão nos três anos avaliados.

Cabe lembrar que a área foliar foi dividida em sadia (verde), clorose (amarelo) e necrose (vermelho), sendo que as duas últimas constituem a área de lesão (veja figuras 11 e 12). Aqui foram analisadas as áreas de necrose e lesão, portanto, o efeito da clorose na estimativa da herdabilidade da área de lesão foi desconsiderado.

4.5 Detecção de QTL associados à resposta à *X. axonopodis*

Uma vez que os dados moleculares relativos ao mapa de ligação (item 3.7) encontram-se disponíveis e considerando os dados fenotípicos aqui obtidos, foi possível calcular as probabilidades condicionais dos QTL para cada posição especificada do genoma, que, no caso, se fez por meio de escaneamento a cada 1 cM do mapa. Pela técnica de mapeamento foi identificado um total de 20 QTL, abrangendo os três isolados inoculados (M129, PA8-2 e AP302), cada um correspondendo a um ano de avaliação (2010, 2011 e 2012). Para o caráter necrose foram identificados 9 QTL e para lesão 11. Desconsiderando os dois caracteres, os valores de LOD score variaram de 3,9 a 13,11 e os de R^2 variaram de 0,20% a 15,7%.

Mapeamento por intervalo composto para o caráter necrose

Para o caráter necrose foram identificados 9 locos quantitativos (Tabela 25), sendo 5 QTL em resposta ao isolado M129, (ano de 2010, Figura 33), 2 QTL em resposta ao isolado PA8-2 (ano de 2012, Figura 34) e 2 QTL em resposta ao isolado AP302 (ano de 2013, Figura 35). Foram identificados QTL nos grupos de ligação IV, V, VII e VIII.

Dentre as marcas associadas aos QTL, a maioria (78%) é do tipo D, ou seja, o alelo (dominante) origina-se de um dos genitores, a configuração dos locos

marcadores são do tipo *ao x oo* ou vice-versa, com segregação 1:1. As marcas restantes (22%) são do tipo C, ou seja, a configuração dos locos marcadores é do tipo *ao x ao*, ou heterozigótica em ambos os pais, com segregação 3:1; marcadores do tipo C se caracterizam por ambos os genitores terem o mesmo genótipo e, por isso, são chamados marcadores simétricos.

Em relação ao tipo de marcador, dos 9 QTL identificados para necrose (considerando que 4 encontraram-se entre marcadores adjacentes) a maioria, ou seja, 10 (77%) são AFLPs, 2 são M-AFLP (15%) e um é SSR (8%).

No que diz respeito à segregação dos QTL, 3 locos mostraram segregação 1:1:1:1 (33%), sendo que os demais mostraram padrões de 1:2:1, 3:1 ou 1:1 (22% cada). É importante ressaltar que a segregação dos QTL foi inferida observando as marcas mais informativas adjacentes àquelas que flanqueiam os QTL.

A variação fenotípica explicada pelos QTL (R^2) para o caráter necrose variou de 1,7% a 13,8% (Tabela 25); Braga (2011) verificou uma variação fenotípica para este caráter de 0,9% a 7,6%, lembrando que, na ocasião, o autor utilizou uma abordagem estatística diferente, onde os dados foram estruturados num modelo fixo, assim como uma versão anterior do mapa genético integrado de *P. alata*. Aqui observaram-se valores maiores, dando suporte ao uso de seleção assistida relativamente aos isolados bacterianos estudados.

Vale destacar que a metodologia usada nesse trabalho permitiu estimar a variação conjunta para o caráter necrose que foi de 38% para o isolado M129 (2010), 19% para o isolado PA8-2 (2012) e 17% para o isolado AP302 (2013).

Tabela 25 – Relação de QTL mapeados para o carater necrose

Isolado/ Ano	Posição				Efeitos								Conclusão		
	GL	cM	Configuração	Marcador	LOD	$\hat{\mu}$	$\hat{\alpha}_p^*$	LOD	$\hat{\alpha}_q^*$	LOD	$\hat{\delta}_{pq}^*$	LOD	Seg.	Loco genitor	R ²
M129/ 2010	IV	94	D1/D1	AFLP/ M-AFLP	7,23	-0,038	-0,05	1,59	-0,12	4,52	-0,06	2,35	1:1:1:1	_P ₂ X_Q ₂	7,16
M129/ 2010	IV	194	D2	SSR	5,14	0,012	-0,17	4,40	0,11	0,88	NA	NA	3:1	_P ₂ X_Q ₂	1,74
M129/ 2010	V	86	C	AFLP	5,07	-0,029	0,05	1,25	0,02	0,02	0,12	4,67	1:1:1:1	P ₁ X__	9,41
M129/ 2010	V	243	D2/D2	AFLP/ AFLP	5,23	-0,029	-0,19	5,00	0,03	0,35	NA	NA	1:2:1	_P ₂ X__	10,36
M129/ 2010	VII	84	D1	AFLP	9,08	0,010	-0,15	8,35	-0,01	0,09	-0,03	-0,48	1:1	_P ₂ X__	11,63
PA8-2/ 2012	IV	94	D1	AFLP	5,16	-0,002	-0,03	2,23	-0,03	1,67	-0,02	2,51	3:1	_P ₂ X_Q ₂	5,22
PA8-2/ 2012	VII	84	D1	AFLP	7,26	0,011	-0,04	6,98	-0,01	0,53	-0,02	2,02	1:1:1:1	_P ₂ X__	13,77
AP302/ 2013	V	248	D2/ D2	AFLP/ AFLP	5,86	0,005	-0,28	5,50	-0,04	0,65	NA	NA	1:2:1	_P ₂ X__	13,73
AP302/ 2013	VIII	78	C/ C	AFLP/ M-AFLP	4,92	-0,003	0,07	0,70	0,01	0,04	0,17	4,77	1:1	nd	7,52

GL: Grupo de ligação;

cM: posição no grupo de ligação;

: significativo para valores ≥ 0.8 ; $\hat{\mu}$: estimativa média do loco; $\hat{\alpha}_p^$: estimativa do efeito aditivo do QTL para o genitor 2(12); $\hat{\alpha}_q^*$: estimativa do efeito aditivo do QTL para o genitor SV3; $\hat{\delta}_{pq}^*$: estimativa do efeito de dominância entre os alelos do QTL considerado;

Loco genitor: provável configuração genotípica dos genitores;

Seg.: tipo de segregação dos alelos do loco em consideração;

R²: coeficiente de determinação (% da variação fenotípica explicada).

Figura 33 - Resultado do CIM indicando a presença de 5 QTL ao longo dos nove grupos de ligação do maracujazeiro-doce para o caráter necrose no ano de 2010 em resposta ao isolado M129

Figura 34 - Resultado do CIM indicando a presença de 2 QTL ao longo dos nove grupos de ligação do maracujazeiro-doce para o caráter necrose no ano de 2012 em resposta ao isolado PA8-2

Figura 35 - Resultado do CIM indicando a presença de 2 QTL ao longo dos nove grupos de ligação do maracujazeiro-doce para o caráter necrose no ano de 2013 em resposta ao isolado AP302

Mapeamento por intervalo composto para o caráter lesão

Para o caráter lesão foram identificados 11 locos quantitativos (Tabela 26), sendo 1 QTL em resposta ao isolado isolado M129 (ano de 2010, Figura 36), 5 QTL em resposta ao isolado isolado PA8-2 (ano de 2012, Figura 37) e 5 QTL resposta ao isolado isolado AP302 (ano de 2013, Figura 38). Foram identificados QTL nos grupos II, III, V e VI. Apesar desses QTL situarem-se em posições cromossômicas distintas, foram encontrados 4 QTL no grupo de ligação III, sendo 3 QTL identificados em resposta ao isolado PA8-2 (2012) e 1 relativo à resposta ao isolado AP302 (2013). No grupo de ligação VI foram encontrados 5 QTL, sendo 1 relativo ao isolado M129 (2013), 1 em resposta ao isolado PA8-2 (2012) e 3 QTL relativos ao

isolado AP302 (2013). Este resultado abre perspectivas para investigar molecularmente essas regiões, já que contribuem com a resposta à doença, visando ao entendimento da interação patógeno-hospedeiro e dos genes envolvidos.

Dentre as marcas associadas aos QTL, a maioria (53%) é do tipo C, ou seja, heterozigótica em ambos os pais, com segregação 3:1, 40% das marcas são do tipo D, informativas apenas para um dos genitores com segregação 1:1 e 7% do tipo B, indicando heterozigose em ambos os genitores ou loco bialélico. Em relação ao tipo de marcador, dos 11 QTL identificados para lesão (considerando que 4 QTL encontravam-se entre marcadores adjacentes), a maioria, ou seja, 10 (67%) são AFLPs, 3 (20%) são M-AFLPs e 2 (13%) são SSRs.

No que diz respeito à segregação dos QTL, 5 locos mostraram segregação 1:2:1 (45%), 3 (27%) apresentaram segregação 1:1:1:1, 2 (18%) 3:1 e 1 loco (9%) tiveram segregação a 1:1. Novamente, ressalta-se que a segregação dos QTL foi obtida observando as marcas mais informativas adjacentes àquelas que flanqueiam os QTL.

A variação fenotípica explicada pelos QTL (R^2) para o caráter lesão foi de 0,2% a 15,7%. Outros trabalhos realizados com maracujazeiro-azedo (LOPES et al., 2006; MATTA, 2005) observaram resultados semelhantes ou seja QTL de pequenos a moderados efeitos. Lopes et al. (2006) encontraram 1 QTL para resistência a *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, que explicou 15,8% da variação fenotípica (R^2). Matta (2005), utilizando amostras da mesma população de Lopes et al. (2006) encontrou 3 QTL significativamente envolvidos na resistência à bactéria; estes QTL estavam ligados à marcas presentes nos grupos de ligação II, VI e VIII.

A Tabela 26 mostra que dos 11 QTL relacionados a área de lesão foliar, 5 foram identificados no grupo de ligação VI, sugerindo que esse grupo contém importante participação na resposta à bacteriose. O percentual de variação fenotípica conjunta para a característica da lesão foi de 38% para o isolado M129 (2010), 19% para o isolado PA8-2 (2012) e 17% para o isolado AP302 (2013).

Tabela 26 - Relação de QTL mapeados para o carater lesão

Isolado/ Ano	Posição				LOD	Efeitos							Conclusão		
	GL	cM	Marcador	Origem		$\hat{\mu}$	$\hat{\alpha}_p^*$	LOD*	$\hat{\alpha}_q^*$	LOD*	$\hat{\delta}_{pq}^*$	LOD*	Seg	Loco Genitor	R ²
M129/ 2010	VI	253	C	SSR	3,93	0,002	-0,002	0,25	0,01	1,36	0,00	0,11	1:1	__xQ1_	7,3816
PA8-2/ 2012	II	13	D2/ C	M-AFLP/ AFLP	6,39	0,003	0,000	0,00	-0,00	1,41	0,01	4,62	1:1:1:1	__x_Q2	7,9651
PA8-2/ 2012	III	50	C	AFLP	13,11	-0,000	-0,006	1,47	0,03	8,04	-0,01	3,32	1:2:1	_P2xQ1_	15,7209
PA8-2/ 2012	III	165	D1	AFLP	5,03	0,004	0,021	3,85	0,00	0,13	0,00	0,98	1:1:1:1	P1_x__	9,1123
PA8-2/ 2012	III	214	C	AFLP	10,32	0,004	-0,028	4,57	-0,03	5,73	0,01	1,33	1:2:1	P1_xQ1_	14,7355
PA8-2/ 2012	VI	17	D1/ C	AFLP/ M-AFLP	9,81	0,003	-0,001	0,18	0,015	6,64	-0,00	4,49	1:1:1:1	__xQ1_	15,7470
AP302/ 2013	III	230	B	M-AFLP	7,88	0,000	0,007	2,00	0,002	0,34	0,011	5,80	1:2:1	P1_x__	6,3459
AP302/ 2013	V	203	D2	SSR	6,21	0,001	0,006	0,75	-0,01	1,87	0,01	1,52	1:2:1	__x_Q2	7,2546
AP302/ 2013	VI	49	D1/ D2	AFLP/AFLP	5,74	-0,000	-0,008	1,59	0,01	3,98	-0,01	1,59	3:1	_P2xQ1_	3,3316
AP302/ 2013	VI	132	C	AFLP	4,61	-0,001	0,007	1,21	0,01	2,89	-0,00	0,23	1:2:1	P1_xQ1_	0,5412
AP302/ 2013	VI	203	C	AFLP/ AFLP	4,48	0,000	-0,012	1,05	0,01	2,84	-0,00	0,91	3:1	_P2xQ1_	0,1974

GL: grupo de ligação;

cM: posição no grupo de ligação;

: significativo para valores $\geq 0,8$; $\hat{\mu}$: estimativa média do loco; $\hat{\alpha}_p^$: estimativa do efeito aditivo do QTL para o genitor 2(12); $\hat{\alpha}_q^*$: estimativa do efeito aditivo do QTL para o genitor SV3; $\hat{\delta}_{pq}^*$: estimativa do efeito de dominância entre os alelos do QTL considerado;

Loco genitor: provável configuração genotípica dos genitores;

Seg.: tipo de segregação dos alelos do loco em consideração;

R²: coeficiente de determinação (% da variação fenotípica explicada).

Figura 36 - Resultado do CIM indicando a presença de 1 QTL ao longo dos nove grupos de ligação do maracujazeiro-doce para o caráter lesão no ano de 2010 em resposta ao isolado M129

Figura 37 - Resultado do CIM indicando a presença de 5 QTL ao longo dos nove grupos de ligação do maracujazeiro-doce para o caráter lesão no ano de 2012 em resposta ao isolado PA8-2

Figura 38 - Resultado do CIM indicando a presença de 5 QTL ao longo dos nove grupos de ligação do maracujazeiro-doce para o caráter lesão no ano de 2013 em resposta ao isolado AP302

5 DISCUSSÃO

Quantificação das áreas foliares

A quantificação das lesões e outros danos que ocorrem devido à incidência de doenças em plantas de lavoura é um dos desafios mais importantes da fitopatologia, pois não basta conhecer o agente causal, mas também quantificar a extensão dos seus danos no hospedeiro. As doenças podem ser quantificadas por métodos diretos de avaliação dos sintomas e sinais, como a incidência, severidade, intensidade, e métodos indiretos, como a determinação da população do patógeno, sua distribuição espacial, seus efeitos na produção (danos ou perdas) e a desfolha causada.

As avaliações de intensidade e severidade podem ser feitas de várias formas, entre elas, (i) a medição direta dos sintomas (por contagem do número de lesões, por exemplo), (ii) medição visual (que inclui o uso de chaves descritivas e escalas diagramáticas), (iii) uso da incidência para estimar valores de intensidade da doença, (iv) medição da área foliar sadia e (v) medição automática da imagem por computador e sensoriamento remoto (veja: MORAES, 2007). Destas, as escalas diagramáticas ainda são as mais utilizadas (BRAIDO et al., 2015; DAMASCENO; FURTADO; FERREIRA FILHO, 2014; SPOLTI et al., 2011; VIEIRA JÚNIOR et al., 2011; YADAV et al., 2013) e constituem representações ilustradas de uma série de plantas ou de partes delas com sintomas em diferentes níveis de severidade.

O procedimento de captura das imagens aqui adotado foi realizado aos 14 dias após a inoculação (dai), sendo a quantificação digital das áreas lesionadas o método mais apropriado, devido ao grande volume de dados disponibilizados no experimento, cerca de 408 imagens por ano. Estas tiveram de ser tratadas individualmente, pois foi necessário aumentar o contraste das imagens, um processo que exigiu cautela e tempo, permitindo, assim, a análise das áreas foliares pelo software.

Para a mensuração das áreas foliares foi utilizado o software AFsoft, desenvolvido pela Embrapa Instrumentação Agrícola, de uso livre e um de seus pontos fortes é a realização das análises em lotes de imagens, facilitando o processo quando o volume de dados é maior. Tem sido usado com sucesso

para a análise de lesões foliares causadas por doenças (BRAGA, 2011) e pragas (FRANCO et al., 2014; QUEIROZ, 2013), deficiências nutricionais (HAIM et al., 2012) e para o desenvolvimento de escalas diagramáticas (DAMASCENO; FURTADO; FERREIRA FILHO, 2014; VIEIRA JÚNIOR et al., 2011).

A metodologia utilizada no presente trabalho mostrou-se adequada para a avaliação da área lesionada, reforçando que o uso de imagens e o seu tratamento computacional representa uma alternativa para se chegar a uma estimativa mais precisa da severidade da doença comparativamente àquela da avaliação visual. Sun et al. (2014) demonstram que a análise de imagens é um método consistente, preciso e confiável para estimar a severidade da mancha bacteriana do tomateiro, causada por *Xanthomonas* spp., ao comparar a análise de imagens com a visual.

Ajuste do modelo misto para os caracteres necrose e lesão e cálculo dos parâmetros genéticos

Para o caráter necrose os valores de AIC variaram de 1.871 a 1.904, os de BIC variaram de 1.945 a 1.951 e o log da verossimilhança variou de -943,2 a -920,3. Com base nesses critérios e no teste de razão de verossimilhanças (Tabela 27) o modelo que se ajustou melhor foi o modelo Mod6.necrose, com um menor valor de AIC (1.871) e maior valor para o log da verossimilhança (-920,3). As estruturas consideradas para esse modelo foram heterogeneidade de variâncias genéticas entre os três isolados (anos), presença de correlações genéticas diferentes entre os isolados (anos) 2 a 2 e também homogeneidade de variâncias residuais e presença de correlações residuais iguais, com base no modelo *Não estruturado* para a matriz dos efeitos genéticos e de *Simetria composta heterogênea* para a matriz dos efeitos residuais.

Para o caráter lesão os valores de AIC variaram de -1.338 a -1.266, os de BIC variaram de -1.288 a -705 e o log da verossimilhança variou de 675,7 a 744,1. Com base nesses critérios e no teste de razão de verossimilhanças (Tabela 27) o modelo que se ajustou melhor foi o modelo Mod3.lesão, com menor valor de AIC (-1.338) e alto valor encontrado para o log da verossimilhança (679). As estruturas consideradas para esse modelo foram

homogeneidade de variâncias genéticas, presença de correlações genéticas iguais entre os isolados (anos) 2 a 2 e também homogeneidade de variâncias residuais e ausência de correlações residuais iguais, com base no modelo *Simetria composta homogênea* para a matriz dos efeitos genéticos e de *Identidade* para a matriz dos efeitos residuais.

Para cada caráter, um modelo diferente explicou melhor a variação dos dados: no caso da necrose, o melhor ajuste considerou variâncias genéticas diferentes para os 3 isolados; com isso, os valores estimados para a herdabilidade também foram diferentes, sendo sendo 14% referente à inoculação com o isolado de menor agressividade PA8-2 (2012) e 64% para os dois isolados moderadamente agressivos M129 (2010) e AP302 (2013). Nota-se que o isolado menos agressivo PA8-2 (2012) levou a uma variação fenotípica cujo componente genético é menor, ou seja, um valor de herdabilidade inferior, comparativamente aos demais.

No caso da lesão o modelo que mais se ajustou considerou homogeneidade de variâncias e, com isso, os valores de herdabilidade em resposta a cada um dos isolados foi igual (28%). Contudo, observando todos os modelos estudados (Tabela 27), nota-se que a herdabilidade para esse caráter apresenta variação de 20% a 33%, ou seja, são valores considerados valores médios de herdabilidade (CRUZ, 2005).

Tabela 27 – Estimativas da variância genética, fenotípica e residual ($\hat{\sigma}_g^2$, $\hat{\sigma}_f^2$, σ^2), herdabilidade ($\hat{h}_a^2$) para os diferentes modelos de necrose e de lesão e critérios de escolha dos modelos (AIC, BIC, LogLik e LRT)

	Isolado (Ano)	$\hat{\sigma}_g^2$	$\hat{\sigma}_f^2$	σ^2	$\hat{h}_a^2$	AIC	BIC	LogLik	Comparação	LRT	P-vr
Mod1.necrose	Todos	0,0434	0,1056	0,2490	0,41	1.904	1.950	-943,2			
Mod2.necrose	M129 (2010)	0,0755	0,1356	0,2402	0,56	1.876	1.931	-926,8	Mod1 vs Mod2	32,75*	<,0001
	PA8-2 (2012)	0,0000	0,0601	0,2402	0,00						
	AP302 (2013)	0,0803	0,1404	0,2402	0,57						
Mod3.necrose	Todos	0,0430	0,1053	0,2492	0,41	1.899	1.950	-939,6	Mod2 vs Mod3	25,59*	<,0001
Mod4.necrose	M129 (2010)	0,0763	0,1362	0,2396	0,56	1.874	1.945	-923,1	Mod2 vs Mod4	7,458*	0,0586
	PA8-2 (2012)	0,0016	0,0615	0,2396	0,03						
	AP302 (2013)	0,0763	0,1362	0,2396	0,56						
Mod6.necrose	M129 (2010)	0,0983	0,1540	0,2228	0,64	1.871	1.947	-920,3	Mod4 vs Mod6	5,455	0,0195
	PA8-2 (2012)	0,0091	0,0648	0,2228	0,14						
	AP302 (2013)	0,1002	0,1558	0,2228	0,64						
Mod7.necrose	M129 (2010)	0,0800	0,1392	0,2367	0,57	1.875	1.951	-922,4	-	-	-
	PA8-2 (2012)	0,0019	0,0610	0,2367	0,03						
	AP302 (2013)	0,0833	0,1425	0,2367	0,58						
Mod1.lesão	Todos	0,0016	0,0056	0,0162	0,28	-1.333	-1.288	675,7	-	-	-
Mod2.lesão	M129 (2010)	0,0018	0,0058	0,0162	0,31	-1.330	-1.274	675,8	Mod1 vs Mod2	0,1592	0,9235
	PA8-2 (2012)	0,0016	0,0057	0,0162	0,29						
	AP302 (2013)	0,0013	0,0054	0,0162	0,25						
Mod3.lesão	Todos	0,0016	0,0056	0,0162	0,28	-1.338	-1.288	679	Mod1 vs Mod3	6,672	0,0098
Mod4.lesão	M129 (2010)	0,0018	0,0059	0,0162	0,31	-1.331	-1.260	679,6	Mod3 vs Mod4	1,17	0,8831
	PA8-2 (2012)	0,0016	0,0056	0,0162	0,28						
	AP302 (2013)	0,0013	0,0054	0,0162	0,24						
Mod5.lesão	Todos	0,0017	0,0051	0,0136	0,33	-1.266	-705	744,1	Mod3 vs Mod5	130,1	0,027
Mod6.lesão	Todos	0,0010	0,0052	0,0168	0,20	-1.336	-1.280	679	Mod3 vs Mod6	7,78E-08	1
Mod7.lesão	Todos	0,0017	0,0057	0,0161	0,29	-1.336	-1.280	679,1	Mod3 vs Mod7	0,07082	0,7901

A literatura mostra distintos valores de herdabilidade para a resposta à *Xanthomonas* já que as estimativas sofrem influência da cultura, dos métodos de avaliação das lesões, e do tratamento estatístico dos dados.

Exemplificando, em pêssago, Yang et al. (2013) avaliaram a bacteriose em folhas e frutos, usando uma escala de notas, durante três meses consecutivos, em duas safras, em dois locais (norte e sul da Califórnia, EUA). A herdabilidade foi estimada separadamente por mês de avaliação, safra e local. A progênie examinada resultou do cruzamento entre dois cultivares contrastantes, sendo um altamente resistente e outro altamente susceptível. No caso das lesões foliares, para cada conjunto de dados com distribuição normal, os valores de herdabilidade variaram de 0,24 (em apenas uma repetição) a 0,77. Para o conjunto de dados de frutos com distribuição normal, os valores de herdabilidade foram mais altos e menos variáveis, de 0,81 a 0,88.

Em outra frutífera, o damasco, Socquet-Juglard et al. (2013) avaliaram a incidência da doença 42 dias após a inoculação com uma mistura de isolados (4 a 5), expressa pela razão entre o número de folhas com sintomas em relação ao total de folhas inoculadas por planta. A população F_1 foi obtida do cruzamento entre dois cultivares, sendo um dos genitores resistente, e examinada durante dois anos consecutivos. Os autores encontraram valores de herdabilidade de 0,96 (incidência em percentagem) e 0,97 (índice de resistência), sendo que este estudo foi conduzido em casa de vegetação.

Já em trigo Kandel et al. (2015), avaliaram uma população formada por 825 indivíduos quanto à resposta à estria foliar bacteriana causada por *X. campestris* pv. *translucens*, no centro-oeste dos EUA. A herdabilidade de 0,28 foi estimada para a área abaixo da curva de progresso da doença, a partir dos dados de plantas F_2 e seus genitores cultivadas no campo.

Em feijão, Tar'an, Michaels e Pauls (2001) avaliaram 142 linhagens ($F_{2:4}$) e os genitores quanto à resposta à *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, agente causal do crestamento bacteriano no feijoeiro. Nas parcelas inoculadas, a resposta ao crestamento foi negativamente correlacionada com a produção de sementes, dias para a maturação, altura da planta, diâmetro do hipocótilo, vagens por planta e índice de colheita. Observou-se uma redução na produção de sementes e de seus componentes, quando comparados com parcelas livres de doença. A estimativa de herdabilidade da resposta ao crestamento foi de 0,74.

Em maracujazeiro-azedo, Matta (2005) avaliou a lesão foliar em uma população composta por 104 indivíduos além dos genitores, usando imagens digitalizadas, aos 11, 13, 15 e 17 dias após a inoculação e observou valores de herdabilidade de 0,29, 0,38, 0,42 e 0,47, respectivamente. Observando o valor crescente da herdabilidade, o autor concluiu que a variação de natureza genética tende a ser mais pronunciada quanto maior for o período de avaliação, após a inoculação.

Braga (2011) encontrou valores de herdabilidade de 0,63 para o caráter lesão e 0,49 para o caráter necrose, usando a mesma população aqui estudada. Esta diferença se deve ao efeito do isolado M129 e, possivelmente, ao uso de uma abordagem estatística diferente, já que os dados foram estruturados num modelo fixo.

Mapeamento de QTL

Para o caráter necrose foram identificados 9 QTL (Figura 39) e para lesão 11 QTL (Figura 40). Considerando os dois caracteres avaliados, os valores de LOD score variaram de 3,9 a 13,11 e os de R^2 variaram de 0,20% a 15,7%.

Figura 39 - Resultado do CIM indicando a presença de 9 QTL ao longo dos nove grupos de ligação do maracujazeiro-doce para o caráter necrose em resposta ao isolado M129 (azul), PA8-2 (vermelho) e AP302 (verde)

Figura 40 - Resultado do CIM indicando a presença de 11 QTL ao longo dos nove grupos de ligação do maracujazeiro-doce para o caráter lesão em resposta ao isolado M129 (azul), PA8-2 (vermelho) e AP302 (verde)

Para o caráter necrose os 9 QTL identificados encontram-se nos grupos de ligação IV, V, VII e VIII, a variação fenotípica explicada pelos QTL variou de 1,7% a 13,8%. É interessante observar que alguns QTL foram identificados na mesma região cromossômica em resposta a isolados distintos: é o caso do QTL posicionado a 94 cM no grupo de ligação IV, identificado em resposta aos isolados M129 (2010) e PA8-2 (2012); outro QTL também se apresentou estável independente do isolado, estando posicionado a 84 cM no grupo de ligação VII. Considerando os isolados M129 (2010) e AP302 (2013), detectou-se um QTL estável localizado entre as marcas D2-E36M61_373 e D2-P35M48_324, posicionado a 245 cM no grupo de ligação V e que explica em média 12% da variação fenotípica do caráter necrose.

Para o caráter lesão os 11 locos quantitativos identificados encontram-se nos grupos II, III, V e VI e a variação fenotípica explicada por esses QTL variou de 0,2 a 15,7%. Apesar desses QTL situarem-se em posições cromossômicas distintas, foram encontrados 4 QTL no grupo de ligação III, sendo 3 identificados em resposta ao isolado PA8-2 (2012) e 1 relativo à resposta ao isolado AP302 (2013). No grupo de ligação VI foram encontrados 5 QTL, sendo 1 relativo ao isolado M129 (2013), 1 em resposta ao isolado PA8-2 (2012) e 3 relativos ao isolado AP302 (2013). Esses resultados sugerem que o grupo de ligação III e o grupo de ligação VI contem regiões importantes relacionadas à resposta do maracujazeiro-doce à bacteriose. Isso abre perspectivas para se adicionar ao mapa genético marcadores funcionais derivados de transcritos identificados por Munhoz et al. (2015) que detectaram vários genes envolvidos na resposta transcricional de maracujazeiro-azedo ao ataque de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, especialmente as enzimas lipoxigenase 2 e (+)-neomentol desidrogenase.

Apesar de não se ter encontrado QTL comuns aos dois caracteres avaliados, pode-se sugerir que há ampla dispersão desses QTL no genoma de *P. alata*, já que não houve evidências de QTL apenas nos grupos de ligação I e IX.

Outros autores trabalhando com a interação *Xanthomonas* – hospedeiro identificaram um número variável de QTL. Exemplificando, para a podridão negra na couve causada por *X. campestris* pv. *campestris*, TONU et al. (2013) mapearam 3 QTL usando a abordagem de mapeamento por intervalo composto, sendo um deles responsável por ~34% da variação fenotípica do caráter lesão.

Kifuji et al. (2013) estudando essa interação com a mesma metodologia de mapeamento de QTL, mapearam 3 QTL, sendo que o maior deles foi responsável por ~15% da variação fenotípica para o caráter lesão foliar. Mais recentemente, Lee et al. (2015) encontraram 4 QTL relacionados à podridão negra na couve, também usando a metodologia de mapeamento por intervalo composto, sendo o maior deles responsável por ~27% da variação fenotípica.

Em trigo, a bactéria *X. campestris* pv. *translucens* é responsável por perdas expressivas na cultura e para entender melhor esse patossistema Kandel et al. (2015) mapearam QTL relacionados à resistência em campo e em casa de vegetação. Foram encontrados 5 QTL, sendo que 2 deles mostraram-se estáveis, sendo mapeados nas duas condições ambientais, o maior deles foi responsável por ~30% da variação fenotípica da resposta à estria foliar no trigo.

Em frutíferas, como o pêssego, Yang e colaboradores (2013) mapearam QTL associados à resistência à *X. arboricola* pv. *pruni* para incidência de lesões em folhas e frutos. Um total de 14 regiões associadas à resistência foram identificadas por, pelo menos, duas das metodologias estatísticas usadas (CIM, teste não paramétrico de K-W e regressão múltipla). Houve variação nos efeitos dos QTL, especialmente entre os órgãos da planta, sendo o de maior efeito (45%) detectado pelas três metodologias, nos dois locais avaliados, e associado à lesão na folha.

Já em damasco, Socquet-Juglard et al. (2013) identificaram um QTL no grupo de ligação V, associado à mancha marrom, sendo responsável por cerca de 53% da variação fenotípica do caráter incidência de lesões foliares. Este trabalho usou o método de mapeamento por intervalo para a identificação de QTL. Os autores atribuíram a ocorrência de apenas um QTL a diversos fatores, entre eles o fato da fonte de inóculo ter sido uma mistura de estirpes e com isso ter mascarado os efeitos da especificidade isolado x hospedeiro. Esta informação é coerente com os valores de herdabilidade relatados nesse trabalho, próximos de 1,0.

Em maracujazeiro-azedo, Lopes et al. (2006) localizou um QTL, usando a metodologia de mapeamento por intervalo composto, associado a resistência à bacteriose que explicou ~16% da variação fenotípica do caráter lesão foliar. Matta (2005), utilizando essa mesma progênie detectou QTL com magnitude de efeitos semelhantes na mesma região do grupo de ligação II indicada por Lopes et al. (2006) que explica ~20% da variação fenotípica. Matta (2005) também encontrou QTL no grupo de ligação VI e outro no grupo de ligação VIII. Por não se ter informação sobre as sintenias dos mapas de maracujazeiro-doce e azedo, não se pode afirmar que são as mesmas regiões aqui localizadas.

Em maracujazeiro-doce, Braga (2011) relata que foram mapeados 16 locos quantitativos relacionados à resistência à bacteriose, sendo que o de maior efeito responde por cerca de 16,7% da variação fenotípica. Interessante comentar que o mais alto valor explicado por um QTL (=15,7%), aqui encontrado para o caráter área de lesão, coincide com os mais altos valores reportados para o maracujazeiro-azedo (=15,8%) e maracujazeiro-doce (=16,7%) para o mesmo caráter, relatados respectivamente por Lopes et al. (2006) e Braga (2011) que adotaram a metodologia de mapeamento por intervalo composto para identificação de QTL.

Entre os 9 QTL detectados para necrose, 5 mostraram, além dos efeitos aditivos, efeitos de dominância, e quando se considera o caráter lesão, dos 11 QTL

encontrados, 9 mostraram efeitos de dominância, além de apresentarem efeitos aditivos. Braga (2011), utilizando uma abordagem estatística diferente, encontrou 5 QTL relacionados à necrose, sendo 2 deles com efeitos de dominância, e 5 QTL relacionados à lesão, sendo 2 deles com efeitos de dominância, nesse trabalho o autor relata a importância dos efeitos aditivos para os caracteres avaliados, relacionados a resposta da planta ao patógeno.

A contribuição deste trabalho está relacionada à elucidação da arquitetura genética dos caracteres envolvidos na resposta à *X. axonopodis*. Trata-se de uma herança poligênica, cujo loco quantitativo de maior efeito explica ~16% da variação fenotípica.

Ainda, há perspectivas de geração de informações complementares, pois o transcrito do maracujazeiro-azedo, em resposta à *X. axonopodis*, foi recentemente elucidado pelo nosso grupo de pesquisa (veja MUNHOZ et al., 2015). Assim, com adição de marcas funcionais ao mapa aqui utilizado, será possível identificar genes candidatos aos QTL aqui mapeados. Também, com o sequenciamento de um draft do genoma de *P. edulis* em andamento (veja SANTOS et al., 2014) abre-se a possibilidade de se proceder ao mapeamento fino desses locos, tal como feito em feijoeiro em resposta à *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (veja OBLESSUC et al., 2013) que identificaram marcadores ligados aos genes da glicosil transferase, anquirina, fosfolipase e de um fator de transcrição (*squamosa promoter binding protein*).

Essas informações, aliadas a outros estudos relacionados à produção de frutos, podem colaborar para a geração de uma variedade, com base em uma abordagem multidisciplinar, o que contribuirá para o desenvolvimento desta cultura tão peculiar, o maracujazeiro-doce.

6 CONCLUSÕES

A população F₁ de maracujazeiro-doce apresenta variabilidade genética que pode ser usada em programas de melhoramento visando à resistência genética à bacteriose causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*;

O uso de modelos mistos possibilitou explicar adequadamente a variação dos dados relativos aos caracteres área de necrose e área de lesão bem como o método de mapeamento por intervalo composto (CIM), desenvolvido para populações F₁ segregantes, se mostrou adequado para o mapeamento de QTL em maracujazeiro-doce;

A resistência à bacteriose é poligênica, com predominância de efeitos genéticos aditivos: 20 QTL foram mapeados, com efeitos individuais variando de 0,2% a 15,7%, dois identificados de maior efeito em resposta ao isolado PA8-2, um localizado no grupo de ligação III e o outro no IV do mapa genético integrado do maracujazeiro-doce.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Banco de dados:** produtos das empresas de medicamentos e hemoderivados. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/banco_med.htm>. Acesso em: 12 set. 2014.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5th ed. San Diego: Academic Press, 2005. 952 p.
- ALVES, R.R.; SALOMÃO, L.C.C.; SIQUEIRA, D.L.; CECOM, P.R.; SILVA, D.F.P. Relações entre características físicas e químicas de frutos de maracujazeiro-doce cultivado em Viçosa- MG. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 2, p. 619–623, 2012.
- ARSHIYA, M.; SURYAWANSHI, A.; MORE, D.; BAIG, M.M.V. Repetitive PCR based detection of genetic diversity in *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* strains. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, Gwailior, v. 2, n. 1, p. 17–22, 2014.
- BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; NUNES, T. .; IMIG, D.C.; MEZZONATO, A.C. *Passifloraceae*. In: **Lista de espécies da flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB128567>>. Acesso em: 01 jul. 2014.
- BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**. London, v. 26, n. 2, p. 211–252, 1964.
- BRAGA, M.F. **Mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*) associados à resistência do maracujá-doce à bacteriose**. 2011. 286 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- BRAIDO, R.; GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O.; NOCCHI, P.T.R.; BELASQUE JUNIOR, J.; JANEIRO, V.; BOCK, C.H.; NUNES, W.M.C. A standard area diagram set to aid estimation of the severity of asiatic citrus canker on ripe sweet orange fruit. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 141, n. 2, p. 327–337, 2015.
- BROMAN, K.W.; SEN, S. **A guide to QTL: mapping with R/qlt**. New York: Springer, 2009. 400 p.
- CAMARGO, L.E.A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 1995. p. 470-492.
- CAMARGO, L.E.A. Marcadores moleculares no melhoramento para resistência a doenças. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 995-1010.

CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 2, p. 89-100, 2002.

CARNEIRO, M.S.; CAMARGO, L.E.A.; COELHO, A.S.G.; VENCOSKY, R.; LEITE, 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.

CENTRAL DE ABASTECIMENTO. **Preços**. Disponível em: <http://www.ceasacampinas.com.br/novo/cotacao_anterior.asp>. Acesso em: 10 mar. 2015.

CHEN, L.; STOREY, J.D. Relaxed significance criteria for linkage analysis. **Genetics**, Austin, v. 173, n. 8, p. 2371–2381, 2006.

COELHO, A.S.G.; SILVA, H.D. **Construção de mapas genéticos e mapeamento de QTL**. Piracicaba: ESALQ, 2002. 77 p.

CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S.; SOUZA, M.M.; BELO, G.O.; SANTOS, S.F.; FREITAS, J.C.O. Hybridization among wild passion flower species. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 34, p. 237–240, 2011.

CRUZ, C.D. **Princípios de genética quantitativa**. Viçosa: Ed. UFV, 2005. 394 p.

DAMASCENO, V.F.F.; FURTADO, E.L.; FERREIRA FILHO, P.J. Comparação de dois métodos de elaboração e validação de escala diagramática para a quantificação da severidade da mancha de *Cylindrocladium* em eucalipto. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 40, n. 2, p. 248–255, 2014.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: A review update. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 94, n. 1, p. 1–23, 2004.

DMITRIEV, A.P. Signal molecules for plant defense responses to biotic stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 50, n. 3, p. 417–425, 2003.

DOERGE, R.W. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. **Nature reviews Genetics**, London, v. 3, n. 1, p. 43–52, 2002.

EULGEM, T. Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 71–78, 2005.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; OLIVEIRA, E.J.; PEIXOTO, J.R.; COSTA, A.M. **Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro: histórico e perspectivas**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. 36 p.

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, n. 6, p. 727–730, 2010.

FRANCO, A.A.; QUEIROZ, M.S.; PERES, A.R.; ROSA, M.E.; CAMPOS, A.R.; CAMPOS, Z.R. Preferência alimentar de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) por cultivares de soja. **Científica**, Jaboticabal, v. 42, p. 32, 2014.

GALECKI, A.; BURZYKOWSKI, T. **Linear mixed-effects models using R: a step-by-step approach**. New York: Springer, 2013. 542 p.

GARDINER, D.M.; UPADHYAYA, N.M.; STILLER, J.; ELLIS, J.G.; DODDS, P.N.; KAZAN, K.; MANNERS, J.M. Genomic analysis of *Xanthomonas translucens* pathogenic on wheat and barley reveals cross-kingdom gene transfer events and diverse protein delivery systems. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2014.

GAZAFFI, R. **Desenvolvimento de modelo genético-estatístico para mapeamento de QTLs 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 "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

GAZAFFI, R.; MARGARIDO, G.R.A.; PASTINA, M.M.; MOLLINARI, M.; GARCIA, A.A.F. A model for quantitative trait loci mapping, linkage phase, and segregation pattern estimation for a full-sib progeny. **Tree genetics and genomes**, Berlin, v. 10, p. 791–801, 2014.

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

GUANG-YU, G.; RUI, S.; MENG, H.; YONG-XIN, G.; DA-WEI, X.; HONG-WEI, J.; CHUN-YAN, L.; GUO-HUA, H.; QING-SHAN, C. Quantitative trait locus (QTL) analysis of pod related traits in different environments in soybean. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 56, p. 11848–11854, 2011.

HAIM, P.G.; ZOFFOLI, B.C.; ZONTA, E.; ARAÚJO, A.P. Diagnose nutricional de nitrogênio em folhas de feijoeiro pela análise digital de imagens. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 47, p. 1546–1549, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2013/default.shtm>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

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

JORGE, L.A.C.; SILVA, D.J.C.B. **AFSOFT**: manual de utilização. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2009. 20 p.

JUNQUEIRA, K.P. **Resistência genética e métodos alternativos de controle da bacteriose do maracujazeiro causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae***. 2010. 160 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; SHARMA, R.D.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, L.P. Manejo das principais doenças do maracujazeiro. In: POLTRONIERI, L.S.; TRINDADE, D.R.; SANTOS, I.P. **Pragas de cultivos amazônicos**. Brasília: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. p. 127-156.

KANDEL, Y.R.; GLOVER, K.D.; OSBORNE, L.E.; GONZALEZ-HERNANDEZ, J.L. Mapping quantitative resistance loci for bacterial leaf streak disease in hard red spring wheat using an identity by descent mapping approach. **Euphytica**, Wageningen, v. 201, n. 1, p. 53–65, 2015.

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

KIFUJI, Y.; HANZAWA, H.; TERASAWA, Y.; ASHUTOSH; NISHIO, T. QTL analysis of black rot resistance in cabbage using newly developed EST-SNP markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 190, p. 289–295, 2013.

KIMBALL, S. MATTIS, P.; ARCHIBALD, N.; BARRANCOS, L.; BREUER, H.; BUDIG, S.; BUENO, J.S.O.; CLAUSEN, L.; COZENS, K.; DEAL, M.; DEATH, A.; EDELAND, D.; EHLERT, U.; GOWERS, D.; HEESE, M.; HORNING, D.; ITKIN, B.; JOOST, R.; JORDAENS, G.; JUSKA, A.; KOLAS, O.; LECHNER, T.; LILLQVIST, T.; MAIGNAN, L.; MARSHALL, J.; NATTERER, M.; NEUMANN, S.; NORDHOLTS, M.; PÄTSL, V.; QUINET, R.; RANKE, D.; SCHUMACHER, M.; SIKKING, P.; SIMONCIC, J.; SINGH, M.; SKAGGS, W.; STEINER, J. **GIMP 2.6.8**: GNU image manipulation program. 2008. Disponível em: <www.gimp.org>. Acesso em: 10 mar. 2011.

KOU, Y.; WANG, S. Broad- spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 13, n. 2, p. 181–185, 2010.

LANDER, E.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using rflp linkage maps. **Genetics**, Austin, v. 121, n. 1, p. 185–199, 1989.

LAPERUTA, L.C. **Estudo de uma população segregante (F1) de maracujá-doce: enriquecimento do mapa de ligação e mapeamento de QTL para produção e qualidade dos frutos**. 2011. 134 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

LEE, J.; IZZAH, N.K.; JAYAKODI, M.; PERUMAL, S.; JOH, H.J.; LEE, H.J.; LEE, S.C.; PARK, J.Y.; YANG, K-W.; NOU, I-S.; SEO, J.; YOO, J.; SUH, Y.; AHN, K.; LEE, J.H.; CHOI, G.J.; YU, Y.; KIM, H.; YANG, T-J. Genome-wide SNP identification and QTL mapping for black rot resistance in cabbage. **BMC Plant Biology**, Stuttgart, v. 15, p. 1–11, 2015.

LILLEMO, M.; JOSHI, A.K.; PRASAD, R.; CHAND, R.; SINGH, R.P. QTL for spot blotch resistance in bread wheat line Saar co-locate to the biotrophic disease resistance loci Lr34 and Lr46. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 126, p. 711–719, 2013.

LIMA, A.L. **Maracujá produção**: aspectos técnicos. Cruz das Almas: Embrapa, SPI, 2002. 104 p.

LIN, M.; LOU, X. Y.; CHANG, M.; WU, R. A general statistical framework for mapping quantitative trait loci in non model systems: issue for characterizing linkage phases. **Genetics**, Austin, v. 165, n. 2, p. 901-913, 2003.

LIU, B.H. **Statistical genomics**: linkage, mapping and QTL analysis. New York: CRC Press, 1998. 648 p.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; CARNEIRO, M.S.; MATTA, F.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.

MANICA, I.; BRANCHER, A.; SANZONOWICZ, C.; ICUMA, I.M.; AGUIAR, J.L.P.; AZEVEDO, J.A.; VASCONCELLOS, M.A.S.; JUNQUEIRA, N.T.V. (Ed.). **Maracujá-doce**: tecnologia de produção, pós-colheita e mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2005. 198 p.

MARGARIDO, G.R.A. **Mapeamento de QTLs em múltiplos caracteres e ambientes em cruzamento comercial de cana-de-açúcar usando modelos mistos**. 2011. 107 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

MARTINS, M.R.; OLIVEIRA, J.C.; DI MAURO, A.O.; SILVA, P.C. Avaliação de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) obtidas de polinização aberta. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 111-114, 2003.

MATTA, F. . **Mapeamento de QTL para *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. 2005. 230 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MENDIBURU, F. **Package Agricolae 1.4-4**. Vienna, 2013. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/index.html>>. Acesso em: 28 ago. 2014.

MEYER, K. WOMBAT: a tool for mixed model analyses in quantitative genetics by restricted maximum likelihood (REML). **Journal of Zhejiang University**, Hangzhou, v. 8, n. 11, p. 815–821, 2007.

MISHRA, D.; VISHNUPRIYA, M.R.; ANIL, M.G.; KONDA, K.; RAJ, Y.; SONTI, R.V. Pathotype and genetic diversity amongst Indian isolates of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, p. 1-11, 2013.

MOLLINARI, M. **Comparação de algoritmos usados na construção de mapas genéticos**. 2007. 73 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MORAES, S.A. **Quantificação de doenças de plantas**. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/doencas/index.htm>. Acesso em: 01 fev. 2015.

MUNHOZ, C.F.; SANTOS, A.A.; ARENHART, R.A.; SANTINI, L.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; VIEIRA, M.L.C. Analysis of plant gene expression during passion fruit-*Xanthomonas axonopodis* interaction implicates lipoxygenase 2 in host defence. **Annals of Applied Biology**, Warwick, 2015. In press.

MUNHOZ, C.F.; WEISS, B.; HANAI, L.R.; ZUCCHI, M.I.; FUNGARO, M.H.P.; OLIVEIRA, A.L.M.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; VIEIRA, M.L.C. Genetic diversity and a pcr-based method for *Xanthomonas axonopodis* detection in passion fruit. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, p. 416-424, 2011.

NAEGELE, R.P.; ASHRAFI, H.; HILL, T.A.; CHIN-WO, S.R.; DEYNZE, A.E.V.; HAUSBECK, M.K. QTL mapping of fruit rot resistance to the plant pathogen *Phytophthora capsici* in a recombinant inbred line *Capsicum annuum* population. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 104, p. 479-483, 2014.

NORIEGA, P.; MAFUD, D.F.; STRASSER, M.; KATO, E.T.M.; BACCHI, E.M. *Passiflora alata* Curtis: a Brazilian medicinal plant. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 10, n. 5, p. 398-413, 2011.

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**. 2010. 138 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 4, p. 318–324, 2002

OBLESSUC, P.R.; PERSEGUINI, J.M.K.C.; BARONI, R.M.; CHIORATO, A.F.; CARBONELL, S.A.M.; MONDEGO, J.M.C.; VIDAL, R.O.; CAMARGO, L.E.A.; BENCHIMOL-REIS, L.L. Increasing the density of markers around a major QTL controlling resistance to angular leaf spot in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 126, n. 10, p. 1–15, 2013.

OLIVEIRA, E.J.; VIEIRA, M.L.C.; GARCIA, A.A.F.; MUNHOZ, C.F.; MARGARIDO, G.R.A.; CONSOLI, L.; MATTA, F.P.; MORAES, M.C. An integrated molecular map of yellow passion fruit based on simultaneous maximum-likelihood estimation of linkage and linkage phases. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 133, n.1, p. 35- 41, 2008.

PACHECO, I.; BASSI, D.; EDUARDO, I.; CIACCIULLI, A.; PIRONA, R.; ROSSINI, L.; VECCHIETTI, A. QTL mapping for brown rot (*Monilinia fructigena*) resistance in an intraspecific peach (*Prunus persica* L. Batsch) F1 progeny. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 10, n. 5, p. 1223-1242, 2014.

PEREIRA, A.L.G. **Contribuição ao estudo da etiologia da mancha oleosa da folha de maracujá (*Passiflora edulis* Sims) causada por *Xanthomonas passiflorae***. 1968. 61 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1968.

PEREIRA, G.S.; NUNES, E.S.; LAPERUTA, L.D.C.; BRAGA, M.F. PENHA, H.A.; DINIZ, A.L.; MUNHOZ, C.F.; GAZAFFI, R.; GARCIA, A.A.F.; VIEIRA, M.L.C. Molecular polymorphism and linkage analysis in sweet passion fruit, an outcrossing species. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 162, p. 347-361, 2013.

PINHEIRO, J.; BATES, D.; DEBROY, S.; SARKAR, D. **R Core Team**: package nlme 3.1. Wisconsin, 2015. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/nlme/index.html>>. Acesso em: 08 jan. 2015.

PROVENSI, G. **Investigação da atividade ansiolítica de *Passiflora alata* Curtis (*Passifloraceae*)**. 2007. 135 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmaceuticas) Faculdade de Farmácia– Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

PRUVOST, O.; GOODARZI, T.; BOYER, K.; SOLTANINEJAD, H.; ESCALON, A.; ALAVI, S.M.; JAVEGNY, S.; BOYER, C.; COTTYN, B.; GAGNEVIN, L.; VERNIÈRE, C. Genetic structure analysis of strains causing citrus canker in Iran reveals the presence of two different lineages of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotype A*. **Plant Pathology**, London, v. 64, p. 1-9, 2015.

QUEIROZ, M.S. **Avaliação da resistência de cultivares de amendoim de hábitos de crescimento ereto e rasteiro a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (*Lepidoptera : noctuidae*)**. 2013. 55 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Ilha Solteira, 2013.

RAGHAVENDRA, B.T.; SINGHA, D.; YADAVAB, D.K.; MONDAL, K.K.; SHARMA, P. Virulence analysis and genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing black rot of crucifers. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Ottawa, v. 46, p. 227-242, 2013.

REVELLE, W. **Package psych 1.5.1**. Illinois, 2015. Disponível em:<<http://cran.r-project.org/web/packages/psych/index.html>>. Acesso em: 14 jan. 2015.

REX, F.; FECHTER, I.; HAUSMANN, L.; TÖPFER, R. QTL mapping of black rot (*Guignardia bidwellii*) resistance in the grapevine rootstock 'Börner' (*V. riparia* Gm183 × *V. cinerea* Arnold). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 127, p. 1667–1677, 2014.

RITTER, E.; GEBHARDT, C.; SALAMINI, F. Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. **Genetics**, Bethesda, v. 125, n. 3, p. 645–654, 1990.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2005. 417 p.

RYAN, R.P.; VORHÖLTER, F.J.; POTNIS, N.; JONES, J.B.; VAN SLUYS, M.A.; BOGDANOVE, A.J.; DOW, J.M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 9, p. 344–355, 2011.

SANTOS, A.; PENHA, H.; BELLEC, A.; MUNHOZ, C.F.; PEDROSA-HARAND, A.; BERGÈS, H.; VIEIRA, M.L.C. Begin at the beginning: a BAC-end view of the passion fruit (*Passiflora*) genome. **BMC Genomics**, Stuttgart, v. 15, p. 1–16, 2014.

SARKAR, D. **Lattice**: multivariate data visualization with R. New York: Springer, 2008. 265 p.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **O cultivo e o mercado do maracujá**. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/O-cultivo-e-o-mercado-do-maracuj%C3%A>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

SINGH, D.P. **Breeding for resistance to diseases and insect pests**. Berlin: Springer Verlag, 1986. 25 p.

SOCQUET-JUGLARD, D.; DUFFY, B.; POTHIER, J.F.; CHRISTEN, D.; GESSLER, C.; PATOCCHI, A. Identification of a major QTL for *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* resistance in apricot. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 9, p. 409–421, 2013.

SPOLTI, P.; SCHNEIDER, L.; SANHUEZA, R.M.V.; BATZER, J.C.; GLEASON, M.L.; DEL PONTE, E.M. Improving sooty blotch and flyspeck severity estimation on apple fruit with the aid of standard area diagrams. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 129, p. 21–29, 2011.

SUN, H.; WEI, J.; ZHANG, J.; YANG, W. A comparison of disease severity measurements using image analysis and visual estimates using a category scale for genetic analysis of resistance to bacterial spot in tomato. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 139, p. 125–136, 2014.

SURICO, G. The concepts of plant pathogenicity, virulence/avirulence and effector proteins by a teacher of plant pathology. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 52, p. 399–417, 2013.

TAR'AN, B.; MICHAELS, T.E.; PAULS, K.P. Mapping genetic factors affecting the reaction to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* L. under field conditions. **Genome**, Ottawa, v. 44, p. 1046–1056, 2001.

TARDIANI, A.C.; PERECIN, D.; PEIXOTO-JUNIOR, R.F.; SANGUINO, A.; LANDELL, M.M.G.; BERIAM, L.O.; NUNES, D.S.; CAMARGO, L.E.A.; CRESTE, S. Molecular and pathogenic diversity among Brazilian isolates of *Xanthomonas albilineans* assessed with SSR marker loci. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, p. 540-546, 2014.

TOLEDO, E.R.; LEANDRO, R.A.; SOUZA, A.P. Mapeamento de QTLs: uma abordagem bayesiana. **Revista Brasileira de Biometria**, São Paulo, v. 26, p. 107-114, 2008.

TONU, N.N.; DOULLAH, A.; SHIMIZU, M.; KARIM, M.; KAWANABE, T.; FUJIMOTO, R.; OKAZAKI, K. Comparison of positions of QTLs conferring resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica oleracea*. **American Journal of Plant Sciences**, Berkeley, v. 4, p. 11-20, 2013.

VAN DER PLANK, J.E. **Plant diseases: epidemics and control**. New York: Academic Press, 1963. 349 p.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; YANG, P.; ALVAREZ, A.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Taxonomy of the genus *Xanthomonas*. In: SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 157-192.

VENABLES, W.N.; RIPLEY, B.D. **Modern applied statistics with S**. New York: Springer, 2002. 498 p.

VIEIRA JÚNIOR, J.R.; FERNANDES, C.F.; SILVA, U.O.; ROCHA, R.B.; SILVA, D.S.G.; SANTOS, A.R.; PEREIRA, F.S. **Desenvolvimento de escala diagramática de severidade para a ferrugem do pinhão-mansão**. Porto Velho: Embrapa, 2011. 15 p.

WETZEL, M.M.V.S.; GIMENES, M.A.; PÁDUA, J.G.; JOSÉ, S.C.B.R.; PEREIRA NETO, L.G. Conservação de espécies silvestres com potencial de utilização em programas de pré-melhoramento na coleção base da Embrapa. In LOPES, M.A.; FÁVERO, A.P.; FERREIRA, M.A.J.F.; FALEIRO, F.G.; FOLLE, S.M.; GUIMARÃES, E.P. **Pré-melhoramento de plantas: estado da arte e experiências de sucesso**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2011. p. 99–122.

WOHNER, T.W.; FLACHOWSKY, H.; RICHTER, K.; GARCIA-LIBREROS, T.; TROGNITZ, F.; HANKE, M.V.; PEIL, A. QTL mapping of fire blight resistance in *Malus robusta* after inoculation with different strains of *Erwinia amylovora*. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 34, p. 217–230, 2014.

WRIGHT, K. **Package corrgram 1.6**. 2014. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/corrgram/>>. Acesso em: 15 ago. 2014.

WU, R.L.; MA, C.X.; PAINTER, I.; ZENG, Z.B. Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species. **Theoretical Population Biology**, New York, v. 61, n. 3, p. 349-363, 2002a.

WU, R.L.; MA, C.X.; WU, S.S.; ZENG, Z.B. Linkage mapping of sex-specific differences. **Genetical Research**, London, v. 79, p. 85-96, 2002b.

WU, R.L.; MA, C.X.; CASELLA, G. **Statistical genetics of quantitative traits: linkage, maps and QTL**. New York: Springer, 2007. 365 p.

WULFF, N.A. Bactérias causadoras de doenças em vegetais. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interações planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 51-114.

YADAV, N.V.S.; DE VOS, S.M.; BOCK, C.H.; WOOD, B.W. Development and validation of standard area diagrams to aid assessment of pecan scab symptoms on fruit. **Plant Pathology**, London, v. 62, n. 2, p. 325–335, 2013.

YANG, N.; REIGHARD, G.; RITCHIE, D.; OKIE, W.; GASIC, K. Mapping quantitative trait loci associated with resistance to bacterial spot (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) in peach. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 9, p. 573–586, 2013.

ZENG, Z-B. Theoretical basis of separation of multiple linked gene effects on mapping quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, Washington, v. 90, p. 10972-10976, 1993.

ZUIN, A.G.; YARIWAKE, J.H.; BICCHI, C. Avaliação da transferência de pesticidas organoclorados e organofosforados da droga vegetal para o chá no processo de infusão de *Passiflora alata* L. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS: Natureza, Ciência e Comunidade, 5., 2001, Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP, 2001. p. 17.

ANEXOS

Anexo A

Tabela 28 - Valores genéticos preditos para o caráter área de necrose para os 100 genótipos da população e seus genitores (BLUPs), considerando cada um dos isolados inoculados

Genótipo	M129 (2010)	PA8-2 (2012)	AP302 (2013)	Genótipo	M129 (2010)	PA8-2 (2012)	AP302 (2013)
8	1,0401	1,1774	0,8912	88	1,0899	1,1940	0,9413
9	0,9702	1,1565	0,8491	89	0,9127	1,1453	0,8889
10	0,7076	1,0722	0,6217	91	1,4416	1,3078	1,2577
11	1,1377	1,2384	1,3402	92	1,2878	1,2873	1,4794
12	1,5221	1,3540	1,5777	93	1,3267	1,2985	1,4969
13	1,2698	1,2269	0,7927	94	1,7860	1,4414	1,8392
14	1,7069	1,3910	1,4641	95	1,2524	1,2602	1,2546
15	1,3227	1,2687	1,1431	96	1,3307	1,3022	1,5300
16	1,8651	1,4712	1,9621	97	0,9599	1,1697	1,0429
17	1,6848	1,4074	1,7328	98	0,8822	1,1589	1,1485
18	1,2403	1,2774	1,5031	99	1,0743	1,2101	1,1868
20	1,1616	1,2272	1,1292	100	1,7680	1,4082	1,4869
21	1,6027	1,3684	1,5067	102	1,1464	1,2271	1,1749
37	0,6871	1,1010	1,0376	103	1,1824	1,2395	1,2153
43	1,0239	1,1909	1,1066	106	1,1436	1,2153	1,0377
44	1,0043	1,1930	1,1920	107	1,2269	1,2358	1,0336
45	1,1573	1,2283	1,1550	109	1,3215	1,2775	1,2542
47	1,2344	1,2620	1,3324	110	1,2528	1,2361	0,9575
48	0,9288	1,1565	0,9761	111	1,5564	1,3330	1,2141
49	1,3446	1,3154	1,6496	113	1,4044	1,3244	1,5761
50	0,9802	1,1667	0,9431	114	1,2738	1,2721	1,3357
52	1,3435	1,3057	1,5335	115	1,1558	1,2254	1,1242
53	1,8157	1,4514	1,8711	122	1,1976	1,2451	1,2377
54	1,5109	1,3285	1,2993	123	1,7902	1,4161	1,5152
55	1,0894	1,2119	1,1634	124	1,5246	1,3425	1,4288
56	1,1230	1,2139	1,0837	125	1,2429	1,2594	1,2738
58	1,2609	1,2435	1,0233	126	1,2685	1,2672	1,2919
59	0,7194	1,0920	0,8287	127	1,0686	1,1857	0,9056
60	1,0681	1,2247	1,3862	129	1,1122	1,2415	1,4559
61	1,4459	1,2968	1,1088	130	1,2490	1,2669	1,3482
62	1,3150	1,2733	1,2234	132	1,3510	1,2605	0,9559
63	1,4284	1,3311	1,5840	134	1,8083	1,4350	1,6919
64	1,6509	1,3623	1,2829	135	1,9237	1,4964	2,0910
65	1,1584	1,2172	1,0160	136	1,1298	1,2082	0,9931
66	0,8156	1,1418	1,1443	137	1,7301	1,4120	1,6501
67	1,1627	1,2220	1,0610	138	1,3960	1,3018	1,3243
68	1,5897	1,3808	1,6989	139	1,8458	1,4609	1,8951
69	1,3595	1,2777	1,1406	140	1,3190	1,2516	0,9448
71	1,1654	1,2278	1,1249	143	0,7216	1,1001	0,9207
73	1,5474	1,3355	1,2724	144	1,1168	1,2082	1,0327
74	1,4848	1,3224	1,3043	145	0,8548	1,1215	0,7741
76	1,2151	1,2603	1,3709	147	1,1007	1,2405	1,4796
77	0,8154	1,1187	0,8613	148	0,9562	1,2005	1,4324
78	1,3946	1,3024	1,3360	149	1,4380	1,3404	1,6686
79	0,8223	1,1190	0,8438	150	0,7340	1,1031	0,9192
82	1,8438	1,4411	1,6580	151	1,6258	1,3868	1,6613
83	1,5042	1,3302	1,3404	152	1,2358	1,2563	1,2577
84	1,0284	1,2119	1,3501	153	0,9820	1,1797	1,0973
85	1,3826	1,3050	1,4049	154	1,2114	1,2474	1,2243
86	0,9368	1,1780	1,2163	2(12)	1,4757	1,3351	1,4884
87	1,0136	1,1851	1,0666	SV3	1,1147	1,2021	0,9644

Anexo B

Tabela 29 - Valores genéticos preditos para o caráter área de lesão para os 100 genótipos da população e seus genitores (BLUPs), considerando cada um dos isolados inoculados

Genótipo	M129 (2010)	PA8-2 (2012)	AP302 (2013)	Genótipo	M129 (2010)	PA8-2 (2012)	AP302 (2013)
8	0,8505	0,8440	0,8379	88	0,8316	0,8269	0,8310
9	0,8497	0,8452	0,8529	89	0,8370	0,8420	0,8320
10	0,8407	0,8389	0,8340	91	0,8770	0,8907	0,8686
11	0,8476	0,8488	0,8653	92	0,8537	0,8883	0,8749
12	0,8761	0,8672	0,8848	93	0,8901	0,9029	0,9025
13	0,8656	0,8439	0,8305	94	0,8873	0,8754	0,8884
14	0,8624	0,8455	0,8556	95	0,8579	0,8274	0,8545
15	0,8764	0,8782	0,8654	96	0,8925	0,9151	0,9236
16	0,9066	0,8875	0,9066	97	0,8479	0,8531	0,8534
17	0,9167	0,9296	0,9099	98	0,8457	0,8561	0,8647
18	0,8552	0,8541	0,8704	99	0,8504	0,8380	0,8464
20	0,8600	0,8591	0,8603	100	0,9059	0,8964	0,8917
21	0,8557	0,8520	0,8636	102	0,8561	0,8686	0,8697
37	0,8306	0,8426	0,8558	103	0,8310	0,8387	0,8302
43	0,8550	0,8631	0,8594	106	0,8485	0,8587	0,8483
44	0,8594	0,8716	0,8701	107	0,8562	0,8638	0,8363
45	0,8558	0,8693	0,8453	109	0,8530	0,8433	0,8535
47	0,8542	0,8472	0,8602	110	0,8599	0,8408	0,8348
48	0,8420	0,8538	0,8433	111	0,8949	0,8706	0,8699
49	0,8593	0,8606	0,8837	113	0,8948	0,8988	0,8916
50	0,8348	0,8340	0,8492	114	0,8773	0,8940	0,8916
52	0,8579	0,8574	0,8644	115	0,8674	0,8571	0,8496
53	0,8919	0,8937	0,9105	122	0,8592	0,8617	0,8648
54	0,8825	0,8789	0,8714	123	0,8878	0,8786	0,8729
55	0,8355	0,8387	0,8467	124	0,8684	0,8681	0,8818
56	0,8844	0,8812	0,8680	125	0,8613	0,8670	0,8623
58	0,8725	0,8631	0,8500	126	0,8895	0,8772	0,8847
59	0,8163	0,8199	0,8196	127	0,8283	0,8351	0,8264
60	0,8508	0,8475	0,8688	129	0,8348	0,8517	0,8558
61	0,8686	0,8627	0,8502	130	0,8647	0,8482	0,8563
62	0,8630	0,8611	0,8568	132	0,8664	0,8656	0,8523
63	0,8628	0,8693	0,8807	134	0,8837	0,8704	0,8784
64	0,8646	0,8437	0,8535	135	0,9445	0,9222	0,9266
65	0,8721	0,8892	0,8661	136	0,8264	0,8257	0,8156
66	0,8510	0,8653	0,8813	137	0,8767	0,8577	0,8808
67	0,8873	0,8650	0,8797	138	0,8580	0,8484	0,8511
68	0,8730	0,8692	0,8662	139	0,8867	0,8688	0,8758
69	0,8843	0,8884	0,8680	140	0,8788	0,8881	0,8501
71	0,8365	0,8503	0,8485	143	0,8415	0,8656	0,8580
73	0,9129	0,9254	0,8996	144	0,8600	0,8605	0,8462
74	0,8742	0,8820	0,8642	145	0,8374	0,8295	0,8286
76	0,8814	0,8882	0,8832	147	0,8523	0,8579	0,8792
77	0,8400	0,8433	0,8481	148	0,8336	0,8469	0,8536
78	0,8875	0,8905	0,8958	149	0,8732	0,8563	0,8696
79	0,8609	0,8451	0,8496	150	0,8236	0,8459	0,8441
82	0,9371	0,9100	0,9160	151	0,8845	0,8698	0,8720
83	0,8699	0,8556	0,8698	152	0,8739	0,8706	0,8763
84	0,8678	0,8576	0,8813	153	0,8469	0,8624	0,8416
85	0,8588	0,8632	0,8723	154	0,8581	0,8568	0,8500
86	0,8627	0,8727	0,8815	2(12)	0,9231	0,9571	0,9284
87	0,8634	0,8712	0,8524	SV3	0,8245	0,8445	0,8318