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

**Mapas de ligação e mapeamento de QTL (“Quantitative Trait Loci”) em
maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**

Michel Choairy de Moraes

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

Piracicaba

2005

Michel Choairy de Moraes
Engenheiro Agrônomo

Mapas de ligação e mapeamento de QTL (“Quantitative Trait Loci”) em maracujá-amarelo
(*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)

Orientadora:
Prof^ª Dra. Maria Lucia Carneiro Vieira

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

Piracicaba
2005

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

Moraes, Michel Choairy de

Mapas de ligação e mapeamento de QTL ("Quantitative Trait Loci") em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) / Michel Choairy de Moraes. - - Piracicaba, 2005.

141 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.
Bibliografia.

1. Mapeamento genético 2. Maracujá-amarelo 3. Marcador molecular
4. Melhoramento genético vegetal I. Título

CDD 634.425

Dedicatória

Aos meus pais,

Manoel Julio Ruas de Moraes

Maria Christina Choairy de Moraes

e à minha família.

Com amor,

Dedico

Agradecimentos

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” por ter me possibilitado a realização deste curso.

À CAPES e ao CNPq pela concessão das bolsas de estudo durante o curso.

À Professora Maria Lucia pela orientação, confiança e apoio durante toda a etapa da realização deste trabalho.

Aos Professores do curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelos conhecimentos compartilhados.

Aos Professores Isaias O. Geraldi e Antônio A. F. Garcia pelo auxílio e valiosas sugestões.

Ao Professor Alexandre S. G. Coelho pela valiosa contribuição para o trabalho.

À minha família, incluindo a Vanessa, pela paciência, companheirismo e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Genética da ESALQ/USP pelo companheirismo e apoio.

Aos funcionários do campo experimental de Anhembi e do Departamento de Genética pelo apoio constante neste trabalho, especialmente ao Seu Natálio e Carlos Alberto.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 DESENVOLVIMENTO.....	11
2.1 Revisão bibliográfica.....	11
2.1.1 O maracujazeiro e sua importância.....	11
2.1.2 Melhoramento genético.....	14
2.1.3 Marcadores moleculares.....	19
2.1.4 Mapas genéticos.....	21
2.1.5 Mapeamento de QTL.....	27
2.1.6 Importância do mapeamento de QTL.....	34
2.2 Material e métodos.....	36
2.2.1 Material vegetal e preparo do experimento de campo.....	36
2.2.2 Delineamento experimental e características avaliadas.....	38
2.2.3 Análises estatísticas dos dados fenotípicos.....	40
2.2.4 Genotipagem molecular dos indivíduos F ₁	42
2.2.4.1 Extração e quantificação do DNA genômico.....	42
2.2.4.2 Procedimentos técnicos para a detecção dos locos AFLP.....	44
2.2.5 Construção dos mapas de ligação.....	50
2.2.6 Análise dos QTL.....	53
2.2.6.1 Marcas simples.....	53
2.2.6.2 Mapeamento por intervalo composto.....	54
2.3 Resultados e discussão.....	56
2.3.1 Análises fenotípicas.....	56
2.3.2 Genotipagem molecular dos indivíduos F ₁	67
2.3.3 Segregação das marcas.....	67
2.3.4 Mapas de ligação.....	69
2.3.5 Alinhamento dos mapas.....	79
2.3.6 Mapeamento de QTL.....	80

2.3.6.1 Marcas simples.....	80
2.3.6.2 Mapeamento por intervalo composto.....	84
2.3.6.3 Análise dos QTL.....	104
2.3.6.4 Perspectivas.....	111
3 CONCLUSÕES.....	113
REFERÊNCIAS.....	114
ANEXO.....	140

RESUMO

Mapas de ligação e mapeamento de QTL (“Quantitative Trait Loci”) em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)

A despeito da importância comercial da cultura do maracujá-amarelo para o Brasil, estudos genéticos e de melhoramento são bastante escassos. Neste trabalho, foi conduzido um experimento visando construir mapas de ligação e mapear QTL para caracteres relacionados à produção e qualidade de frutos. Foi utilizada uma população composta por 160 indivíduos, proveniente do cruzamento de duas plantas dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123. Devido à alogamia da espécie, optou-se pela abordagem de mapeamento conhecida por “pseudocruzamento teste” para a construção de dois mapas de ligação, sendo um para cada genitor, utilizando marcadores moleculares do tipo AFLP, com segregação 1:1 e 3:1. No mapa do acesso IAPAR-06 foram obtidos 10 grupos de ligação, enquanto que no mapa do IAPAR-123, nove grupos foram obtidos. Os locos bi-parentais foram alocados como marcas acessórias nos mapas de ligação e serviram para o estabelecimento da homologia entre os grupos de ligação de cada genitor. Um total de oito grupos de ligação foi alinhado com base nesses locos. Em paralelo, procedeu-se a avaliação fenotípica de 100 indivíduos dessa mesma população, os quais foram avaliados em campo, na primeira safra de produção da cultura, para uma série de caracteres, quais sejam: velocidade de crescimento; produção total; número total de frutos; peso médio de frutos; comprimento e largura média de frutos; porcentagem de polpa; teor de sólidos solúveis totais; e formato médio de frutos. As análises genético-estatísticas dos dados fenotípicos indicaram que a população é amplamente variável para os caracteres avaliados, com exceção da velocidade de crescimento, apresentando coeficientes de herdabilidade entre médias que variaram de 52,6 a 83,0%. O mapeamento de QTL, utilizando o método de mapeamento por intervalo composto, identificou várias regiões associadas ao controle desses caracteres nos mapas individuais. Foram mapeados QTL para todos os caracteres que apresentaram variabilidade genética na população. A proporção da variação fenotípica explicada pelos QTL detectados variou de 4,6 até 21,8%.

Palavras-chave: Maracujá; Mapa genético; AFLP; Mapeamento de QTL; Pseudocruzamento teste

ABSTRACT

Linkage maps and QTL mapping in the yellow passion-fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)

Although the yellow passion-fruit plays an important commercial role in Brazil, breeding and genetics studies are insipient. The present study was conducted aiming the construction of linkage maps and mapping of QTL for traits related to yield and fruit quality. It was used a population, composed of 160 individuals, derived from a cross from two plants of the IAPAR-06 and IAPAR-123 accessions. Since this is an allogamous species, the pseudo testcross mapping strategy was used for the construction of two linkage maps, one for each parent, using AFLP markers segregating in 1:1 and 3:1 configuration. The IAPAR-06 map was composed of 10 linkage groups, while in IAPAR-123 map, nine linkage groups were obtained. The bi-parental loci were located as accessory markers and served to establish the homology between the groups of each parent. Eight linkage groups were aligned using these markers. For the phenotypic evaluation, 100 individuals were evaluated in the field, during the first harvest of the culture, for various traits, including: growth increment, total yield, total number of fruits, average fruit weight, average fruit length, average fruit width, percentage of pulp, soluble solids content and fruit shape. The results of the phenotypic data indicated that the population had a wide genetic variance for all the traits, with the exception of growth increment, presenting broad-sense heritability varying from 52.6% to 83.0%. The analysis of QTL, using the composite interval method, has mapped various regions associated with the traits evaluated in both maps. It was mapped QTL for all the traits that exhibited genetic variation. The proportion of the phenotypic variation explained by the QTL identified ranged from 4.6 to 21.8%.

Keywords: Passion fruit, Linkage maps; AFLP; QTL mapping; Pseudo testcross

1 INTRODUÇÃO

O maracujazeiro é uma espécie frutífera de cultivo relativamente recente no Brasil. A cultura tem adquirido importância, notadamente, a partir das três últimas décadas e, atualmente, coloca o país em situação de destaque no cenário mundial, como o principal produtor.

Os cultivos comerciais baseiam-se praticamente numa única espécie, *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg., uma vez que ela ocupa 95% dos pomares (Melletti, 2003). Ela é plantada em quase todos os estados brasileiros, proporcionando economia e renda em inúmeros municípios, com forte apelo social, já que se destaca como uma lavoura com uso intensivo de mão-de-obra. Não obstante essa pujança, a pesquisa não tem acompanhado esse crescimento de forma adequada, sobretudo em relação ao melhoramento e obtenção de variedades (Ferreira, 2002).

A grande maioria das características de importância agrônômica de qualquer espécie, como produção, resistência a pragas e doenças, altura de plantas, dentre outras, resulta da ação conjunta de vários genes, cuja expressão sofre influência do ambiente. O padrão de variação fenotípica dessas características é contínuo, geralmente apresentando uma distribuição normal de valores. O termo “*Quantitative Trait Loci*”, ou QTL, tem sido usado para denominar regiões cromossômicas (locos) que controlam caracteres quantitativos (Falconer & Mackay, 1996).

Com o advento de marcadores moleculares baseados na técnica da PCR (“*Polimerase Chain Reaction*”), isto é, o RAPD (Williams et al., 1990), o AFLP (Vos et al., 1995) e os microssatélites (Litt & Luty, 1989), a construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica se tornou possível para praticamente todas as espécies. A obtenção desses mapas possibilita o mapeamento de QTL, ou seja, a localização em grupos de ligação, a quantificação e a caracterização de seus efeitos, o número de locos envolvidos e a respectiva distribuição no genoma dos locos controlando características quantitativas. Este conjunto de informações genéticas é um recurso poderoso no estudo da herança desses caracteres, criando novas perspectivas para aperfeiçoar os métodos de seleção e melhoramento.

A maioria dos experimentos de mapeamento genético utiliza populações oriundas do cruzamento entre linhagens endogâmicas. No entanto, em espécies florestais e frutíferas, a obtenção de tais populações é impraticável, seja pelo tempo necessário para a sua obtenção ou, ainda, pela grande depressão por endogamia que ocorre nessas espécies quando autofecundadas.

Assim, a abordagem “pseudocruzamento teste” é uma alternativa para a construção de mapas genéticos e para o mapeamento de QTL em tais espécies. Tal abordagem, proposta originalmente para o eucalipto (Grattapaglia & Sederoff, 1994), se baseia na análise de uma população resultante do cruzamento de dois indivíduos altamente heterozigóticos e na busca de configurações informativas de locos revelados por marcadores moleculares.

Dando continuidade a uma linha de pesquisa do Departamento de Genética da ESALQ/USP sobre a espécie *P. edulis* f. *flavicarpa*, o presente trabalho teve por objetivo:

- a) Avaliar uma população F₁ de maracujá-amarelo, obtida do cruzamento entre duas plantas dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123, quanto a uma série de caracteres quantitativos;
- b) Estimar parâmetros genéticos e fenotípicos, tais como, variância genética e fenotípica, coeficiente de herdabilidade, coeficiente de correlação genética e resposta esperada à seleção, com vistas a determinar o potencial dessa população para fins de melhoramento genético, bem como estabelecer estratégias de seleção;
- c) Construir mapas genéticos baseados em marcadores moleculares do tipo AFLP com segregação 1:1 e 3:1;
- d) Utilizar marcas bi-parentais para a identificação de grupos homólogos entre os genitores;
- e) Mapear QTL relacionados aos caracteres fenotípicos avaliados.

Ressalte-se, ainda, que a proposta do presente trabalho é pioneira para a cultura do maracujá-amarelo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 O maracujazeiro e sua importância

O termo maracujazeiro é usado para referir-se a várias espécies do gênero *Passiflora* L., o qual pertence à família *Passifloraceae* (Bruckner et al., 2002). As *Passifloraceae* estão largamente distribuídas pelos trópicos, com cerca de 600 espécies, sendo a maioria habitante da América tropical e, principalmente, nativas do Brasil. O gênero *Passiflora* é considerado o mais importante, pois apresenta um grande número de espécies, entre as quais estão aquelas exploradas comercialmente no mundo (Inglez de Souza & Meletti, 1997). Os maracujazeiros são cultivados pelas suas propriedades alimentícias, ornamentais ou medicinais, mas principalmente, pela qualidade de seus frutos (Meletti & Bruckner, 2001). Martin & Nakasone (1970) estimaram que existam entre 50 e 60 espécies de *Passiflora* com fruto comestível.

As plantas do gênero *Passiflora* são dependentes da polinização cruzada para a formação do fruto, pelo fato de suas flores apresentarem mecanismos que dificultam a ocorrência da auto polinização, como a presença dos estigmas no ápice do androginóforo, numa posição superior às anteras, que estão localizadas logo abaixo dos estigmas; há a ocorrência do fenômeno da protandria e, ainda, algumas espécies, como *P. edulis*, apresentam a auto-incompatibilidade reforçando, assim, a alogamia (Hoffmann, 1997).

Apesar da ampla variabilidade intra e interespecífica do gênero *Passiflora*, a principal espécie cultivada no Brasil é a *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., o maracujá-amarelo, que ocupa 95% dos pomares brasileiros (Ruggiero et al., 1996). Outras espécies exploradas no Brasil, de menor importância comercial e cultivo bastante regionalizado são o maracujá roxo (*Passiflora edulis*), o maracujá doce (*Passiflora alata*), o maracujá melão (*Passiflora quadrangularis*), o maracujá tubarão (*Passiflora cincinnata*) e o maracujá suspiro (*Passiflora nitida*) (Inglez de Souza & Meletti, 1997; Pereira et al., 1998; Piza Junior, 1998).

Além do Brasil, também são produtores de maracujá, Equador, Colômbia, Peru, Austrália, Nova Zelândia, Estados Unidos (no Havaí) e outros países da América do Sul e Central, Ásia e África (Manica & Oliveira Jr., 2003), embora nem todos cultivem a mesma espécie.

As primeiras pesquisas para desenvolver um cultivo comercial de maracujá-amarelo se iniciaram em 1951 na Universidade do Havaí. Ao final desta década, o cultivo comercial passou para a América do Sul onde, devido à presença de seus polinizadores naturais, a planta recuperou sua variabilidade e um sistema de propagação baseado na reprodução sexual. O “boom do maracujá” se deu no final dos anos 80 e início dos anos 90, quando a Venezuela, a Colômbia, o Equador, o Peru e o Brasil incrementaram sua produção para responder à demanda de suco que os europeus tinham começado a apreciar com os sucos multivitamínicos, além de seu crescente interesse pelos produtos tropicais. Na corrida do crescimento e da competição, a superprodução causou uma queda dos preços a níveis insustentáveis para os produtores. Em seguida, a própria queda da produção provocou uma recuperação dos preços. Estes ciclos de crescimento e declínio têm provocado variações de preços entre US\$2.000 e US\$6.000 por tonelada de suco concentrado, assustando tanto aos compradores internacionais como aos produtores. Como alternativa, grande parte dos esforços tem sido dirigida ao mercado nacional, que tem respondido favoravelmente. Na Colômbia e no Brasil, a maior parte da produção é comercializada no país e os consumidores da fruta fresca oferecem preços muito competitivos frente à indústria processadora (d’Eeckenbrugge, 2003).

A fruticultura brasileira é hoje uma atividade agrícola de grande interesse para o país, pois agrega características desejáveis para outras atividades afins, como a demanda de mão-de-obra rural, uma vez que se buscam alternativas viáveis para manter o homem no campo, diminuir o inchaço populacional das cidades e gerar empregos; para a economia, que visa novos caminhos, para aumentar as exportações, tendo na fruta brasileira um produto de boa aceitação no mercado internacional; para o produtor rural, que procura uma boa lucratividade em sua atividade comercial; além de ser um ingrediente essencial para uma alimentação saudável para a população (Manica & Oliveira Jr., 2003).

As características acima apontadas estão presentes no caso da cadeia do agronegócio do maracujá que é comercializado predominantemente em duas formas: fruta fresca para consumo *in natura* e suco de fruta, o qual se tem mantido em terceiro lugar entre os sucos produzidos no Brasil, atrás do suco de laranja e de caju (Aguiar & Santos, 2001). A cultura caracteriza-se por

ser uma atividade desenvolvida em pequenas propriedades, com tamanho entre três e cinco hectares e mão-de-obra eminentemente familiar, o que representa uma alternativa para os pequenos proprietários, contribuindo para valorizar o trabalho do pequeno agricultor (Meletti, 2003; Nogueira Filho et al., 2003).

A produção de maracujá está espalhada praticamente em todos os estados brasileiros, destacando-se os estados: Pará, Bahia, Sergipe, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (Bruckner, 2002). A produção brasileira apresentou, na última década, um comportamento crescente até o ano de 1996, quando atingiu 409.497 toneladas, ocupando uma área de 44.462 hectares. Já em 2000, a produção foi de 330.777 toneladas em uma área total de 33.428 ha (FNP, 2004). A Figura 1 mostra a evolução da produção de maracujá no Brasil, que é ainda o maior produtor mundial.

Figura 1 – Produção brasileira de maracujá amarelo de 1982 a 2002. Fontes: Leite et al. (1994); FNP (2004)

Apesar do destaque da produção brasileira, a produtividade nacional é muito baixa. Situa-se entre 10 a 15 toneladas por hectare devido, principalmente, à pequena utilização da tecnologia de produção recomendada para a cultura (Meletti & Maia, 1999). De acordo com Stenzel & Sera (1999), a propagação do maracujá tem sido realizada através de sementes retiradas de matrizes de plantios comerciais de polinização aberta, onde há grande heterogeneidade entre plantas com relação à produção, resistência a doenças entre outras características. Como resultado, há uma grande variabilidade, com alta porcentagem de frutos de qualidade inferior.

Sendo uma planta de cultivo comercial bastante recente, e apresentando uma grande variabilidade genética natural para várias características, o melhoramento genético do

maracujazeiro pode vir em muito contribuir para o aumento da produtividade e qualidade dos frutos.

2.1.2 Melhoramento genético

Grande parte da variabilidade genética encontrada dentro do gênero *Passiflora* está dispersa no território brasileiro e pode ser explorada nos programas de melhoramento.

Com a expansão das fronteiras agrícolas, há uma preocupação quanto à extinção de espécies silvestres, mas, devido à escassez de pesquisas nesta área, muitas espécies de *Passiflora* são ainda desconhecidas, e outras estão em processo de domesticação. O resgate e a conservação de germoplasma local em coleções são imperativos, assim como é recomendável a introdução de acessos de outros países (Ferreira, 2002).

A preservação de germoplasma de *Passiflora* no Brasil é feita principalmente, por meio de plantas vivas e sementes (Oliveira & Ruggiero, 1998). As principais coleções estão localizadas na UNESP, em Jaboticabal, SP; na UESB, em Vitória da Conquista, BA; no IAC, em Campinas, SP; no IAPAR, em Londrina, PR; na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, DF e na Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, BA.

A caracterização do germoplasma vem sendo realizada por diversos pesquisadores no Brasil (Giacometti & Ferreira, 1977; Oliveira, 1980; Oliveira, 1987; Oliveira et al., 1988; Ferreira & Oliveira, 1991; Meletti et al. 1992; Ferreira, 1994; Meletti et al. 1994; Soares-Scott, 1998; Cunha, 1999; Meletti et al., 1999). Estes trabalhos indicam grandes variações no florescimento, produtividade, resistência a pragas e moléstias, tolerância ao frio e, principalmente, nas características dos frutos. Melletti et al. (1997) concluíram que é possível e recomendável explorar essa variabilidade natural em programas de melhoramento, com significativos ganhos genéticos, devido à diversidade disponível.

É de conhecimento dos pesquisadores a ampla variabilidade genética naturalmente disponível, tanto inter como intra-específica, de interesse para os programas de melhoramento genético. De fato, o melhoramento do maracujazeiro constitui um vasto campo de pesquisas, bastante promissor, já que trabalhos nessa área são escassos.

O conhecimento da citologia ainda é bem limitado dentro de *Passiflora*, sendo que apenas uma parte das espécies teve seu número cromossômico estabelecido (Snow, 1993). A maioria das espécies apresenta $2n=12$ ou 18, mas $2n=24$, 14, 20, 84, 27 e 36 também são conhecidos. As espécies de maior importância hortícola, como *P. edulis* têm $2n=18$ cromossomos.

O maracujazeiro é uma planta alógama por excelência. A polinização cruzada é condicionada pelo fenômeno da auto-incompatibilidade, em que o pólen de uma planta é incapaz de fertilizar as flores da mesma planta, e diferentes plantas podem ou não ser compatíveis entre si. A fertilização requer a presença de diferentes genótipos (Akamine & Girolami, 1959; Knight Jr. & Winters, 1962; Ruggiero, 1987; Bruckner et al. 1995) e há evidências de que a auto-incompatibilidade no maracujazeiro-amarelo seja controlada por dois locos, o gene S e um gene gametofítico, o qual age em associação com o gene esporofítico (Rego et al., 1999; 2000).

Os objetivos dos programas de melhoramento em maracujazeiro-amarelo, segundo Oliveira & Ferreira (1991) devem considerar: alta produtividade e alto vigor, resistência ou tolerância a pragas e doenças, adaptação ampla, frutos grandes, alto teor de suco, coloração amarelo dourada do suco, alto teor de sólidos solúveis e de acidez e resistência a transporte e armazenamento. Meletti (2003) cita que o melhoramento do maracujazeiro no Brasil está diretamente relacionado ao fruto, seja no aspecto produtividade ou qualidade, e ainda diferencia os objetivos de acordo com o destino do fruto, ou seja, à indústria ou ao mercado *in natura*. Se desenvolvido para o mercado *in natura*, deve apresentar frutos com boa aparência, grandes e ovais, a fim de se conseguir boa classificação comercial, ser resistente ao transporte e à perda de qualidade durante o armazenamento e comercialização. Se desenvolvido para a agroindústria, o maracujá precisa ter casca fina e cavidade interna totalmente preenchida, o que confere maior rendimento em suco, deve apresentar maior teor de acidez, coloração constante e alto teor de sólidos solúveis.

Os primeiros estudos visando o melhoramento da cultura no Brasil foram realizados na UNESP, em Jaboticabal – SP, no início da década de 70 (Oliveira, 1980). O programa consistia na introdução, seleção massal e hibridação de populações de maracujá-amarelo brasileiras e havaianas, visando gerar aumento de produtividade, do teor de sólidos solúveis, maior rendimento de suco, dentre outras características de interesse. Segundo Oliveira (1980), a população de maracujá obtida por hibridação foi superior em produção àquela obtida por seleção

massal em 11,4% na primeira safra, sendo que a diferença entre as médias de produção do segundo ano não foi significativa.

Maluf et al. (1989) selecionaram 110 plantas de maracujazeiro-amarelo de pomares comerciais do triângulo mineiro, clonando-as por estaquia, e avaliaram seus descendentes, estudando o ganho genético via seleção dos melhores clones. Verificaram, pela alta herdabilidade estimada, existir variação genética para produção total e precoce e para peso médio de frutos. Para o teor de sólidos solúveis foi encontrada herdabilidade moderadamente elevada, mas sujeita à considerável interação entre genótipos e datas de amostragem. A herdabilidade estimada para porcentagem de polpa foi inferior àquela para sólidos solúveis, porém menos sujeita à interação com datas de amostragem. De acordo com os autores, maiores ganhos são esperados para produção total e precoce e para peso médio de frutos do que para teor de sólidos solúveis ou porcentagem de polpa.

Oliveira & Ferreira (1991) citam a introdução de plantas, a hibridação, a seleção massal e a seleção com teste de progênie como métodos de melhoramento para o maracujazeiro. Cunha (1996) propôs que a seleção massal fosse feita na primeira colheita, com base no vigor vegetativo e na produção pendente, e as sementes coletadas na segunda e terceira colheitas de plantas selecionadas, polinizadas manualmente com mistura de pólen igualmente selecionado. Essa medida visa otimizar o ganho genético por ciclo, em virtude de a seleção ser feita nos dois sexos. Embora o ganho genético por ciclo seja otimizado, deve-se considerar o aumento do tempo necessário para que o ciclo seja completado, o que pode levar à redução do ganho por ano.

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

O material conhecido como “Maguary” teve sua origem em um lote de plantas provenientes de pomares comerciais do Triângulo Mineiro, inicialmente mantido sob polinização aberta. Esses pomares, por sua vez, foram formados, principalmente, por sementes oriundas de Votuporanga, a primeira região produtora de destaque em São Paulo, por volta de 1971 (Meletti, 2003). A este material foram adicionados outros acessos vindos do Nordeste brasileiro, algum germoplasma silvestre, acessos da UNESP de Jaboticabal, materiais de outros países e outros

estados que se destacavam como produtores nacionais, conforme relato de Piza Junior (1998). O material atualmente propagado com seleção “Maguary” inclui plantas muito vigorosas, de alto rendimento de suco, teor de acidez (3,5%) e de sólidos solúveis (14,5°Brix), com polpa de coloração amarelo forte e alaranjado.

A população conhecida como “Sul Brasil” é oriunda do trabalho de seleção iniciado em 1980 por um produtor do município de Rancharia-SP, e hoje é mantida pela Cooperativa Agrícola Sul-Brasil de Marília-SP. A produtividade é de 4 a 5 caixas/ano, os frutos são grandes, mas com casca grossa, com comprimento médio de 10 cm e largura de 7 cm, peso médio de 300 g e rendimento de suco variando de 19 a 38% com teor de sólidos solúveis de 10 a 16°Brix (Piza Junior, 1998).

Outros materiais disponíveis, com algum tipo de seleção dirigida, incluem os três híbridos intra-varietais IAC (IAC-273, IAC-275 e IAC-277), lançados em 1999, resultantes de um programa de melhoramento de nove anos, baseado em seleção massal, retrocruzamentos e teste de progênies, e ainda um material chamado “Composto IAC-27”, também lançado pelo IAC, formado pelo agrupamento não proporcional de quatro progênies selecionadas, duas delas em esquema de policruzamento, e outras duas resultantes da polinização aberta entre progenitores selecionados (Meletti, 2003).

No entanto, apesar dos bons resultados experimentais, a utilização comercial desses materiais ainda é limitada pelo custo das sementes e pelo desconhecimento das vantagens da semente melhorada. Também, todos estes genótipos são susceptíveis às principais doenças da parte aérea do maracujazeiro-amarelo.

Nas hibridações interespecíficas tem-se dado ênfase à transferência de caracteres favoráveis para a espécie cultivada. Híbridos interespecíficos foram obtidos combinando-se *P. edulis* com *P. incarnata*, *P. coccinea* ou *P. setacea* (Oliveira & Ruggiero, 1998) e *P. edulis* f. *flavicarpa* com *P. alata* (Nakasone & Paull, 1998). Contudo, a maioria desses híbridos apresenta problemas de desenvolvimento, dificuldade de florescimento e esterilidade masculina ou baixa viabilidade devido a gametas desbalanceados em relação ao número e morfologia dos cromossomos. A hibridação interespecífica para transferência dos genes de resistência ao maracujá comercial tem apresentado pouca aplicação prática. Geralmente, encontram-se problemas de macho-esterilidade parcial (Priolli, 1991) e alta variação morfológica nos frutos,

sem características comerciais desejáveis. Para recuperá-las, são necessárias muitas gerações de retrocruzamentos com o genitor comercial (Bruckner et al., 2002).

Como alternativas para transpor barreiras de incompatibilidade sexual interespecífica em *Passiflora*, tem sido usada a hibridação somática (Dornelas et al., 1995; Vieira, 1997; Vieira & Dornelas, 1996; Otoni, 2000). Devido à natureza complexa dos híbridos somáticos, sua utilização direta como material comercial é bastante restrita. Em *Passiflora*, a exemplo do que vem sendo feito em *Citrus*, a utilização dos híbridos somáticos seria direcionada à geração de porta-enxertos visando aproveitar características do híbrido somático como um maior vigor e/ou resistência a patógenos de solo.

Bruckner et al. (2002) citam a obtenção de híbridos oriundos de linhagens endogâmicas como estratégia viável para o maracujazeiro. Linhagens endogâmicas de maracujazeiro poderiam ser obtidas por meio de cruzamento entre plantas-irmãs, retrocruzamentos ou autopolinização no estágio de botão (Bruckner et al. 1995). Fernandes et al. (1996) verificaram que a autopolinização pode também ser conseguida realizando-se duas autopolinizações no dia da antese, às 13 e às 17 horas. Provavelmente, a primeira autopolinização anule o efeito de proteínas de incompatibilidade, de maneira que a segunda consiga, em parte, fertilizar os óvulos. Segundo Bruckner et al. (2002), a semente híbrida poderia ser obtida a partir de linhagem auto-incompatível, interplantada com linhagem com maior diversidade de alelos de incompatibilidade ou S. Nesse caso, a semente seria coletada apenas na linhagem auto-incompatível, dando origem a um híbrido com suficiente diversidade de alelos S. Albuquerque (2001) observou efeitos de heterose nas dimensões do fruto, na produção e em outras características, indicando ser interessante a produção de sementes híbridas comercialmente.

O melhoramento dirigido à obtenção de cultivares resistentes deve considerar doenças da parte aérea e do sistema radicular. Com relação às doenças da parte aérea, deve-se buscar a tolerância a diversos patógenos como o vírus do endurecimento dos frutos (*passionfruit wodness virus* – PWV), a resistência à mancha-de-alternaria (*Alternaria* spp.), à verrugose (*Cladosporium herbarium*), à antracnose (*Glomerella cingulata*) e à bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*), entre outras. As principais doenças do sistema radicular são a fusariose, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, e a podridão-do-pé causada por *Phytophthora* spp. (Nakasone & Paull, 1998; Liberato, 2002; Santana & Lau, 2002).

Na busca de soluções para o problema da bacteriose em maracujazeiro, o Departamento de Genética da ESALQ/USP tem desenvolvido estratégias para dar subsídios à obtenção de cultivares tolerantes à moléstia, utilizando marcadores moleculares e mapeando regiões do genoma que conferem essa tolerância (Lopes, 2003; Matta, 2005).

2.1.3 Marcadores moleculares

Sakiyama (1993) relata que o termo marcadores tem sido utilizado para designar fatores morfológicos, fisiológicos, bioquímicos ou genéticos passíveis de serem identificados e que permitem o estudo comparativo de genótipos e de suas progênes.

Embora os marcadores morfológicos e citológicos tenham tido extrema importância na elucidação de uma série de eventos genéticos, esses ocorrem em número reduzido, limitando a sua aplicação em análises genéticas. Esta limitação foi resolvida a partir do desenvolvimento de uma nova classe de marcadores, ditos marcadores moleculares, que incluem os protéicos e os de DNA (Fungaro & Vieira, 2001). A possibilidade, surgida na década de 60, de analisar as proteínas extraídas de um dado organismo por meio de eletroforese, dobrou o número de marcadores passíveis de serem utilizados em estudos biológicos. Com o advento das técnicas modernas de biologia molecular surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA, tornando o número de marcadores moleculares altamente polimórficos virtualmente ilimitado. A utilização de marcadores moleculares no estudo teórico e aplicado de espécies vegetais vem sendo cada vez maior. Estes marcadores possuem várias características desejáveis, como herança Mendeliana simples, ausência de efeitos epistáticos, abundância e alto polimorfismo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Existem, atualmente, vários tipos de marcadores moleculares, que são geralmente conhecidos por suas siglas. Geneticamente, pode-se separá-los em dois grupos principais: a) marcadores moleculares loco-específicos codominantes, como o RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism* - (Grodziker et al., 1974), os SSR - *Simple Sequence Repeats* - (Litt & Luty, 1989) e as isoenzimas e b) marcadores loco não específicos dominantes, como o RAPD - *Random Amplified Polimorphic DNA* - (Williams et al., 1990) e o AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism* - (Vos et al., 1995).

Os AFLP se baseiam na variação no comprimento de fragmentos de restrição amplificados seletivamente via PCR. O ensaio de AFLP combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da clivagem do genoma com enzimas de restrição com a velocidade e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR. Essencialmente uma análise de AFLP consiste em quatro etapas. Na primeira etapa, o DNA genômico total é clivado com duas enzimas de restrição. Na segunda etapa, adaptadores específicos são ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Na terceira etapa, uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR utilizando *primers* especificamente desenhados para reconhecer as seqüências dos adaptadores. Na quarta e última etapa, a subpopulação de fragmentos amplificados é separada em um gel de alta resolução e é feita a análise das bandas detectadas (Lopes et al., 2002).

O polimorfismo detectado pelos AFLP decorre normalmente da presença ou ausência do sítio de restrição para as enzimas utilizadas. Uma característica importante das marcas AFLP, diferente dos marcadores isoenzimáticos, RFLP e SSR (quando revelados por PCR) é a sua dominância. Alelos de um mesmo loco são revelados pela presença ou ausência de uma banda que, por sua vez, resulta da amplificação de um fragmento de determinado tamanho no gel. No entanto, não é possível saber se o loco amplificado está em homozigose ou heterozigose. Sendo assim, marcadores dominantes, ao contrário dos codominantes, não permitem a distinção entre genótipos homozigóticos dominantes e heterozigóticos, os quais constituem apenas uma classe, isto é, a que apresenta o alelo amplificado. Os indivíduos nos quais o alelo não é amplificado constituem a outra classe, considerada homozigótica para ausência da banda, qualquer que seja o motivo pelo qual o fragmento não foi amplificado. Apesar dessa limitação, são marcadores extremamente poderosos por permitirem a realização de mapas com um número bastante reduzido de géis, já que em um único gel, pode-se revelar a variação em até mais de uma centena de fragmentos (locos) simultaneamente (Coelho & Silva, 2002).

Marcadores AFLP têm sido extensivamente usados na construção de mapas de ligação em plantas (Simone et al., 1997; Marques et al., 1998; Barcaccia et al., 1999; Debener & Mattiesch, 1999; Remington et al., 1999; Lespinasse et al., 2000; Strommer et al., 2002) e na análise de QTL (Lerceteau et al., 2000; Lebrun et al., 2002; Crespel et al., 2002; Shepherd, et al., 2002).

2.1.4 Mapas genéticos

Um mapa de ligação constitui-se em uma representação da ordenação linear de um grupo de marcadores genéticos em grupos de ligação. Estes marcadores podem ser genes com funções definidas, regiões cromossômicas ou fragmentos de DNA identificados por alguma técnica específica.

As primeiras idéias sobre mapeamento genético surgiram com os trabalhos do grupo formado por Morgan e seus colaboradores. Foi Sturtevant, em 1913, quem sugeriu a utilização da frequência de recombinantes como uma medida da distância entre dois genes, permitindo a construção de mapas, nos quais a posição relativa dos marcadores fenotípicos de um determinado organismo poderia ser representada. Estas idéias se desenvolveram a partir de então, ao longo das décadas de 20, 30 e 40, com a participação de pesquisadores como R. A. Fisher, J. B. S. Haldane, D. D. Kosambi, A. R. G. Owen, entre outros (Bailey, 1961; Provine, 1971).

Embora, a princípio, estes mapas tenham sido bastante úteis em estudos básicos de genética, na primeira metade do século XX, seu uso em programas de melhoramento de plantas foi sempre bastante restrito (Coelho & Silva, 2002). Tal fato se justifica pelo baixo número de genes marcadores que estavam disponíveis para a maioria das espécies de interesse. Foi somente a partir da década de 80, com o advento dos marcadores de DNA, que o mapeamento genético tornou-se, efetivamente, ilimitado para todas as espécies (Botstein et al., 1980).

A grande disponibilidade de marcadores neutros, altamente polimórficos, cuja herança não sofre influência ambiental, aliada a procedimentos estatísticos complexos, tem permitido a construção de mapas de ligação para a maioria das espécies vegetais de interesse agrônomo, até mesmo para aquelas de longo ciclo de vida, como as florestais e as frutíferas (Carneiro & Vieira, 2002).

A metodologia de construção de um mapa de ligação envolve um grande número de técnicas e etapas, que incluem a escolha de genitores para o desenvolvimento de populações segregantes adequadas, a identificação dos genótipos de cada loco marcador e a utilização de diversas técnicas de análise estatística e computacional para a estimativa de ligação e distância entre marcadores (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

As populações mais utilizadas para o mapeamento genético são provenientes de retrocruzamentos, gerações F_2 , conjuntos de linhagens puras recombinantes, e conjuntos de

linhagens duplo-haplóides obtidas de gametas F_1 . Estas classes de populações são todas derivadas de plantas F_1 , de quem os genitores são linhas puras. Dessa forma, o desequilíbrio de ligação gerado pode ser visualizado nas populações segregantes, permitindo a análise de ligação. Ainda, nessas populações existem somente dois alelos segregando (no caso de espécies diplóides), e as fases de ligação desses alelos são conhecidas, o que facilita bastante as análises.

Em diversas situações a obtenção de linhagens endogâmicas é impraticável (espécies de ciclo longo) ou de difícil realização pela existência de forte depressão por endogamia (Gebhardt et al. 1989). Uma alternativa nestes casos é a análise de progênies resultantes de cruzamentos de indivíduos heterozigóticos (Ritter et al., 1990; Grattapaglia & Sederoff, 1994), em que a informação contida nos locos segregantes é utilizada para se detectar o desequilíbrio de ligação.

Grattapaglia & Sederoff (1994) propuseram a abordagem de mapeamento denominada de duplo “*pseudo-testcross*” ou “pseudocruzamento teste”, para gerar rapidamente mapas genéticos de ligação indivíduos-específicos em espécies altamente heterozigóticas. A denominação “duplo pseudocruzamento teste” se deve ao fato de que, a partir da análise de uma amostra de indivíduos na população de mapeamento, são selecionados, à *posteriori*, locos que segregam na proporção 1:1, como em um cruzamento-teste clássico. Dessa forma, dois conjuntos distintos de marcadores são gerados, sendo um para cada genitor do cruzamento, resultando em dois mapas de ligação.

Ressalte-se que a terminologia pseudocruzamento teste, no entanto, não é adequada, na medida em que marcadores com segregação do tipo 3:1, 1:2:1 e 1:1:1:1 (quando ambos os pais são heterozigóticos para o alelos diferentes do mesmo loco) podem ser utilizados juntamente com as marcas de segregação 1:1 (quando somente um dos pais é heterozigótico). Vários trabalhos têm usado essa denominação para designar a construção de mapas de ligação e o mapeamento genético em populações oriundas do cruzamento de dois indivíduos heterozigóticos, independentemente do tipo de marcador (dominante ou codominante) e do tipo de segregação utilizada (Maliepaard et al., 1998; Conner et al., 1998; Cervera et al., 2001; Liebhard et al., 2003; Kenis & Keulemans, 2005).

Essa estratégia de mapeamento tem sido aplicada em várias espécies, principalmente as frutíferas e florestais (Grattapaglia & Sederoff, 1994; Verhaegen & Plomion, 1996; Maliepaard et al., 1998; Marques et al., 1998; Lespinasse et al., 2000; Yin et al., 2001; Casasoli et al., 2001; Scalfi et al., 2004) e, entre elas, os mapas genéticos de maracujazeiro construídos no Laboratório

de Biologia Celular e Molecular de Plantas da ESALQ/USP (Carneiro, 2001; Lopes, 2003; Matta, 2005).

No trabalho de Carneiro (2001), 90 indivíduos F_1 foram genotipados com marcadores RAPD, os quais foram analisados quanto a sua segregação, possibilitando a construção do primeiro mapa genético no gênero *Passiflora*. Lopes (2003) utilizou 117 indivíduos da mesma população para construir mapas genéticos baseados, desta vez, em marcadores AFLP. Ambos os autores obtiveram mapas genéticos contendo nove grupos de ligação para cada genitor do cruzamento entre os acessos 'IAPAR-06' e 'IAPAR-123', utilizando a estratégia pseudocruzamento teste.

A possibilidade de construir um único mapa para o cruzamento, ao invés de dois mapas separados para os genitores do cruzamento, depende da disponibilidade de “marcadores ponte”, isto é, marcas comuns a ambos os genitores (Ritter et al., 1990). Maliepaard et al. (1997) comentam que, embora marcadores dominantes com segregação tipo 3:1 possam ser utilizados como “marcadores ponte”, estes fornecem pouca informação, fazendo com que a combinação dos mapas seja difícil. Apesar disso, Matta (2005) construiu um mapa de ligação utilizando marcas 3:1 para a integração dos mapas dos genitores, obtendo um único mapa para o cruzamento 'IAPAR-06' x 'IAPAR-123'. Apesar dos mapas terem sido integrados, foram obtidos apenas oito grupos de ligação, provavelmente, devido às estimativas de recombinação viesadas, fazendo com que marcas independentes fossem agrupadas no mesmo grupo de ligação, já que o número haplóide de cromossomos do maracujazeiro é $n=9$. Além disso, conforme verificado pelo autor, a ordenação das marcas ficou muito prejudicada. Maliepaard et al. (1997) comentam que marcadores multi-alélicos, como os RFLP ou microssatélites, são mais indicados para a integração dos mapas.

De acordo com Maliepaard et al. (1997), ao considerar a utilização de marcas 3:1 juntamente com marcas 1:1 em um duplo pseudocruzamento teste, algumas considerações devem ser feitas. Existem três possíveis configurações envolvendo os possíveis pares entre esses marcadores (entenda-se a , b e 0 , como alelos de um loco para um marcador):

- Tipo “1”: loco 1 (ab x aa) X loco 2 (ab x aa), ou seja, entre marcas informativas dentro do mesmo genitor;

- Tipo “4”: loco 1 ($ab \times aa$) X loco 2 ($a0 \times a0$), ou seja, marcador informativo para um dado genitor e um marcador bi-parental, o qual é um loco heterozigótico em ambos genitores;
- Tipo “14”: loco 1 ($a0 \times a0$) X loco 2 ($a0 \times a0$), ou seja, configuração envolvendo dois locos bi-parentais.

Há uma grande diferença entre estas configurações quanto ao poder de detecção de ligação. Esta diferença está relacionada à quantidade de informação presente. Para o “tipo 1”, a detecção de ligação é realizada sem reservas, mesmo com frequência de recombinação superior a 0,30, com uma população de 100 indivíduos. Neste caso, está sendo utilizada a estratégia pseudocruzamento teste propriamente dita, onde os marcadores dominantes são tão informativos quanto os codominantes, pois permitem identificar ambas as classes genotípicas (homozigota e heterozigota) que ocorrem na progênie segregante (Hemmat et al., 1994; Crouzillat et al., 1996). A detecção de ligação para o “tipo 14”, com frequências de recombinação superiores a 0,20 é realizada sem problemas somente para os locos que estiverem em associação nos dois genitores (*associação x associação*).

Considerando a configuração “tipo 4”, com uma população de 100 indivíduos, há a necessidade da frequência de recombinação ser inferior a 0,10 para se conseguir, com mais de 90% de probabilidade, detectar significância para essa ligação, sendo que o poder de detecção decresce rapidamente com o aumento da frequência de recombinação. Esse poder de detecção é menor para a configuração “tipo 14” quando os locos estiverem em repulsão nos dois genitores (*repulsão x repulsão*), ficando ainda mais prejudicado quando os locos estiverem em associação em um dos genitores e no outro em repulsão, ou seja, (*associação x repulsão*) ou (*repulsão x associação*).

Como não existe informação para estudar a ligação entre locos $ab \times aa$ (loco informativo em um genitor) e $aa \times ab$ (loco informativo para o outro genitor), a informação contida nos locos obtidos do cruzamento entre $a0 \times a0$, ou seja, locos bi-parentais, deve ser utilizada para se realizar a integração dos dois mapas, gerados no pseudocruzamento teste. Entretanto a ligação somente será detectada caso o loco bi-parental estiver fortemente ligado aos locos oriundos tanto do cruzamento $ab \times aa$, quanto os do $aa \times ab$. Em simulações, considerando que as configurações do “tipo 14” podem envolver locos em (*repulsão x repulsão*), (*associação x repulsão*) ou (*repulsão x associação*), a detecção de ligação entre os locos, visando a integração dos mapas,

somente foi obtida para frequências de recombinação iguais a zero, devido ao problema da baixa probabilidade de se encontrar recombinantes visíveis nestas configurações. Dessa forma, a utilização desses marcadores causa imprecisão na estimação das frequências de recombinação (Maliépaard et al., 1997).

Um aspecto que, portanto, deve ser abordado é a acurácia dessas estimativas de ligação. Embora se detecte ligação significativa para um determinado par de marcas, isso não implica que a estimativa da frequência de recombinação seja acurada. Nos processos de mapeamento não há somente a preocupação de se detectar ligação entre os marcadores, mas também estimativas acuradas são necessárias para se determinar a ordem e a distância entre as marcas. Embora os marcadores $aO \times aO$ possam ser utilizados para combinar os marcadores $ab \times aa$ com os $aa \times ab$, seu uso para estabelecer a correta ordem entre esses dois grupos será muito limitado considerando-se pequenas populações (menos de 100 indivíduos).

Um fator de complicação das análises de ligação para a estratégia pseudocruzamento teste é que, na maioria das vezes, a fase de ligação não é conhecida *à priori*, enquanto o conhecimento da fase é requerido para a detecção dos eventos de recombinação. Fase de ligação diz respeito a configuração dos alelos de um par de locos em heterozigose nos cromossomos homólogos de um indivíduo. Quando a fase de ligação não pode ser inferida com base nos avós, o procedimento aplicado é estimar as frequências de recombinação para as fases de repulsão e de associação e escolher aquela em que a estimativa da frequência de recombinação seja menor que 0,5, levando em consideração a significância do LOD score utilizado nas análises (Maliépaard et al., 1997).

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

Após a genotipagem da população de mapeamento, os marcadores que possuem segregação Mendeliana são analisados quanto à ligação. Para a construção dos grupos de ligação, em geral, são considerados dois marcadores de cada vez. São efetuados cálculos estatísticos para a detecção de recombinação entre esses marcadores, tomando-se por base a sua segregação genotípica. Teoricamente, marcadores com frequência de recombinação inferior a 0,50 estão em um mesmo cromossomo e, portanto, no mesmo grupo de ligação. A base biológica para a análise

de ligação é a recombinação homóloga entre cromátides não irmãs durante a meiose. Com uma boa cobertura do genoma, espera-se que o número de grupos de ligação seja equivalente ao número de cromossomos do complemento haplóide da espécie, ou genoma.

A ordem dos marcadores deve ser determinada dentro de cada grupo com a respectiva distância entre eles. Idealmente, deveriam ser avaliadas e comparadas todas as possíveis ordens de n locos para que a mais provável ordem fosse encontrada. No entanto, como o número de locos geralmente é grande, isto se torna impraticável, uma vez que para n locos são possíveis $n!/2$ ordens (Liu, 1998). Por exemplo, com 10 marcadores são possíveis 1.814.400 ordens. Diante disso, foram desenvolvidos métodos para que a ordem mais provável possa ser obtida sem que seja necessária a avaliação de todas as possíveis ordens. Alguns desses métodos são o “anelamento simulado” (Kirkpatrick et al., 1983), “seriação” (Buetow & Chakravarti, 1987), “ramos e conexões” (Thompson, 1987), entre outros.

Um outro aspecto a ser considerado na construção de mapas genéticos é a escala em que ele é representado. A frequência de recombinação apresenta o inconveniente de não ser aditiva. Assim, considerando-se a ordem de três locos quaisquer como A_B_C, não é possível obter-se a distância entre A_C simplesmente pela soma das distâncias entre A_B e B_C. As funções de mapeamento fazem a transformação da fração de recombinação em distâncias de mapa, geralmente em centiMorgans (cM), que são medidas aditivas. Diversas funções de mapeamento foram desenvolvidas, sendo as mais utilizadas a de Kosambi (1944) e a de Haldane (1919). Essas duas funções distinguem-se pelo fato de que a teoria de Kosambi admite a possibilidade de interferência na ocorrência de recombinação entre regiões próximas, enquanto que a de Haldane não pressupõe tal interferência.

O último passo é a estimação da fração de recombinação entre locos adjacentes utilizando informações de todos os locos ordenados no grupo de ligação. Esta estimação, chamada de estimação multiponto, fornece uma melhor precisão nas estimativas das distâncias visto que utiliza um maior número de informações.

O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares, os quais, por sua vez, se prestam à localização de genes que controlam características de importância econômica (Carneiro & Vieira, 2002).

2.1.5 Mapeamento de QTL

A grande maioria das características herdáveis de importância econômica são poligênicas, quantitativas ou complexas. Os fenótipos resultantes apresentam uma variação contínua na população em vez de classes discretas. Esse tipo de herança é determinado pela segregação de vários locos, cada um com um pequeno efeito no fenótipo e sofrendo uma grande influência ambiental (Tanksley, 1993).

Os estudos teóricos envolvendo tal tipo de herança começaram por volta de 1920 com os trabalhos de Fisher (1918), Haldane (1937) e Wright (1921), fundando a ciência da genética quantitativa (Falconer & Mackay, 1996; Lynch & Walsh, 1998). Dada a natureza da variação dos caracteres quantitativos, o seu estudo começa pela distribuição de frequências, quando observado um certo número de indivíduos. Tal distribuição é caracterizada por certos parâmetros estatísticos, dos quais a média e a variância são os mais importantes, e aos quais se podem acrescentar covariâncias e correlações (Coelho & Silva, 2002).

Falconer & Mackay (1996) comentam que os métodos clássicos da genética quantitativa consideram somente os efeitos agregados de todos os genes causando a variação no caráter quantitativo, e que uma completa descrição necessita levar em consideração as propriedades dos genes individualmente – suas frequências e a magnitude de seus efeitos. Recentemente, métodos têm sido desenvolvidos para o estudo dos locos individuais controlando um caráter quantitativo. Estes locos são conhecidos como QTL, do inglês, *Quantitative Trait Loci*, ou seja, locos controladores de característica quantitativa, muito embora, como citam os mesmos autores, um QTL é um segmento de cromossomo que afeta um determinado caráter, não sendo necessariamente um único gene.

Somente pela análise da segregação conjunta de genótipos marcadores e valores fenotípicos de indivíduos ou linhagens é possível detectar e mapear QTL. A idéia de se utilizar um marcador genético para se localizar um loco que participa do controle da expressão de um caráter quantitativo não é nova. Trabalhos pioneiros nesse sentido foram realizados, por exemplo, por Sax (1923) e Thoday (1961). Porém, só recentemente é que a disponibilidade de marcadores de DNA e poderosos métodos biométricos fizeram com que o mapeamento de QTL tivesse um enorme progresso (Asins, 2002).

A análise de QTL corresponde à procura de associações entre o carácter quantitativo e os alelos dos marcadores segregando na população. De modo análogo às metodologias clássicas de mapeamento genético, o princípio básico que fundamenta as análises de mapeamento de QTL é a existência de desequilíbrio gamético de ligação decorrente da redução da frequência de recombinação entre genes situados em regiões próximas entre si ao longo de determinado cromossomo (Coelho, 2000). Sem esse pré-requisito, os alelos dos locos marcadores e dos QTL ocorrerão em combinações equivalentes à distribuição independente, fazendo com que os QTL não sejam detectados. Este desequilíbrio gera efeitos quantitativos associados ao marcador, que podem ser detectados e estimados por meio de análises estatísticas adequadas.

A exemplo dos experimentos visando à construção de mapas de ligação, grande parte das análises de QTL em plantas envolve o uso de populações derivadas de linhagens homozigóticas (Kearsey & Farquhar, 1998). Estas linhagens, geneticamente diferentes para os caracteres quantitativos de interesse, são cruzadas para a produção da geração F_1 , a qual pode ser retrocruzada com um ou ambos os pais, gerando populações de retrocruzamento, ou pode ser autofecundada para produzir populações F_2 . Também, a partir da F_1 , podem ser produzidas populações de linhagens puras recombinantes, por autofecundações sucessivas das plantas F_2 , ou ainda, para as espécies que permitem esta abordagem, a produção de linhagens de duplo-haplóides. Segundo Lynch & Walsh (1998), populações obtidas de linhagens homozigóticas são ideais para a detecção e o mapeamento de QTL, pois todas as plantas F_1 são geneticamente idênticas e mostram um completo desequilíbrio de ligação para os locos contrastantes nas linhagens.

Populações oriundas do cruzamento de indivíduos altamente heterozigóticos podem também ser utilizadas para a análise de QTL, a exemplo do que vem sendo feito em várias espécies florestais (Grattapaglia et al., 1995; Verhaegen et al., 1997; Marques et al., 1998; Kaya et al., 1999; Sewell et al., 2000; Sewell et al., 2002) e frutíferas (Conner et al., 1998; Garcia et al., 2000; Wang et al., 2000).

Grattapaglia et al. (1995) estenderam a utilização da abordagem de mapeamento “pseudocruzamento teste” para a análise de QTL em *Eucalyptus*, identificando várias regiões associadas à propagação vegetativa em um cruzamento interespecífico. Os autores comentam que o mapeamento de QTL utilizando esta abordagem se baseia no desequilíbrio de ligação que

permanece na população de irmãos completos para estabelecer as associações entre marcas e características.

Para as análises de QTL vale ressaltar que o delineamento genético utilizando dois genitores heterozigóticos possui duas limitações. Primeiro, os únicos QTL que podem ser potencialmente detectados são aqueles que, por acaso, encontram-se em heterozigose nos genitores do cruzamento e quando o efeito diferencial entre alelos alternativos aos QTL seja relativamente grande para permitir detecção estatística com o tamanho amostral da progênie disponível. Em segundo lugar, devido à possível heterozigosidade dos locos QTL em ambos os genitores, e o fato do polimorfismo molecular ser de dose única e herança dominante, nenhuma interação intraloco específica pode ser levada em consideração e nenhuma classificação (*ranking*) de alelos por magnitude de efeito de substituição pode ser realizada (Grattapaglia, 2001).

Apesar dessas limitações, o mapeamento de QTL utilizando a abordagem do “pseudocruzamento teste” tem sido utilizado em várias espécies, dada a impossibilidade ou a grande dificuldade em se produzir outros tipos de populações nessas espécies, e pelo fato de se constituir em um método rápido e satisfatório na obtenção de informações sobre características quantitativas. Estudos nesse sentido têm sido conduzidos em *Eucalyptus* (Grattapaglia et al., 1995; Verhaegen et al., 1997), *Pinus* (Lerceteau et al., 2000; Plomion et al., 1996), *Fagus sylvatica* L. (Scalfi et al., 2004), *Prunus cerasus* L. (Wang et al. 2000), *Citrus* (Garcia et al., 2000) e em *Passiflora* (Lopes, 2003), neste último caso visando mapear locos que controlam a resistência à *Xanthomonas axonopodis*.

Em qualquer delineamento experimental o poder de detecção de um QTL será tanto maior quanto maior for o número de marcadores disponíveis e de indivíduos genotipados e avaliados para os caracteres quantitativos (Lander & Botstein, 1989). Estudos teóricos iniciais sugeriam que uma população muito grande (acima de 1000 plantas) seria necessária para identificar associações entre marcadores e caracteres quantitativos (Soller & Brody, 1976). Entretanto, resultados de experimentos posteriores mostraram que a detecção de QTL nessas populações poderia ser acompanhada com progênies com um número menor de plantas (Edwards et al., 1987; Stuber et al., 1987). Devido à grande quantidade de trabalho e recursos financeiros envolvidos nas avaliações fenotípica e genotípica de grandes populações, o número de plantas avaliadas varia entre 100 e 300 na maioria dos trabalhos publicados envolvendo o mapeamento de QTL. Mas é certo que a amostra da população deve ter o maior tamanho possível dentro da

capacidade de trabalho da equipe envolvida. As amostras com menos de 50 indivíduos muito provavelmente terão uma baixa resolução de mapeamento (Young, 1994).

Além do tamanho da população e o número de marcadores disponíveis, outros fatores são importantes no poder de detecção de um QTL, como a magnitude de seu efeito sobre a característica, a frequência de recombinação entre o marcador e o QTL, bem como da herdabilidade da característica. Evidentemente quanto maior o efeito, o tamanho da população e a herdabilidade, e mais próximo o marcador do QTL, mais fácil será a detecção (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

De acordo com Lynch & Walsh (1998), a possível associação entre o marcador e o QTL pode ser avaliada utilizando-se um, dois ou mais marcadores simultaneamente. O método de análise no qual um só marcador é utilizado consiste na comparação estatística do valor médio do caráter para as distintas classes genóticas do marcador. Um resultado significativo denotaria a existência de ligação entre o marcador e um QTL do caráter em questão, embora os efeitos do QTL e sua distância do marcador não possam ser estimados com precisão nesse caso. Assim, cada teste de associação caráter-marcador é realizado independente da informação dos outros locos marcadores. Para um cromossomo com n marcas, n testes são realizados.

A análise de marcas simples, como é chamada a análise envolvendo um marcador por vez, pode ser realizada por meio do teste t , regressão linear simples e da análise de variância. Estes procedimentos têm em comum o fato de testarem a hipótese nula de que a média do caráter em questão é independente do genótipo do marcador. A rejeição desta hipótese leva a crer a possibilidade de pelo menos um QTL ligado à marca. Esta característica da análise de marcas simples faz com que haja um confundimento entre o efeito e a posição do QTL. Como comentam Lynch & Walsh (1998), não é possível a distinção entre um QTL de pequeno efeito, situado muito próximo ao marcador, de um QTL que apresenta grande efeito, mas situado mais distante do marcador. Isto limita a técnica mais à detecção do que ao mapeamento de QTL, pois, por mapeamento de QTL, entende-se a estimação de seus efeitos e posição no genoma. Contudo, a análise de marcas simples é muito utilizada, principalmente como um passo preliminar para a utilização de técnicas mais complexas, mediante de uma varredura de todas as marcas existentes no genoma e eliminação daquelas chamadas não informativas, o que certamente contribui em muito para o aumento da eficiência e, muitas vezes, para a exequibilidade das técnicas mais

rebuscadas, como, por exemplo, o mapeamento por intervalo composto e múltiplo (Coelho & Silva, 2002).

Weller (1986) apresentou um modelo de máxima verossimilhança para a análise de marcas simples, sendo que uma das suas grandes vantagens, em relação aos métodos anteriormente apresentados, é estimar a posição do QTL, separando a frequência de recombinação dos efeitos do possível QTL. No entanto, o método da máxima verossimilhança é mais utilizado em procedimentos nos quais se conhece a ordem linear das marcas em grupos de ligação, como os métodos por intervalo.

Lander & Botstein (1989) propuseram um método de mapeamento utilizando o princípio da máxima verossimilhança para verificar a possível presença de um QTL na região entre um par de marcas adjacentes em um grupo de ligação. Assim, em um intervalo, várias posições são testadas para a presença de um QTL. Os resultados dos testes são expressos em LOD scores, os quais comparam a função de verossimilhança da hipótese de nulidade (ausência de QTL) com a hipótese alternativa (QTL na posição sendo testada). Esta metodologia, denominada de mapeamento por intervalo (*Interval Mapping, IM*), possui maior poder de detecção e maior precisão na estimativa dos parâmetros associados ao QTL do que a análise de marcas individuais. Suas vantagens, frente à análise de marcas simples, são mais pronunciadas quando se dispõe de marcadores espaçados de 20 a 35 cM (Tanksley, 1993). Condição em que é provável a ocorrência de recombinação entre o loco marcador e o QTL, sendo este efeito compensado na análise por intervalo. No entanto, ressalta o autor que em intervalos inferiores a 20 cM, as estimativas feitas por intervalo são semelhantes às de marcas individuais, e também que, com distâncias superiores a 35 cM, mesmo a análise por intervalo é imprecisa na detecção de um QTL.

O modelo matemático de Lander & Botstein (1989), considerando a geração de retrocruzamento, é dado pela eq. (1):

$$y_j = \mu + b^* x_j^* + e_j, \quad (1)$$

em que y_j é o valor fenotípico para o indivíduo j ; μ é a média do modelo; b^* é o efeito do possível QTL; x_j^* é o genótipo do QTL, inferido indiretamente a partir dos marcadores que flanqueiam o intervalo; e_j é o resíduo do modelo tal que $e_j \cap N(0, \sigma^2)$.

Uma vez que x_j^* não é observável diretamente, caracteriza-se a situação em que o modelo é estatisticamente denominado de misturas. Com base em probabilidades condicionais, cada posição do genoma entre duas marcas é percorrida de forma sistemática, obtendo-se estimativas de máxima verossimilhança para o efeito e a posição dos QTL, separadamente.

Várias são as vantagens oferecidas pelo mapeamento por intervalo em relação à análise de marcas simples. Com seu emprego, é possível inferir a provável posição dos QTL ao longo do genoma. Além disso, não há confundimento entre efeito e posição dos QTL, o que implica em maior poder dos testes estatísticos (Zeng, 2001). Porém, o IM não permite eliminar de forma satisfatória o surgimento dos chamados “QTL fantasmas” (Doerge et al., 1997; Lynch & Walsh, 1998). Estes QTL surgem quando um QTL está localizado em intervalos adjacentes ao intervalo que está sendo mapeado, fazendo com que os testes de hipótese apresentem falsos positivos. Isso ocorre porque os métodos de IM não consideram todos os marcadores simultaneamente, usando apenas dois deles ao mesmo tempo (marcas flangeadoras), sendo difícil diferenciar entre o efeito de um QTL verdadeiro e o efeito dos QTL fantasmas (Martinez & Curnow, 1992). O fato do método de Lander & Botstein (1989) utilizar a informação de apenas dois marcadores de cada vez, faz com que a informação adicional fornecida pelos demais marcadores do genoma seja desprezada, o que não é desejável.

Visando corrigir os problemas do IM, Zeng (1993, 1994) apresentou um modelo para o mapeamento de QTL que considera simultaneamente a procura por QTL num dado intervalo com o efeito de marcadores fora desse intervalo, aumentando sensivelmente o poder do teste e eliminando os QTL fantasmas. Tal método, denominado Mapeamento por Intervalo Composto (*Composite Interval Mapping, CIM*), combina o modelo de IM de Lander & Botstein (1989) com um modelo de regressão múltipla, para controlar a variação fora do intervalo sendo mapeado. Em trabalhos independentes e com enfoque semelhante, Jansen (1993) e Jansen & Stam (1994) também apresentaram um modelo para tanto, denominado método de MQM (*Multiple QTL Models*). Outros trabalhos estenderam o conceito de mapear um QTL de cada vez para modelos de múltiplos QTL, sob vários enfoques (Knapp, 1991; Haley & Knott, 1992; Martinez & Curnow, 1992, 1994; Jansen, 1996; Satagopan et al., 1996; Kearsey & Hyne, 1994; Wu & Li, 1994; Whittaker et al., 1996).

O modelo do CIM (Zeng, 1993, 1994), considerando um retrocruzamento, é dado pela eq. (2):

$$y_j = \mu + b^* x_j^* + \sum_k b_k x_{jk} + e_j, \quad (2)$$

em que y_j é o valor fenotípico para o indivíduo j ; μ é a média do modelo; b^* é o efeito do possível QTL; x_j^* é o genótipo do QTL, inferido indiretamente a partir dos marcadores que flanqueiam o intervalo; $\sum_k b_k x_{jk}$ indicam marcadores fora do intervalo sendo mapeado (cofatores), selecionados para controlar a variação residual; e_j é o resíduo do modelo, tal que $e_j \cap N(0, \sigma^2)$.

Nota-se que, nesse modelo, o efeito dos QTL fora do intervalo sendo mapeado é removido do resíduo. Os cofatores normalmente são selecionados via regressão múltipla do fenótipo sobre o genótipo dos marcadores (Zeng, 1993; 1994). Em função das propriedades da regressão linear múltipla, essa abordagem permite criar um intervalo para mapeamento que depende apenas dos QTL nele presentes, resultando em grande aumento do poder do teste e sensível diminuição dos QTL fantasmas, que surgirão na análise se houver a presença de QTL nos intervalos imediatamente adjacentes ao intervalo sendo estudado, ou seja, fortemente ligados ao QTL do intervalo (Zeng, 1994). Os parâmetros do modelo de misturas são estimados pelo método da máxima verossimilhança, via algoritmo EM, e os testes de hipóteses são feitos a partir da estatística razão de verossimilhança.

Uma metodologia com enfoque multivariado, que estende o CIM para análise de mais de uma característica simultaneamente, foi apresentada por Jiang & Zeng (1995). Essa expansão, com maior poder para mapeamento, além de permitir testes formais mais precisos da interação, possibilita também estudar a correlação entre caracteres, incluindo testes para determinar as causas da correlação (pleiotropia ou ligação).

Kao et al. (1999) propuseram um modelo mais complexo que considera múltiplos intervalos simultaneamente, sendo por isso denominado de mapeamento de múltiplos intervalos (*Multiple Interval Mapping*, MIM). O avanço desta metodologia está na incorporação da estimativa da epistasia no modelo. O MIM apresenta como vantagens a maior eficiência e precisão na identificação de QTL, identificação e entendimento dos padrões epistáticos,

possibilitando agregar os efeitos epistáticos ao ganho genético por meio da seleção assistida por marcadores.

2.1.6 Importância do mapeamento de QTL

A genética quantitativa, que fornece as bases teóricas do melhoramento genético, permite a estimação de diversos parâmetros genéticos importantes, a partir de medidas fenotípicas que refletem a expressão simultânea dos genes que controlam o caráter. Porém, a partir das informações fornecidas pelos marcadores moleculares, é possível mapear individualmente os locos que controlam o caráter quantitativo (QTL), o que é fundamental para o melhor entendimento da arquitetura genética desses caracteres.

Atualmente, com a grande disponibilidade de informação molecular disponível, é fácil constatar que os diferentes poligenes apresentam uma magnitude de efeitos desiguais para a maioria dos caracteres. A proporção cumulativa explicada pelos vários QTL detectados experimentalmente tem variado de 30 até 70%, dependendo de uma série de fatores, tais como o cruzamento analisado, a característica avaliada, o delineamento experimental e a resolução do mapa em termos de número de marcadores. Os valores observados do coeficiente de determinação (R^2) para QTL individuais sugerem que os caracteres quantitativos são controlados por poucos locos com grande efeito e por muitos locos de pequeno efeito (Bernardo, 2002).

O mapeamento de QTL tem várias aplicações. No melhoramento, é comum a ocorrência de correlações genéticas entre caracteres, fazendo com que a seleção dos mesmos não ocorra de forma independente. As causas da correlação são atribuídas à pleiotropia e/ou ligação genética (Falconer & Mackay, 1996) sendo que, com o uso dos métodos tradicionais de análise, é possível apenas estimar a magnitude dessa correlação para todos os locos simultaneamente. Uma vez mapeados os QTL, é possível verificar quais QTL estão ligados e quais possuem efeito pleiotrópico, permitindo que os programas de melhoramento sejam delineados para contornar os problemas causados pela correlação, com o melhorista trabalhando diretamente com as informações sobre os QTL.

Outra aplicação relaciona-se a um melhor entendimento da interação genótipos versus ambientes. Com os QTL mapeados, é possível determinar as causas dessa interação, verificando

individualmente quais QTL são mais estáveis (ou instáveis), e quais ambientes são mais favoráveis à seleção. De posse dessas informações, além de haver um melhor entendimento da interação, é possível construir métodos de seleção que explorem o genótipo dos QTL, pois atualmente a seleção é baseada apenas em medidas fenotípicas.

Embora a seleção assistida por marcadores seja possível sem o mapeamento de QTL, este pode ser útil no direcionamento de cruzamentos específicos, maximizando tanto o número de QTL com alelos favoráveis, como o valor genotípico global, incluindo aí efeitos epistáticos (Bearzoti, 2000).

Recentemente, surgiram na literatura exemplos de sucesso da abordagem de clonagem de QTL. São descritos oito trabalhos em plantas em que os QTL foram mapeados, tiveram seus alelos identificados, clonados e transferidos entre indivíduos com uso de técnicas moleculares (Morgante & Salamini, 2003). É evidente que este tipo de pesquisa tem um grande potencial de aplicação, tanto em estudos básicos como em programas de melhoramento. Em todos esses casos, foi necessária a construção de mapas genéticos e a realização do mapeamento dos QTL em populações segregantes, antes da clonagem propriamente dita.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Material vegetal e preparo do experimento de campo

A população aqui avaliada foi proveniente de um cruzamento controlado, feito por Carneiro (2001), entre duas plantas de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Estas plantas pertencem a dois acessos do Lote de Introdução e Seleção de Materiais do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Londrina - PR. O acesso IAPAR-123, cuja planta foi utilizada como genitor feminino, é proveniente da seleção “Maguary” e apresenta excelentes características agronômicas, principalmente aquelas voltadas ao processamento industrial (teor de sólidos solúveis totais, acidez e rendimento de suco), além de boa produtividade e plantas vigorosas (Melletti, 2003). O acesso IAPAR-06 (genitor masculino) é uma introdução do Marrocos e apresenta características agronômicas inferiores às do outro acesso.

Os indivíduos resultantes deste cruzamento foram mantidos em casa de vegetação em sacos plásticos com dimensões de 13,5 x 11,0 cm, contendo substrato PLANTMAX[®] e terra peneirada na proporção de 1:1. Dessas plantas foram retiradas estacas, as quais foram transferidas para copos plásticos de 200 mL contendo somente substrato PLANTMAX[®], para o desenvolvimento das raízes. O estaqueamento foi realizado no período de 01/12 a 12/12/2001, sendo colocadas quatro estacas por copo. As estacas enraizadas foram então transferidas para sacos plásticos de 8,5 x 6,0 cm para a formação das mudas, no período de 15/01 a 30/01/2002. As mudas foram mantidas em telado com irrigação diária para o seu completo desenvolvimento. Nesse período, foram feitas aplicações de defensivos para controle de ácaros (Vertimec 18 C – Syngenta) na dosagem de seis mL/litro, e ainda, a adubação semanal das mudas com 40 mL por planta do adubo químico Ouro Verde[®] (Empresa Paulista de Produtos Químicos), composição 15-15-20, com macronutrientes secundários e micronutrientes, na dosagem de 3,5g/litro.

Figura 2 - A) Matrizes da população segregante; B) Estacas em copo plástico contendo substrato; C) Visão geral do desenvolvimento das estacas; D) Mudas em desenvolvimento na casa de vegetação

Os genótipos que apresentavam número suficiente de clones para irem ao campo, com mais algumas plantas reservas foram selecionados. Um total de 100 genótipos, incluindo um dos genitores (IAPAR-06), representados por nove repetições cada, foram levados ao campo experimental do Departamento de Genética da ESALQ/USP no município de Anhumas – SP, onde foram plantados na primeira quinzena de maio de 2002.

O plantio foi feito em terreno previamente corrigido com calcário dolomítico, baseando-se na análise prévia de solo, na dosagem de 2 t ha^{-1} , incorporado ao solo 45 dias antes do plantio. Trinta dias antes do plantio foi aplicado um composto orgânico fornecido pela empresa Vega Engenharia Ambiental S.A., na dosagem de 40 L/cova. Por ocasião do plantio, foram aplicados, aproximadamente 200 g de P_2O_5 por cova, utilizando como fonte superfosfato simples. A adubação de formação foi realizada a cada 30 dias depois do plantio, utilizando-se uréia como fonte de nitrogênio e KCl como fonte de potássio, seguindo recomendações de Piza Jr. et al.

(1996). De acordo com a análise inicial do solo, foram feitas também as adubações de produção, de forma parcelada, utilizando as mesmas fontes de fertilizantes da adubação de formação.

A cultura foi conduzida no sistema de espaldeiras verticais com o fio de arame a 1,90 m de altura do solo. O espaçamento entre linhas foi de 3,10 m e, entre plantas na mesma linha foi de 5 m. Os tratos culturais aplicados foram aqueles normalmente recomendados para a cultura, com a poda periódica para individualização das plantas e a aplicação de defensivos. Com relação à aplicação de defensivos, regularmente, foram aplicados produtos à base de cobre (oxicloreto de cobre) para controle preventivo de doenças da parte aérea e, quando havia necessidade, foi feita a aplicação de inseticidas (Fenthion – Lebaycid 500) para o controle de lagartas desfolhadoras. A cultura recebeu irrigações complementares por meio de aspersão.

2.2.2 Delineamento experimental e características avaliadas

O delineamento utilizado foi o látice quadrado incompleto com três repetições. A parcela experimental foi constituída por três plantas (clones) que foram dispostas nas linhas totalizando um espaçamento de 15 m lineares para cada parcela. Como bordadura, circundando todo o experimento, foram plantadas mudas da variedade Sul Brasil. A área total do experimento foi de 16.709 m².

As seguintes características foram avaliadas:

1. Velocidade de crescimento (VC), dada pela diferença de altura das mudas no campo entre duas medições consecutivas. Foram feitas três medições da altura em cada planta, nos dias 29/05, 04/07 e 25/07/2002, ou seja, aos 25, 61 e 82 dias após o plantio, respectivamente, resultando em 2 diferenças entre medições. Os dados foram computados pela média das parcelas como velocidade de crescimento, dado em cm;
2. Produção total (PT), dada em kg/genótipo;
3. Número total de frutos (NF) por genótipo;

Para as características PT e NF, foi computada, no final da safra, a soma dos pesos e do número de frutos, por parcela, das colheitas realizadas semanalmente. Posteriormente, os dados foram divididos pelo número de plantas da parcela para se obter o total por genótipo.

4. Peso médio de frutos (PM), em gramas;

5. Comprimento médio de frutos (CM), em cm;
6. Largura média de frutos (LM), em cm;
7. Formato de frutos (FM), dado pelo quociente $\frac{CM}{LM}$;
8. Porcentagem média de polpa (PP), dada pela fórmula: $\frac{PM - PC}{PM} \times 100$, onde PC se refere ao peso da casca;
9. Teor médio de sólidos solúveis (SS), dado em °Brix, aferido em refratômetro manual.

Para os caracteres PM, CM, LM, FM, PP e SS foram feitas duas avaliações em uma amostra de frutos por parcela (aproximadamente 10 frutos/parcela). Uma avaliação foi realizada no começo da safra (fevereiro) e outra mais ao final (maio). Para a realização das análises, foram utilizadas as médias das amostras em cada parcela em cada época.

Os dados experimentais referem-se à primeira safra de produção da cultura que se estendeu de janeiro até julho de 2003.

Não foi possível coletar dados da segunda safra de produção devido a uma grande mortalidade das plantas que ocorreu no final de 2003, em decorrência, possivelmente, de uma poda muito drástica.

Figura 3 – Visão geral do campo experimental de maracujazeiro, localizado na Fazenda Experimental de Anhembi, do Departamento de Genética da ESALQ/USP, onde foram tomados os dados fenotípicos

2.2.3 Análises estatísticas dos dados fenotípicos

As análises de variância de cada característica foram feitas com o auxílio do programa computacional SAS[®] (*Statistical Analysis System*), utilizando o procedimento GLM – *General Linear Models*, e considerando os efeitos aleatórios, de acordo com o seguinte modelo matemático para as características VC, PT e NF:

$$Y_{ijk} = \mu + t_i + r_j + b_{k(j)} + e_{ijk} \quad (3)$$

em que Y_{ijk} refere-se à observação do genótipo i , no bloco k da repetição j ; μ é uma constante comum a todas as observações; t_i é o efeito do genótipo i ; r_j é o efeito da repetição j ; $b_{k(j)}$ é o efeito do bloco k dentro da repetição j e e_{ijk} é o erro associado a observação Y_{ijk} onde $e_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$.

Para os caracteres avaliados em duas épocas considerou-se um esquema em parcelas subdivididas, no qual os genótipos foram considerados como parcelas e as épocas como subparcelas. Foi realizada uma análise prévia para verificar comparativamente a eficiência da utilização do látice em relação a blocos casualizados. Entretanto, foi verificada uma eficiência muito baixa do controle intra-bloco para essas características, e optou-se por realizar esta análise segundo o modelo de parcelas subdivididas em blocos casualizados, ou seja:

$$Y_{ijk} = \mu + t_i + r_j + e_{ij} + s_k + ts_{ik} + e_{ijk} \quad (4)$$

em que Y_{ijk} refere-se à observação do genótipo i , na repetição j , na época k ; μ é uma constante comum a todas as observações; t_i é o efeito do genótipo i ; r_j é o efeito da repetição j ; e_{ij} é o erro entre parcelas (erro a); s_k é o efeito da época k ; ts_{ik} é o efeito da interação entre genótipo e época, e e_{ijk} é o erro entre subparcelas (erro b), sendo os componentes do modelo todos aleatórios.

A partir dos quadrados médios das análises de variância foram estimados os componentes de variância, com o auxílio do PROC GLM do SAS[®].

Foram realizadas análises prévias para verificar o comportamento dos dados quanto à obediência das premissas básicas do modelo matemático: a) os parâmetros do modelo estatístico devem ser aditivos; b) os erros experimentais devem ser independentes; c) os erros experimentais

devem ter uma variância comum; d) os erros experimentais devem ter distribuição normal (Eisenhart, 1947).

Quando uma dessas premissas não foi verificada, utilizou-se de procedimentos como a mudança de escala da medida por transformação adequada (Gomes, 2000; Steel et al., 1997) ou a exclusão de valores muito extremos (*outliers*).

Os coeficientes de herdabilidade no sentido amplo entre médias de genótipos foram calculados de acordo com as seguintes expressões:

$$h^2 = \frac{\hat{\sigma}_G^2}{\hat{\sigma}_G^2 + \frac{\hat{\sigma}^2}{R}} \quad \text{e} \quad (5)$$

$$h^2 = \frac{\hat{\sigma}_G^2}{\hat{\sigma}_G^2 + \frac{\hat{\sigma}_{GE}^2}{E} + \frac{\hat{\sigma}_{GR}^2}{R} + \frac{\hat{\sigma}^2}{RE}} \quad (6)$$

respectivamente, para as características avaliadas uma única vez no final da safra (VC, PT e NF) e em duas épocas (PM, CM, LM, FM, PP e SS), sendo que $\hat{\sigma}_G^2$, $\hat{\sigma}_{GE}^2$, $\hat{\sigma}_{GR}^2$ e $\hat{\sigma}^2$ referem-se às estimativas da variância genética, variância da interação entre genótipos e épocas, variância do erro entre parcelas (erro a) e a variância do erro entre subparcelas (erro b), respectivamente. O número de repetições é representado por R e o número de épocas por E.

O coeficiente de variação genética foi calculado pela fórmula:

$$CV_G = \frac{\hat{\sigma}_G}{\bar{X}} \cdot 100 \quad (7)$$

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

Os ganhos esperados, considerando uma intensidade de seleção de 20% dos melhores clones, foram calculados para todos os caracteres pela seguinte fórmula:

$$Gs = (\bar{Y}_{sel} - \bar{Y}_{ori}) \cdot \hat{h}_m^2, \quad (8)$$

em que $\bar{Y}_{sel}$ é a média dos 20 melhores clones da população; $\bar{Y}_{ori}$ é a média original e $\hat{h}_m^2$ é a herdabilidade entre médias.

Os intervalos de confiança para as estimativas das variâncias e da herdabilidade foram obtidos de acordo com os procedimentos relatados por Knapp et al. (1985) e Barbin (1993).

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

$$r_G = \frac{\hat{\text{cov}}_{G(x,y)}}{\hat{\sigma}_{G(x)} \cdot \hat{\sigma}_{G(y)}} : \text{ correlação genética entre os caracteres x e y} \quad (9)$$

$$r_F = \frac{\hat{\text{cov}}_{F(x,y)}}{\hat{\sigma}_{F(x)} \cdot \hat{\sigma}_{F(y)}} : \text{ correlação fenotípica entre os caracteres x e y} \quad (10)$$

2.2.4 Genotipagem molecular dos indivíduos F₁

Vale ressaltar que este trabalho representa uma continuação dos estudos realizados por Lopes (2003) que construiu mapas de ligação de maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores AFLP e fez o mapeamento de QRL para resposta à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, utilizando a mesma população segregante do presente estudo.

A população analisada por Lopes (2003) continha 117 indivíduos além dos dois genitores. No presente trabalho foram utilizados, para fins de mapeamento, novos indivíduos do mesmo cruzamento, de forma que a população passou a ser composta por 160 indivíduos. Assim foi necessária a realização de novas genotipagens, da mesma forma como procedeu Matta (2005).

2.2.4.1 Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA total de 45 indivíduos (43 indivíduos F₁ e os dois genitores) foi extraído utilizando o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Murray & Thompson

(1980), com modificações. Folhas jovens e frescas foram lavadas individualmente com água destilada, e secadas com papel absorvente, antes de iniciar o processo de extração.

Foram utilizados aproximadamente 250 mg de tecido fresco de cada planta. Após a maceração em nitrogênio líquido, o material foi colocado em tubos para centrifuga (Eppendorf®) de 2 mL, contendo 1 mL de tampão de extração CTAB previamente aquecido a 65°C. O material foi homogeneizado com auxílio de uma espátula e mantido a 65°C por 30 minutos, em banho-maria, com agitações brandas e periódicas. Os tubos foram retirados do banho-maria e foi acrescentada uma solução de 700 µL de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1).

Essa mistura foi homogeneizada por movimentos de inversões dos tubos e depois colocada em uma microcentrífuga Eppendorf® sob 14.000 rpm por 15 minutos. Foram recuperados 700 µL do sobrenadante, os quais foram transferidos para novos tubos de 2 mL. Para a precipitação do DNA, foram acrescentados 520 µL de isopropanol, invertendo-se cuidadosamente os tubos que depois foram mantidos por 30 minutos sob temperatura ambiente. O DNA precipitado foi recuperado por meio de centrifugação sob 1.000 rpm por 10 minutos. O isopropanol foi descartado e os resíduos removidos com o auxílio de uma espátula.

Foi adicionado aos tubos 1 mL de solução de lavagem (etanol 76% e acetato de amônio 10 mM), deixando o DNA em imersão por 30 minutos. A solução de lavagem foi descartada e os resíduos foram eliminados limpando-se a parte interna dos tubos com lenços de papel.

Foram acrescentados 100 µL de tampão TE (Tris-EDTA) aos tubos, os quais ficaram sob temperatura de aproximadamente 4°C por cerca de 2 horas, até a ressuspensão completa do DNA que foi novamente precipitado acrescentando-se 50 µL de acetato de amônio (7,5 M) e 375 µL de etanol absoluto. O conteúdo de cada tubo foi misturado por inversões suaves e o DNA precipitado foi recuperado por centrifugação sob 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e uma última lavagem foi realizada adicionando-se 500 µL de etanol 70%, onde o DNA foi mantido imerso por 20 minutos. O etanol foi descartado e os resíduos eliminados. Finalmente o DNA foi ressuspendido em 100 µL de tampão TE.

A quantificação foi realizada após eletroforese (3 Volts/cm) de alíquotas de cada amostra, comparando-as com uma série de concentrações conhecidas de DNA do fago Lambda (Invitrogen – BRL). A eletroforese foi realizada em géis de agarose a 1% (p/v).

A concentração de DNA foi estimada a partir da comparação visual das intensidades das bandas, reveladas pela coloração com brometo de etídeo (1,0 µg/mL). A fluorescência é

proporcional à concentração de DNA. Com base nas concentrações de cada amostra, estas foram posteriormente diluídas para conter 15 ng de DNA/ μ L de TE.

2.2.4.2 Procedimentos técnicos para a detecção dos locos AFLP

O protocolo utilizado para detecção dos locos AFLP está proposto no *site* <http://www.msu.edu/user/hazensam/aflp/AFLPprotocolMSU.html>, e foi adaptado por Lopes (2003); o protocolo utilizado para revelação dos géis foi proposto por Creste et al. (2001). A seguir, serão descritas todas as etapas para a genotipagem dos 45 indivíduos adicionais da população segregante.

Digestão do DNA genômico

O DNA genômico foi digerido através de uma combinação de duas enzimas, sendo uma de corte freqüente (*MseI*) e uma de corte raro (*EcoRI* ou *PstI*). As duas combinações de enzimas aqui utilizadas foram: *EcoRI* / *MseI* e *PstI* / *MseI*.

Considerando, por exemplo, a combinação *MseI* com *EcoRI*, para cada reação foram utilizados 250 ng de DNA genômico; 5,0 μ L de tampão “One Phor All” 10X (OPA; Amersham); 0,5 μ L de solução de albumina de soro bovino (BSA) (10 μ g/ μ L); 1,25 μ L da enzima *MseI* (4 unidades/ μ L; New England Biolabs) e 0,5 μ L da enzima *EcoRI* (10 unidades/ μ L; Invitrogen). O volume foi completado para 50 μ L com água ultrapura autoclavada. As reações de restrição foram realizadas sob 37°C durante 3 horas, sendo cuidadosamente agitadas a intervalos de uma hora. Após a digestão, as reações foram submetidas a um tratamento térmico por 15 minutos a 70°C para inativar as enzimas de restrição.

Para verificar a eficiência da digestão, 10 μ L da reação de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% por 3 horas em tampão TEB 1X (tris 0,09 M, ácido bórico 0,09 M, EDTA 2 mM). Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídeo (1 μ g/mL) durante 15 minutos e, posteriormente, fotografados sob luz UV.

Preparo e ligação dos adaptadores

Os adaptadores foram preparados em quantidades suficientes para 120 amostras: adaptador *EcoRI* – foram misturados 3,4 μL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *EcoRI*-oligo 1 (5' CTC GTA GAC TGC GTA CC 3') e 3,0 μL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *EcoRI*-oligo 2 (5' AAT TGG TAC GCA GTC TAC 3'), 6 μL de tampão de PCR OPA 10X ("One Phor All"; Amersham) e 107,6 μL de água ultrapura autoclavada;

adaptador *MseI* – foram misturados 32 μL (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *MseI*-oligo 1 (5' GAC GAT GAG TCC TGA G 3'), 28 μL (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de *MseI*-oligo 2 (5' TAC TCA GGA CTC AT 3'), 7 μL do tampão de PCR OPA 10X (Amersham) e 53 μL de água ultrapura autoclavada.

Após os componentes serem misturados e homogeneizados, em tubos de 500 μL , a solução foi submetida a uma sequência de 10 minutos sob 65°C, 10 minutos sob 37°C e 10 minutos sob 25°C, sendo depois mantidas sob -20°C.

Para apenas uma reação de ligação são utilizados: 2 μL do tampão da enzima *T4* DNA ligase 5X (Invitrogen), 1 μL dos adaptadores das enzimas *EcoRI* ou *PstI*, 1 μL do adaptador da enzima *MseI*, 1 μL de *T4* DNA ligase (1 unidade/ μL ; Invitrogen), 5 μL de água ultrapura autoclavada e 40 μL da reação da digestão acima descrita.

As reações de ligação foram realizadas sob 20°C durante 3 horas, sendo cuidadosamente agitadas a intervalos de 1 hora. As amostras foram então armazenadas sob -20°C.

Reações de amplificação

Foram realizadas duas reações consecutivas para a amplificação do DNA. Na primeira, reação de **pré-amplificação**, foram utilizados iniciadores de *EcoRI* e *MseI* ou de *PstI* e *MseI*, com extensão de 1 nucleotídeo seletivo na extremidade 3'. Os produtos da reação de pré-amplificação foram diluídos e utilizados como molde na segunda reação de PCR, dita **amplificação seletiva**, na qual foram utilizados três nucleotídeos seletivos adicionados à extremidade 3' dos iniciadores, sendo o primeiro nucleotídeo correspondente àquele utilizado na pré-amplificação. Ambas as reações foram efetuadas em termociclador PTC-100 (MJ Research®).

Os iniciadores *EcoRI* utilizados nas reações de pré-amplificação foram representados por E+N, sendo N o nucleotídeo seletivo adicionado ao terminal 3' do iniciador. Os iniciadores das enzimas *MseI* e *PstI* foram representados por M+N e P+N, respectivamente (Quadro 1).

Especificação	Seqüência
Adaptador <i>EcoRI</i>	5'- CTCGTAGACTGCGTACC - 3' 3'- CATCTGACGCATGGTTAA - 5'
Iniciadores da pré-amplificação <i>EcoRI</i>	5'- GACTGCGTACCAATTTCA <u>A</u> - 3' ou 5'- GACTGCGTACCAATTTCT <u>T</u> - 3'
Adaptador <i>MseI</i>	5'- GACGATGAGTCCTGAG - 3' 3'- TACTCAGGACTCAT - 5'
Iniciadores da pré-amplificação <i>MseI</i>	5'- GATGAGTCCTGAGTAAC <u>C</u> - 3' ou 5'- GATGAGTCCTGAGTAAG <u>G</u> - 3'
Adaptador <i>PstI</i>	5'- CTCGTAGACTGCGTACATGCA - 3' 3'- CATCTGACGCATGT - 5'
Iniciador da pré-amplificação <i>PstI</i>	5'- GACTGCGTACATGCAG <u>A</u> - 3'

Quadro 1 - Seqüência dos adaptadores e iniciadores utilizados nas reações de pré-amplificação

As reações de pré-amplificação foram compostas por: 0,5 µL do iniciador da enzima de corte raro *EcoRI* + N oligo (50 ng/µL); 0,5 µL do iniciador da enzima de corte freqüente *MseI* + N oligo (50 ng/µL); 1 µL de dNTP 10 mM (Invitrogen); 2 de tampão sem MgCl₂ 10X (Fermentas); 1,2 µL MgCl₂ 25 mM (Fermentas); 0,6 µL de Taq DNA polimerase (5 unidades/µL; Fermentas) e 8,2 µL de água ultrapura autoclavada. A esse coquetel de pré-amplificação foram adicionados 3 µL da solução com o DNA digerido e ligado ao adaptador.

A pré-amplificação foi realizada de acordo com o seguinte programa de PCR: 94°C, 2 minutos (passo 1); 94°C, 1 minuto (passo 2, desnaturação); 56°C, 1 minuto (passo 3, hibridização) e 72°C, 1 minuto (passo 4, extensão). Os passos 2 a 4 foram repetidos por 26 vezes. O ciclo final foi seguido de 5 minutos a 72°C. Os produtos da reação foram diluídos em 80 µL de água ultrapura e armazenados sob -20°C.

Na amplificação seletiva foram utilizadas combinações de iniciadores *EcoRI* com *MseI* e *PstI* com *MseI*, sendo ambos com extensão de 3 pares de bases além da sequência que se acopla ao adaptador na extremidade 3'. Foram utilizadas 34 combinações de iniciadores que estão representadas no Quadro 2. Nessas reações foram usados: 0,5 µL (50 ng/µL) do iniciador da enzima de corte raro, *EcoRI*+NNN ou *PstI*+NNN; 0,6 µL do iniciador da enzima de corte freqüente *MseI*+NNN (50 ng/µL); 0,8 µL de dNTP 5 mM (Invitrogen®); 2 µL de tampão da Taq DNA polimerase 10X (Fermentas®); 1,2 µL de MgCl₂ 25 mM (Fermentas®); 0,32 µL de Taq DNA polimerase (5 unidades/ µL; Fermentas); 12,28 µL de água ultrapura autoclavada e 1,5 µL da reação de pré-amplificação diluída. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 12 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C (-0,7 °C por ciclo) e 1 minuto a 72°C. O ciclo final foi seguido de 2 minutos a 72°C. Quando as reações não foram imediatamente usadas, o armazenamento foi feito a -20°C.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida 19:1 6%, uréia 7,5 M, tampão TEB 1X) de 0,5 mm de espessura. Foi usado o sistema de gel de seqüenciamento “Sequi-Gen GT” (BioRad®), com dimensões de 38 x 50 cm e fonte de 3.000 V. Para a confecção da matriz foram utilizados: 420,4 g de uréia, 200 mL de TEB 5X, 150 mL de acrilamida/bisacrilamida 40% (19:1), sendo o volume final ajustado para 1 L com água ultrapura. A solução matriz foi filtrada (Millipore; 0,2 µm) e armazenada em frascos âmbar, envoltos em papel alumínio, e mantida em refrigerador.

As placas usadas na montagem do gel foram cuidadosamente limpas utilizando-se etanol 95%. Na placa maior, foram aplicados 2 mL de REPEL (Amersham®). O produto foi cuidadosamente espalhado utilizando lenços de papel com movimentos circulares. Para o tratamento da placa menor, foram misturados em um tubo de 1,5 mL, 995 µL de etanol 95%, 5 µL de ácido acético glacial e 5 µL de BIND (Amersham®). Em seguida, o produto foi aplicado sobre a placa e cuidadosamente espalhado com lenços de papel em movimentos circulares.

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

Códigos	Combinações
EM01	5'- GACTGCGTACCAATTCA AAA -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CGC -3'
EM02	5'- GACTGCGTACCAATTCA AAA -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CTA -3'
EM03	5'- GACTGCGTACCAATTCA AAC -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CAA -3'
EM04	5'- GACTGCGTACCAATTCA AAC -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CGT -3'
EM05	5'- GACTGCGTACCAATTCA AAG -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CAA -3'
EM06	5'- GACTGCGTACCAATTCA AAG -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CAC -3'
EM07	5'- GACTGCGTACCAATTCA ACC -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CTC -3'
EM08	5'- GACTGCGTACCAATTCA ACC -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CTG -3'
EM09	5'- GACTGCGTACCAATTCA ACC -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CTT -3'
EM10	5'- GACTGCGTACCAATTCA ACG -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CGC -3'
EM11	5'- GACTGCGTACCAATTCA ACG -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CTT -3'
EM12	5'- GACTGCGTACCAATTCA ACT -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CGC -3'
EM13	5'- GACTGCGTACCAATTCA AGG -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CAA -3'
EM14	5'- GACTGCGTACCAATTCA AGG -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CAG -3'
EM15	5'- GACTGCGTACCAATTCA AGG -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CTT -3'
EM16	5'- GACTGCGTACCAATTCA ACA -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CAA -3'
EM17	5'- GACTGCGTACCAATTCA ACA -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CAC -3'
EM18	5'- GACTGCGTACCAATTCA ACA -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CTC -3'
EM19	5'- GACTGCGTACCAATTCA AGA -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CAG -3'
EM20	5'- GACTGCGTACCAATTCT TAC -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA GGT -3'
EM21	5'- GACTGCGTACCAATTCT TAG -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA GGT -3'
EM22	5'- GACTGCGTACCAATTCT TAT -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA GGC -3'
EM23	5'- GACTGCGTACCAATTCT TTA -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA GGT -3'
EM24	5'- GACTGCGTACCAATTCT AGA -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CAA -3'
PM01	5'- GACTGCGTACATGCAG ACA -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CAC -3'
PM02	5'- GACTGCGTACATGCAG ACA -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CAG -3'
PM03	5'- GACTGCGTACATGCAG ACC -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CAC -3'
PM04	5'- GACTGCGTACATGCAG ACT -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CAG -3'
PM05	5'- GACTGCGTACATGCAG AGC -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CGT -3'
PM06	5'- GACTGCGTACATGCAG AAC -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CTA -3'
PM07	5'- GACTGCGTACATGCAG ACG -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CTG -3'
PM08	5'- GACTGCGTACATGCAG AGC -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CTA -3'
PM09	5'- GACTGCGTACATGCAG AGA -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CAC -3'
PM10	5'- GACTGCGTACATGCAG AAA -3' + 5'- GATGAGTCCTGAGTAA CAC -3'

Quadro 2 - Códigos atribuídos às 34 combinações de iniciadores AFLP usadas para as amplificações seletivas. Em negrito estão os 3 nucleotídeos seletivos adicionados à extremidade 3' dos iniciadores visando à amplificação seletiva

Revelação dos géis

A coloração das bandas do gel foi realizada com base no protocolo de Creste et al. (2001), modificado por Lopes (2003). Após a eletroforese, as placas foram cuidadosamente separadas e o gel aderido à placa menor foi corado com nitrato de prata. Para tanto, o gel foi imerso em 2 L de solução para fixação (etanol 10% e ácido acético 1%) durante 10 minutos sob agitação lenta. Após a fixação, foi realizada uma lavagem com água ultrapura, durante 1 minuto.

Um pré-tratamento foi feito com 2 L de solução de oxidação (ácido nítrico 1,5%) durante 3 minutos; depois, o gel foi lavado com 2 L de água ultrapura por 1 minuto. A impregnação foi realizada com a solução de nitrato de prata (AgNO_3) 0,2% durante 20 minutos, sob agitação leve. Duas novas lavagens foram feitas, com água ultrapura, com duração de 30 segundos cada.

A revelação dos géis se deu em solução contendo 2 L de água ultrapura, 60 g de carbonato de sódio anidro (Mallinckrodt®) e 1,4 mL de formaldeído 37% (Promega®). Nesta etapa, 1 L foi aplicado sobre o gel até começarem a surgir as bandas. Após este passo, a solução foi descartada e o outro litro adicionado para finalizar a revelação.

O bloqueio da revelação foi feito em solução de ácido acético 5% durante 5 minutos, sob agitação leve, seguindo-se de nova lavagem com água ultrapura durante 1 minuto. Após este passo, a placa foi colocada em posição vertical, em local seco e arejado, sob temperatura ambiente para possibilitar a secagem do gel. Em seguida, foi feita a análise das bandas e a fotodocumentação em câmera digital.

O peso molecular das marcas polimórficas foi determinado a partir de uma equação de regressão, obtida com base nas distâncias de migração dos fragmentos de um padrão de DNA de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®).

Para a identificação dos marcadores foi adotado um código no qual os dois primeiros caracteres são as letras que correspondem às enzimas de restrição (*EcoRI* = E, *PstI* = P e *MseI* = M), o terceiro e o quarto caracteres são números que identificam as combinações de acordo com a variação nas extensões dos iniciadores (Quadro 2). O código de identificação dos locos AFLP foi composto, então, pelos quatro caracteres que identificam a combinação, seguidos do tamanho do fragmento do loco em pares de base (pb). A genotipagem foi feita anotando-se, para cada loco, a presença ou ausência da banda no gel.

Como no presente trabalho havia a necessidade de se repetir os padrões moleculares obtidos por Lopes (2003) e aumentar o número de indivíduos da população segregante, em algumas combinações foram utilizadas amostras das reações realizadas por aquele autor, armazenadas a -20°C. A intenção era verificar a repetibilidade da técnica.

2.2.5 Construção dos mapas de ligação

A construção dos mapas de ligação foi baseada na análise de uma amostra de 160 indivíduos F_1 oriundos do cruzamento entre os acessos IAPAR-06 e IAPAR-123. Esta amostra foi genotipada para um total de 369 locos AFLP, sendo 114 locos oriundos do primeiro genitor, 139 oriundos do segundo e 116 locos bi-parentais, presentes em ambos os genitores.

Após a obtenção dos dados moleculares, isto é, a leitura dos locos polimórficos, foi feita a verificação do padrão de segregação de cada loco. Para a verificação da ocorrência de distorção de segregação, os locos foram submetidos ao teste de aderência de “qui-quadrado” (χ^2). Para cada teste foi obtido o valor de P, ou seja, a probabilidade sob H_0 , de se obter um valor igual ou superior ao χ^2 calculado com base na amostra. Por se tratar de um procedimento de testes múltiplos, deve-se considerar um nível de significância conjunto. O nível de significância é definido, em estatística, como a probabilidade de se cometer um erro Tipo I (rejeitar uma hipótese nula verdadeira). Assim, cometer um erro Tipo I, no presente caso, implica em admitir a existência de distorção de segregação de um loco que, na realidade, não apresenta distorção. Dessa maneira, adotando-se um nível de significância α para cada teste (um para cada marca) em um total de t testes, tem-se um nível de significância conjunto α^* dado por: $\alpha^* = 1 - (1 - \alpha)^t$, que corresponde à probabilidade de rejeitar pelo menos uma hipótese nula verdadeira. Esse nível de significância cresce à medida que aumenta o número de testes realizados (Silva & Vencovsky, 2002).

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

Assim, foram obtidos para cada loco individualmente o valor da estatística χ^2 e o correspondente valor de P. Estes valores de P foram ordenados em ordem crescente e a posição do teste individual do *rank* de probabilidades foi representado pela letra *i*. Foi adotado como ponto de corte o nível $\alpha^*=0,05$ para o conjunto dos *t* testes. O valor de *i* a partir do qual foi rejeitada a hipótese H_0 (e de todos os *i* com P valores iguais ou inferiores) foi determinado a partir da definição:

$$\alpha^* \geq \frac{tP_i}{i} \quad (11)$$

As marcas que apresentaram distorção das proporções mendelianas no teste de aderência não foram utilizadas na construção do mapa de ligação. Foram descartados também locos com mais de 10% de observações perdidas.

Os locos foram separados em dois conjuntos de dados, um contendo locos do genitor IAPAR-06 juntamente com os locos bi-parentais e outro contendo as marcas do genitor IAPAR-123 e as marcas bi-parentais. Estes conjuntos foram utilizados para a construção de mapas separados para cada genitor, de acordo com a estratégia do duplo pseudocruzamento teste.

A construção dos mapas de ligação foi feita utilizando-se o programa TreeMap[®] (Coelho, 2005) e o programa “MAPMAKER/EXP” versão 3.0 (Lander et al., 1987). Primeiramente, os conjuntos contendo os locos de segregação 1:1 e 3:1 de cada genitor foram analisados no TreeMap[®], o qual permite a análise de locos com mistura de segregações.

A atribuição dos locos aos grupos de ligação (GL) é baseada em testes de ligação considerando os locos 2 a 2 (análise de 2 pontos). Todos os pares de locos que têm uma distância menor ou igual a uma distância especificada e um LOD *score* superior a um LOD mínimo pré-estabelecido são considerados ligados. Na construção dos grupos de ligação é utilizada a propriedade transitiva, ou seja, se o loco 1 estiver ligado ao loco 2, e este, por sua vez, estiver ligado ao loco 3, então os locos 1 e 3 pertencem ao mesmo grupo de ligação. Como critérios para determinar a ligação foi usado LOD *score* > 5,0 e frequência de recombinação inferior a 0,35. Para converter as frequências de recombinação em distâncias de mapa, expressas em centiMorgans, foi utilizada a função de mapeamento de Kosambi (Kosambi, 1944).

A estatística LOD *score* se baseia na razão de verossimilhanças, em que no denominador é disposta a função de verossimilhança considerando uma distância entre marcas de 0,5 ($r = 0,5$;

ausência de ligação; hipótese de nulidade) e, no numerador, a função que possui a estimativa de máxima verossimilhança de r (hipótese alternativa). Essa razão é colocada no logaritmo com base 10, sendo esse termo definido como *LOD score*. O termo LOD é a abreviação de *log of the odds*, ou seja, razão de chances (Liu, 1998). A interpretação de um LOD de valor z , por exemplo, é que a hipótese alternativa é 10^z vezes mais provável que a hipótese de nulidade.

Após a determinação dos grupos, foi determinada a ordem linear dos locos dentro de cada grupo. Para encontrar a ordem mais provável foi usado o critério de ordenação *LOD score* $> 2,0$. As marcas não ordenadas no mapa (*framework*), de acordo com os critérios estabelecidos, foram adicionadas como marcadores acessórios e alocadas ao lado das marcas do *framework* mais próximas, anotando-se a distância entre elas.

Procurou-se deixar no *framework* apenas as marcas com segregação 1:1, visto que a ordenação de locos com segregação 3:1 é problemática, (Maliepaard et al., 1997; Conner et al., 1998; Maliepaard et al., 1998) e, também, para que fosse possível a análise dos dados pelo programa QTLCartographer[®], o qual não permite misturas de segregações.

Depois de obtidos os *frameworks* para cada GL no Treemap[®], os marcadores contidos no mesmo foram analisados pelo programa Mapmaker[®]. As ordens dos marcadores foram confirmadas através do comando “*ripple*”, o qual estabelece uma janela (no *default* são cinco locos) dentro da qual são feitas trocas entre marcas vizinhas comparando-se a probabilidade das diferentes ordens possíveis. Foi usado como critério de confirmação da ordem um valor de LOD $> 2,0$, ou seja, a ordem foi admitida como correta quando esta se apresentou no mínimo 100 vezes mais provável que as ordens alternativas. Os GL foram então submetidos à análise multiponto para a determinação das distâncias entre as marcas através do comando “*map*”.

Para a análise dos dados através do programa Mapmaker[®] os genótipos da progênie foram codificados atribuindo-se as letras H e A para representar a condição heterozigótica e homozigótica, respectivamente. Nos géis, H corresponde à presença da banda e A, à ausência de banda.

Para determinar marcas ligadas em fase de repulsão, o conjunto de dados de cada mapa foi duplicado e re-codificado, ou seja, os genótipos H do conjunto original foram codificados como A no conjunto duplicado, e vice-versa. No código usado para identificar o loco no conjunto original acrescentou-se a letra a, e no conjunto duplicado acrescentou-se a letra r, de acordo com procedimento relatado por Nelson et al. (1993). Com esse artifício, todo grupo de ligação

formado tem um grupo espelho constituído pelos mesmos marcadores, os quais são descartados posteriormente da análise.

2.2.6 Análise dos QTL

As análises de QTL foram feitas utilizando-se as médias das características avaliadas que apresentaram variabilidade genética, ou seja, produção total, número total de frutos, peso médio de frutos, comprimento e largura de frutos, porcentagem de polpa, teor de sólidos solúveis e formato médio de frutos. Um total de 97 indivíduos avaliados fenotipicamente foi utilizado para o mapeamento de locos quantitativos.

2.2.6.1 Marcas simples

Os mesmos locos com padrão de segregação de 1:1 e 3:1 utilizados na construção dos mapas de ligação foram utilizados para a análise de marcas simples entre os indivíduos avaliados fenotipicamente. Para isso, foi feita uma análise de variância considerando as classes genóticas das marcas como um efeito no modelo, com dois níveis, 1 para a presença da banda e 0 para sua ausência, como segue:

$$y_{ij} = \mu + g_i + e_{ij}, \quad (12)$$

em que: y_{ij} é o valor observado no j -ésimo indivíduo, que apresenta o genótipo i ; μ é uma constante inerente a todas as observações; g_i é o efeito do i -ésimo genótipo (ausência ou presença da banda); e_{ij} é o erro aleatório associado à observação y_{ij} , sendo $e_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$.

Dessa forma, testa-se o contraste entre a média dos indivíduos com a banda e a média dos indivíduos sem a banda, resultando no teste das hipóteses:

$$H_0: \mu_{\text{presença}} - \mu_{\text{ausência}} = 0$$

$$H_1: \mu_{\text{presença}} - \mu_{\text{ausência}} \neq 0$$

em que $\mu_{\text{presença}}$ e $\mu_{\text{ausência}}$ correspondem às médias dos indivíduos com presença e ausência de bandas, respectivamente.

A análise de marcas simples se baseia na comparação entre as médias dos genótipos marcadores e é feita separadamente para cada loco. Se as médias são diferentes ($P \geq 1\%$) há indícios de que pelo menos um QTL está localizado próximo à marca. Este nível de significância foi utilizado para indicar a associação de uma marca a algum QTL e há uma grande chance de se cometer um erro tipo I, ou seja, se detectar a presença de um QTL, quando, na verdade ele não existe. No entanto, o aumento do limiar de significância aumentará a chance de perder locos importantes. Portanto, o nível de significância de 0,01 foi utilizado tendo-se em mente que o possível QTL precisará ser confirmado em análises genético-estatísticas posteriores.

2.2.6.2 Mapeamento por intervalo composto

Na análise de mapeamento por intervalo composto (CIM), foram utilizados os mapas de ligação dos genitores IAPAR-06 e IAPAR-123, construídos pelo Mapmaker[®]. Convém salientar que os marcadores acessórios não são considerados nas análises, mas somente os ordenados no *framework*. As análises foram feitas utilizando o programa *QTLCartographer*[®] versão 1.17 (Basten et al. 1994, 2004). O CIM é uma extensão do mapeamento por intervalo (Lander & Botstein, 1989) e se baseia na hipótese de que em um intervalo flanqueado por duas marcas adjacentes há um QTL afetando a característica, ao mesmo tempo em que considera os efeitos de QTL adicionais fora do intervalo sendo testado, utilizando regressão múltipla. O modelo matemático é definido por:

$$Y = x^*b^* + XB + E, \quad (13)$$

no qual Y é um vetor dos valores fenotípicos; b^* é o efeito aditivo do possível QTL; x^* é um vetor da variável indicadora, especificando as probabilidades de um indivíduo ter diferentes genótipos para o possível QTL dado o genótipo das marcas flanqueadoras; B é um vetor dos efeitos de

outras marcas selecionadas no modelo; X é a matriz dos genótipos de marcadores selecionados; E é um vetor de erros.

As estimativas dos parâmetros são obtidas por máxima verossimilhança através do algoritmo ECM (*Expectation/Conditional Maximization*) (Meng & Rubin, 1993). A razão de verossimilhanças (LR) utilizada para testar a hipótese da presença do QTL na posição dentro do intervalo é dada por: $-2\ln(L_0/L_1)$, sendo L_0/L_1 a razão da função de verossimilhança sob a hipótese de nulidade (nenhum QTL na posição) e a hipótese alternativa (um QTL na posição). Os resultados são expressos em *LOD score* que corresponde a $0,2171*(LR)$.

Foi utilizado o modelo 6 do módulo “Zmapqtl” do *QTLCartographer*, e foi avaliada a presença de QTL a intervalos de 1 cM entre marcadores, com uma janela (*window size*) de 10 cM. O número de marcas cofatoras para o controle do *background* foi estabelecido pela análise de regressão múltipla *forward-backward stepwise (FB)*.

Os valores críticos (*threshold*) ao nível genômico para o erro tipo I ($\alpha=0,10$) foi estabelecido para cada característica independentemente, através de 1.000 permutações e utilizando a taxa de permutação empírica de falsos positivos (Churchill & Doerge, 1994). Um nível muito baixo de probabilidade de erro tipo I aumenta a chance de rejeitar um QTL verdadeiro (erro tipo II). Por essa razão, foi utilizado um valor de $\alpha=0,10$ visando reduzir essa probabilidade. O teste de permutações é uma alternativa para determinar o valor crítico que permite declarar a existência de um QTL, e consiste em embaralhar os dados fenotípicos com os dados genotípicos dos indivíduos e refazer as análises, e assim sucessivamente.

A estimação da posição, efeito genético e porcentagem da variação fenotípica (dada pelo coeficiente de correlação parcial, R^2) dos QTL foi estabelecida nos picos de LOD acima do nível de significância considerado, de acordo com o *output* do programa *QTLCartographer*[®]. O intervalo de confiança para a posição do QTL foi construído de acordo com a metodologia descrita por Lander & Botstein (1989), com o auxílio do software MapChart 2.1 (Voorrips, 2002), o qual também foi utilizado para a construção dos gráficos mostrando as curvas de LOD score nos grupos de ligação.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Análises fenotípicas

Na Tabela 1 encontra-se o resultado da análise de variância para o caráter velocidade de crescimento. Como foram tomadas três medidas das alturas das plantas durante o período inicial do experimento, duas medidas de velocidade de crescimento (VC1 e VC2) foram analisadas, referentes ao período entre duas medições consecutivas. Pode-se verificar que os genótipos não apresentaram diferenças ($p\text{-valor} < 10\%$) para esta característica. A média das alturas das plantas foi de 50,9, 82,0 e 97,1 cm por ocasião da primeira, segunda e terceira medições, respectivamente. Meletti (1998) também não encontrou diferenças para velocidade de crescimento entre plantas de diferentes progênies de maracujazeiro amarelo. Analisando o comportamento de maracujazeiros obtidos por estacas e por sementes, Almeida et al. (1991) constataram que plantas aos 30, 90 e 120 dias não apresentaram diferenças entre si quanto ao crescimento.

Tabela 1 - Análise de variância para o caráter velocidade de crescimento em dois períodos (VC1 e VC2) e coeficiente de variação ambiental (CV)

Fonte de Variação	Graus de liberdade	VC1	VC2
		QM	QM
Repetição (R)	2	1447,74**	453,96**
Bloco(R)	27	153,31 ns	82,48 ns
Genótipo	99	130,78 ns	80,44 ns
Resíduo Intra-bloco	247	118,91	68,07
CV (%)		34,84	34,08

ns: não significativo ao nível de 10% de probabilidade

** : significativo ao nível de 1% de probabilidade.

A velocidade de crescimento pode ser considerada uma medida do vigor vegetativo das plantas, uma vez que plantas com uma maior velocidade de crescimento, teoricamente, seriam mais vigorosas. Meletti (1998) relata que as plantas que apresentam maior vigor vegetativo conseguem atingir mais rapidamente o arame de sustentação; quando isso acontece, as plantas

passam a emitir brotações laterais secundárias e terciárias, formando a “cortina produtiva”. A partir deste ponto, as plantas estão aptas para captarem o estímulo luminoso e florescer. No entanto, como não foi verificada diferença entre os genótipos para essa característica no presente estudo, não há como associar a velocidade de crescimento e, conseqüentemente, o vigor com características relacionadas à produção e qualidade de frutos.

As análises de variância para produção total (PT) e número total de frutos (NF) encontram-se na Tabela 2. Para esta última característica, os dados fenotípicos não apresentaram uma distribuição normal, de acordo com o teste de Shapiro-Wilk, ao nível de 5% de significância, por isso as análises foram feitas com os dados transformados por $\sqrt{X}$. Para todas as demais características, os dados apresentaram distribuição normal, não havendo necessidade de transformação. Os efeitos de genótipos foram altamente significativos para esses caracteres (PT e NF), refletindo a ampla variabilidade genética na população. Os efeitos de repetições e dos blocos dentro de repetições também foram significativos, evidenciando a utilidade do delineamento experimental em isolar fontes de variação que pudessem afetar a precisão experimental. Os coeficientes de variação experimental, para os dois caracteres foram moderados, o que é esperado em experimentos de campo envolvendo caracteres de produtividade.

Tabela 2 - Análise de variância para produção total (PT) e número total de frutos (NF) e coeficientes de variação residual (CV)

FV	GL	QM	
		PT	NF ¹
Repetições (R)	2	427,0**	52,59**
Blocos/R	27	35,3**	3,98**
Genótipos	99	88,8**	9,57**
Resíduo Intra-bloco	164	17,5	1,79
CV (%)		23,78	11,80

** significativo ao nível de 0,01 de probabilidade

1: dados transformados por $\sqrt{X}$.

A ampla variabilidade existente entre diferentes progênies de maracujazeiro amarelo, tanto para a capacidade produtiva quanto para características do fruto, foi relatada por Oliveira (1980). A população utilizada no presente estudo é uma progênie de irmãos germanos. Visto que o cruzamento foi feito entre dois acessos distantes geneticamente, um oriundo de uma seleção para o mercado de suco e outro um material mais rústico, proveniente do Marrocos, a variabilidade apresentada pela população pode ser utilizada para a seleção de genótipos superiores procurando aproveitar alelos favoráveis presentes nos genitores.

Considerando o espaçamento entre plantas adotado, a média para a produção total da população é de 11,34 toneladas por hectare, o que é considerada baixa. Entretanto, esse fato já era esperado, pois foi utilizado um genitor sabidamente inferior para caracteres relacionados à produtividade (IAPAR-06).

As características relacionadas à qualidade dos frutos foram avaliadas em duas épocas distintas durante a safra, tomando-se, em cada parcela, uma amostra de frutos. Neste caso, a análise dos dados deve ser feita em parcelas subdivididas no tempo, sendo os genótipos considerados parcelas e as épocas, subparcelas (Gomes, 2000). Diante da impossibilidade de analisar as parcelas subdivididas no delineamento em látice, procurou-se desconsiderar o controle intra-blocos e analisar o experimento como blocos casualizados. No entanto, primeiramente, foi realizada uma análise prévia com as médias das parcelas para avaliar a eficiência do látice (Tabela 3).

Tabela 3 - Eficiência relativa do látice para as características produção total (PT), número total de frutos (NF), peso médio de frutos (PM), comprimento médio de frutos (CM), largura média de frutos (LM), porcentagem de polpa (PP), teor de sólidos solúveis (SS) e formato médio de frutos (FM)

Caractere	PT	NF	PM	CM	LM	PP	SS	FM
Eficiência do Látice	1,089	1,118	0,996	0,999	0,995	0,997	1,007	0,995

Conforme visto, a eficiência do látice foi maior para as características PT e NF, sendo 8,9 e 11,8%, respectivamente, mais eficientes que o delineamento em blocos ao acaso. Essas características foram, de fato, analisadas pelo delineamento látice. Já para as demais, foi

verificada uma eficiência muito baixa do controle intra-bloco, o que justifica os dados terem sido analisados segundo o delineamento em blocos casualizados com parcelas subdivididas (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise de variância para o peso médio de frutos (PM), comprimento médio de frutos (CM), largura média de frutos (LM), porcentagem de polpa (PP), teor de sólidos solúveis (SS) e formato médio de frutos (FM), e coeficientes de variação residual (CV) em %

FV	GL	QM					
		PM	CM	LM	PP	SS	FM
Repetições	2	702,67	1,139**	0,426*	16,79	0,396	0,002
Genótipos (G)	99	1.459,09**	0,820**	0,352**	72,03**	1,879**	0,009**
Resíduo a	175	656,78	0,192	0,142	18,10	0,362	0,001*
Época (E)	1	205,64	3,306**	0,041	1.498,39**	0,446	0,053**
G x E	91	663,37	0,208	0,162*	26,24	0,401	0,002**
Resíduo b	122	588,15	0,191	0,115	27,50	0,299	0,001
CV (%)		17,1	5,43	4,94	11,7	3,82	2,68

*, ** significativo ao nível de 0,05 e 0,01 de probabilidade, respectivamente.

Considerando os caracteres relacionados à qualidade de frutos (Tabela 4), verifica-se que a população também apresenta variabilidade genética para todas essas variáveis, constatada pela alta significância dos efeitos de genótipos. Detectou-se interação entre genótipos e épocas somente para a largura média de frutos (LM) e formato médio de frutos (FM), embora a porcentagem de polpa (PP) tenha sido significativa ao nível de 10% de probabilidade. A inexistência de interação para as outras características abre a perspectiva de que com uma única avaliação durante a safra para caracteres relacionados à qualidade de frutos, seria possível a caracterização dos genótipos de maneira a selecionar as melhores plantas. No entanto, esses resultados devem ser vistos com cautela, visto que os dados foram tomados somente em duas épocas. Talvez, com um número maior de avaliações (épocas), esta consistência não ocorra. Maluf et al. (1989) relatam que o teor de sólidos solúveis e, em menor grau, a porcentagem de polpa, apresentaram uma considerável interação genótipo x épocas de amostragem, interação esta

medida pela baixa correlação genética das características em duas épocas de amostragem em diferentes acessos de maracujá-amarelo.

Com relação às épocas de avaliação, foram detectadas diferenças entre as médias para o comprimento de frutos, a porcentagem de polpa e o formato de frutos (Tabelas 4 e 5), enquanto as médias dos outros caracteres não variaram entre as épocas, conforme evidenciado na análise de variância. Meletti et al. (1999) observaram que, em uma mesma planta, pode-se notar variação de até 2° Brix ao longo da safra, sendo essa característica fortemente influenciada pela precipitação. No presente estudo, esta variação não foi observada. Os principais componentes dos sólidos solúveis totais do suco do maracujá-amarelo são os açúcares, ou seja, sacarose (32,4%), glicose (38,1%) e frutose (29,4%) (Chan Junior & Kwok, 1975).

Tabela 5 - Valor médio segundo a época para os caracteres produção total (PT), número total de frutos (NF), peso médio de frutos (PM), comprimento médio de frutos (CM), largura média de frutos (LM), porcentagem de polpa (PP), teor de sólidos solúveis (SS) e formato médio de frutos (FM)

Caráter	Época 1	Época 2	Média
PT (kg/planta)	-	-	17,58
NF (n°/planta)	-	-	135,27
PM (g/fruto)	142,05	141,70	141,88
CM (cm/fruto)	8,13	7,97	8,06
LM(cm/fruto)	6,84	6,85	6,85
PP (%)	42,61	47,03	44,71
SS (°Brix)	14,33	14,28	14,31
FM	1,19	1,16	1,18

Em acessos selecionados de maracujazeiro, Meletti (1998) verificou que as dimensões externas dos frutos foram pouco influenciadas pela época, e frutos de tamanho superior foram obtidos ao longo de toda a safra, sendo que em janeiro e em maio eles se apresentaram mais ovais. Neste mesmo trabalho, os frutos maiores e mais pesados foram obtidos especialmente em fevereiro, março e abril, com melhor qualidade no início da safra.

No presente estudo, as características que apresentaram variação entre as duas avaliações tiveram comportamento diferenciado. Por exemplo, frutos maiores (com maior comprimento) foram obtidos no começo da safra, o que se refletiu também no formato de frutos, que se apresentaram mais alongados na primeira avaliação. Já para a porcentagem de polpa, os frutos apresentaram um maior valor na segunda época de avaliação, realizada em maio.

O formato de fruto foi avaliado segundo uma razão entre o comprimento e largura. Desta forma, valores mais próximos de 1 indicam frutos mais redondos, enquanto valores mais distantes, frutos mais alongados. Esse índice é bastante utilizado para estudar o formato de frutos em tomate (Monforte & Tanksley, 2000; Ku et al., 2000), pimentão (Chaim et al., 2001), melão (Waldelice, 2003) e outras fruteiras. A maioria dos frutos aqui avaliados apresentou formato alongado, sendo que a variação ocorreu no grau de alongamento.

As estimativas das variâncias genéticas e dos coeficientes de herdabilidade, dos coeficientes de variação genética, e dos ganhos esperados com seleção para todos os caracteres encontram-se na Tabela 6, juntamente com os intervalos de confiança para os dois primeiros. A produção total, número total de frutos, comprimento médio de frutos e porcentagem de polpa foram os que apresentaram os maiores coeficientes de herdabilidade. O menor valor foi encontrado para largura de frutos, mas de maneira geral esses coeficientes são considerados altos. Os ganhos esperados com a seleção dos 20% melhores clones variaram conforme o caráter, sendo maiores para produção total e número total de frutos, devido a estes apresentarem maior variabilidade, conforme pode ser verificado pelos coeficientes de variação genéticos. Para os caracteres relacionados à qualidade de frutos, estes ganhos são menores, mas ainda de magnitudes consideráveis.

Estimativas do ganho esperado com seleção dos 22% clones mais produtivos em 110 plantas de maracujazeiro-amarelo de pomares comerciais da região do Triângulo Mineiro foram obtidas por Maluf et al. (1989). Estes autores estimaram ganhos da ordem de 29,1% para produção total e verificaram, pelas estimativas de herdabilidade e dos coeficientes de variação genéticos, que ganhos significativos poderiam ser obtidos para produção precoce e peso médio de frutos.

Tabela 6 - Estimativas da variância genética ($\hat{\sigma}_G^2$) e dos coeficientes de herdabilidades ($\hat{h}_m^2$) com os respectivos intervalos de confiança e estimativas dos coeficientes de variação genéticos (CV_G) e ganhos esperados com seleção (G_s), para a produção total (PT), número total de frutos (NF), peso médio de frutos (PM), comprimento médio de frutos (CM), largura média de frutos (LM), porcentagem de polpa (PP) e teor de sólidos solúveis (SS)

Caráter	$\hat{\sigma}_G^2$	$\hat{h}_m^2$ (%)	CV_G	G_s (%)
PT	26,8 (19,4 – 39,5)	82,2 (72,4 – 85,6)	29,5	36,6
NF ¹	2,93 (2,13 – 4,28)	83,0 (73,1 – 86,7)	15,0	35,9
PM	163,0 (91,8 – 366,6)	56,1 (21,9 – 69,2)	9,00	10,7
CM	0,136 (0,095 – 0,212)	79,3 (59,3 – 84,8)	4,58	5,71
LM	0,0368 (0,020 – 0,085)	52,6 (19,0 – 65,6)	2,80	2,92
PP	12,16 (8,37 – 19,29)	83,2 (55,7 – 88,6)	7,80	10,1
SS	0,316 (0,223 – 0,484)	79,0 (62,6 – 84,3)	3,93	4,91

¹ – dados transformados por $\sqrt{X}$.

As estimativas dos coeficientes de correlação genética e fenotípica entre médias se encontram na Tabela 7. Observa-se uma alta correlação genética entre produção total e número total de frutos, sendo estes dois caracteres indicativos do potencial produtivo das plantas. O teor de sólidos solúveis totais apresentou uma correlação negativa com todos os outros caracteres; isto significa que a seleção para o aumento da produção irá acarretar uma redução no teor de sólidos solúveis. A porcentagem de polpa apresentou uma baixa correlação com todos os outros caracteres, enquanto o peso médio de frutos está altamente correlacionado com o comprimento e a largura dos frutos, o que é esperado. Observa-se ainda uma concordância alta entre os coeficientes de correlação genética e fenotípica.

Tabela 7 - Estimativa do coeficiente de correlação genética (acima da diagonal) e fenotípica entre médias (abaixo da diagonal) entre os caracteres: produção total (PT), número total de frutos (NF), peso médio de frutos (PM), comprimento médio de frutos (CM), largura média de frutos (LM), porcentagem de polpa (PP), teor de sólidos solúveis (SS) e formato médio de frutos (FM)

	PT	NF	PM	CM	LM	PP	SS	FM
PT		0,865	0,357	0,394	0,323	0,129	-0,358	0,066
NF	0,889		-0,101	0,091	-0,084	0,138	-0,173	0,060
PM	0,297	-0,001		0,632	0,779	-0,042	-0,561	0,083
CM	0,348	0,119	0,712		0,663	0,127	-0,291	0,221
LM	0,262	-0,011	0,834	0,694		-0,159	-0,508	-0,005
PP	0,152	0,155	0,205	0,219	0,077		-0,088	0,237
SS	-0,267	-0,126	-0,268	-0,177	-0,244	-0,003		0,025
FM	0,184	0,169	0,062	0,320	-0,139	0,218	0,024	

A seleção para produção total deve também afetar positivamente o número total de frutos, devido à alta correlação genética entre estes caracteres. Com relação ao potencial produtivo das plantas, tanto o número total de frutos quanto a produção total podem ser utilizados como indicadores. No entanto, é preferível selecionar as plantas mais produtivas pela produção total, visto que assim poderia ocorrer a seleção indireta de plantas com frutos mais pesados, já que estes dois caracteres são positivamente correlacionados.

Bruckner (2002) ressalta a dificuldade de se aferir a produção total do maracujazeiro devido à safra se estender por um longo período. De fato, esta característica exige avaliações constantes durante o período de produção. Uma maneira de se avaliar indiretamente a produção total é fazer a coleta de dados no começo da safra. No presente trabalho, a produção dos três primeiros meses da safra apresentou um coeficiente de correlação genética de +0,949 com a produção total, sendo um ótimo indicativo do potencial produtivo das plantas. Considerando a produção dos dois primeiros meses, esta correlação foi de +0,761, a qual é menor do que aos três meses, mas ainda assim poderia ser utilizada, diante da dificuldade de se avaliar um período maior. Por outro lado, Maluf et al. (1989) obtiveram uma correlação genética menor (+0,517) entre a produção total e a produção nas primeiras 10 semanas de colheita. Bruckner (2003) cita a

necessidade de mais estudos acerca da correlação entre a produtividade inicial e a produtividade total, de forma a se conseguir o máximo ganho por ciclo, já que se poderia selecionar plantas mais produtivas em uma mesma safra. Neste sentido, as informações obtidas no presente trabalho são de grande valia para os programas de melhoramento.

A correlação negativa entre o teor de sólidos solúveis e os demais caracteres é um ponto importante a ser considerado no melhoramento. Indiretamente, poder-se-ia estar diminuindo o teor de sólidos solúveis pela seleção para produção total, por exemplo. Isso seria mais grave na seleção para frutos destinados ao processamento, pois teores maiores de sólidos solúveis são mais desejáveis. Viana et al. (2003) também encontraram correlações genéticas negativas entre o teor de sólidos solúveis e outros caracteres relacionados à produção, como número de frutos, e características dos frutos como comprimento e largura, espessura da casca e peso. Nestas situações é necessária a utilização de índices de seleção a fim de que o melhoramento para um caráter não altere a média da população para outro caráter no sentido indesejado, tal como postularam, geneticamente, Cruz & Regazzi (1997).

O peso dos frutos é diretamente proporcional as suas dimensões, ou seja, comprimento e largura. No presente estudo, evidenciam-se que estas características apresentam grande correlação genética. No entanto, a associação entre estas características pode não ser devido à quantidade de polpa do fruto, já que essa correlação foi moderadamente baixa. Frutos maiores e, conseqüentemente, mais pesados, podem ter uma casca mais grossa e não necessariamente uma maior quantidade de polpa. A seleção para peso de frutos deve considerar, também, a porcentagem de polpa. Meletti (2003) comenta que seria interessante que a ampliação no peso e no tamanho dos frutos fosse além da aparência, e estivesse sempre acompanhada pelo incremento no teor de polpa e no número de sementes. Assim, o ganho de qualidade seria estendido para o rendimento em suco, como resultado do aumento da quantidade ou volume dos arilos. Do contrário, estaria havendo somente um espessamento da casca, gerando frutos maiores e mais pesados com melhor efeito visual apenas. Detectou-se aqui correlações positiva e com maior valor entre os caracteres porcentagem de polpa e formato de frutos, sendo que frutos mais alongados têm uma maior porcentagem de polpa. Oliveira (1980) cita que frutos ovais são preferíveis porque apresentam cerca de 10% a mais de rendimento de suco em relação aos arredondados. Os resultados do presente trabalho corroboram as informações deste autor. Frutos ovais têm ainda uma vantagem adicional, conforme relata Meletti (2001): encaixam-se

melhor e permitem totalizar o peso de 16 kg no volume disponível. Quando os frutos são muito redondos, além da maior dificuldade de acondicionamento, mais espaços vazios entre os frutos fazem com que a embalagem completa não possua o peso final pré-determinado pelo mercado.

O cruzamento entre duas plantas contrastantes e heterozigóticas (genitores) foi realizado visando maximizar a variabilidade genética em F_1 . Para fins de melhoramento, cruzamentos dessa natureza podem ser feitos procurando explorar a variabilidade existente entre os acessos genitores e a seleção dos melhores indivíduos da população segregante. Estas plantas poderiam, então, ser clonadas por estaquia, gerando uma população melhorada, a qual poderia ser utilizada diretamente para a multiplicação e distribuição dos melhores clones e, simultaneamente, recombinada no sentido de acumular os alelos favoráveis oriundos de genótipos diferentes. É possível, assim, conduzir vários ciclos de seleção recorrente e, em cada ciclo, selecionar os melhores clones para multiplicação e distribuição. Tem-se assim um programa de longo prazo associado à fixação e distribuição dos genótipos superiores em cada ciclo, através da clonagem. Entretanto, na etapa de seleção dos melhores clones, há a necessidade de se praticar uma seleção não muito elevada, para não exaurir a variabilidade de alelos de incompatibilidade, o que acarretaria prejuízos na produção comercial. No presente trabalho simulou-se, empiricamente, a seleção dos 20 melhores clones da população (intensidade de seleção de 20%), partindo-se da premissa que eles irão produzir pólen com variabilidade suficiente para os alelos da incompatibilidade. No entanto, torna-se necessário a realização de estudos específicos para avaliar o número mínimo de genótipos de uma população, que proporcione uma polinização adequada e, conseqüentemente, garanta que o potencial produtivo de um genótipo seja expresso.

Os resultados da análise fenotípica da população segregante foram importantes tanto no contexto deste trabalho, como também para fornecer subsídios aos programas de melhoramento do maracujazeiro, pois informações básicas sobre a cultura são ainda escassas. Para o mapeamento de QTL, um dos pontos fundamentais para o sucesso da análise é a ocorrência variabilidade genética da população para os locos que se deseja mapear, o que foi verificado para os caracteres: produção total, número total de frutos, peso médio de frutos, comprimento médio de frutos, largura média de frutos, porcentagem de polpa, teor de sólidos solúveis e formato médio de frutos. As médias desses caracteres foram utilizadas na análise de QTL. Na Figura 4 estão apresentados os histogramas dessas características, evidenciando a variabilidade e a distribuição normal dos dados.

Figura 4 – Distribuição das variáveis: produção total (PT), número total de frutos (NF), peso médio de frutos (PM), comprimento médio de frutos (CM), largura média de frutos (LM), porcentagem de polpa (PP), teor de sólidos solúveis (SS) e formato médio de frutos (FM)

2.3.2 Genotipagem molecular dos indivíduos F₁

Um total de 45 novos indivíduos da população segregante, incluindo os dois genitores, foram caracterizados molecularmente com as mesmas combinações de enzimas/iniciadores utilizadas por Lopes (2003). Parte da imagem de um gel de AFLP corado com nitrato de prata é apresentada na Figura 5, cuja combinação utilizada foi a EM03. À esquerda (primeiras 8 canaletas) se encontram amostras das reações realizadas por Lopes (2003), que estavam armazenadas sob -20°C. É possível observar a repetibilidade da técnica quanto aos padrões das bandas, garantindo maior confiabilidade às demais etapas realizadas neste trabalho.

2.3.3 Segregação das marcas

Um total de 253 locos polimórficos apresentando padrão de segregação 1:1 foi utilizado nas análises. Destes, 114 eram do genitor IAPAR-06 e 139 eram do genitor IAPAR-123. Adicionalmente, 116 locos bi-parentais, segregando na proporção de 3:1, foram encontrados e analisados.

A análise da segregação Mendeliana revelou somente dois marcadores que apresentaram desvio da proporção 1:1. As marcas EM03174 e EM08348, pertencentes ao genitor IAPAR-06, apresentaram distorção mesmo após a correção de FDR. Das 116 marcas bi-parentais, 12 apresentaram desvio da proporção de 3:1.

Se fosse utilizado apenas o nível de significância individual, $\alpha = 0,05$, teriam sido considerados com desvio de segregação 15 locos do acesso IAPAR-06 (~13%), 17 locos do IAPAR-123 (~12%) e 22 locos bi-parentais (~19%). Portanto, todos esses locos não seriam incluídos nas análises se esse fosse o critério para declarar as distorções da segregação Mendeliana. Critérios que controlam o nível de significância global são recomendados para evitar que seja cometido o erro tipo I quando são realizados testes múltiplos (Bearzoti, 2000; Silva & Vencovsky, 2002). No caso, isto corresponde a rejeitar erroneamente um loco que apresenta o padrão de segregação testado em H_0 , ou seja, 1:1 ou 3:1.

Figura 5 – Parte da imagem de um gel de AFLP (combinação EM23) corado com nitrato de prata contendo indivíduos da população F_1 , os genitores IAPAR-06 e IAPAR-123 e algumas amostras de reações realizadas por Lopes (2003)

Distorções da segregação esperada de locos AFLP têm sido observadas em inúmeras espécies. Esta proporção é inerente à espécie e aos genótipos usados para gerar a população segregante. Em kiwi, foram relatadas taxas de distorção que variaram de 4 a 10% (Testolin et al., 2001), em *Populus*, taxas de 7% (Wu et al., 2000) e em *Cryptomeria japonica*, taxas superiores a 40% (Nikaido et al., 1999).

A distorção de segregação pode ser devida a vários fatores: viés estatístico, erros de genotipagem e razões biológicas. A distorção de natureza biológica é causada pela proximidade física dos locos marcadores com regiões ou genes que afetam a formação dos gametas antes da fertilização ou a viabilidade dos genótipos após a fertilização (Vogl & Xu, 2000). Distorções de segregação têm sido observadas em vários trabalhos (Debener & Mattiesch, 1999; Yin et al., 2001; Wu et al., 2000). Bearzoti (2000) recomenda que esses locos sejam excluídos da construção dos mapas de ligação por afetarem os testes estatísticos usados para detectar a ligação gerando, assim, falsos positivos.

2.3.4 Mapas de ligação

Na construção dos mapas de ligação, além das marcas que apresentaram distorção da segregação Mendeliana, foram descartados das análises os locos com mais de 10% de observações perdidas, de forma a não prejudicarem as análises de ligação.

Pela verificação das frequências de recombinação entre as marcas duas a duas, foi possível notar que algumas delas apresentavam discrepâncias quanto a sua ligação com outras no mesmo grupo de ligação (GL). Por exemplo, uma marca se encontrava em um GL ligada somente a um marcador, o qual apresentava outras marcas muito próximas a este, sem se ligarem à primeira. Foram identificadas três marcas que apresentavam esse comportamento, todas com padrão de segregação 3:1. Estas marcas foram posteriormente descartadas.

Dessa forma, considerando que foram descartadas as marcas com distorção de segregação, com observações perdidas e marcas problemáticas, foram utilizados 98 locos do genitor IAPAR-06, 120 locos do IAPAR-123 e 67 locos bi-parentais na construção dos mapas de ligação.

Mapa de ligação do acesso IAPAR-06

No mapa do acesso IAPAR-06, foram formados 10 GL, os quais foram constituídos de 2 até 11 marcas no *framework* e um total de 153 marcas. A distância total, considerando a soma dos GL foi de 727,8 cM (usando-se a função de Kosambi), e variou de 3,9 a 212,1 cM, com uma média de 72,8 cM. A distância média entre marcas consecutivas no *framework* foi de 13,7 cM, sendo que o maior intervalo foi de 36,1 cM (GL II).

As marcas que não foram ordenadas com um LOD *score* superior a 2,0 foram alocadas como acessórias nos GL. Embora algumas marcas 3:1 pudessem ser incluídas no *framework*, estas foram todas incluídas como acessórias para facilitar as análises posteriores. Foi possível perceber que a inclusão desses locos no *framework* dificultava bastante a determinação da ordem com o rigor estabelecido devido à pouca informação estatística destes locos 3:1 para as análises de ligação. Entretanto, a inclusão destes marcadores como acessórios nos GL possibilitou a determinação da homologia entre os GL dos dois genitores, conforme será visto adiante. Um total de 58 locos bi-parentais foi alocado no mapa desse genitor.

Considerando todos os locos, inclusive os acessórios, os GL foram constituídos de 2 a 34 marcas, com uma média de 15,4 por GL. A proporção de marcas acessórias em relação às do *framework* foi de aproximadamente 59%. Pode-se observar que a distribuição dos marcadores nos grupos não ocorreu de forma aleatória. Aproximadamente, 65% dos marcadores concentraram-se em quatro grupos. Lopes (2003) encontrou 63% das marcas em 3 GL, trabalhando apenas com locos com segregação 1:1, nessa mesma população. Carneiro et al. (2002) verificaram que as marcas RAPD também não apresentaram distribuição aleatória no genoma do maracujá analisando a mesma população segregante aqui utilizada: de 96 locos RAPD monoparentais do acesso IAPAR-06, 81% foram atribuídos a cinco grupos de ligação que corresponderam a 76% do comprimento do mapa, composto por 9 GL.

Comparando-se o mapa deste genitor obtido neste estudo com o mapa obtido por Lopes (2003) pode-se observar que os locos de segregação 1:1 foram divididos da mesma forma nos grupos de ligação, com exceção de um grupo que aqui foi repartido em dois. No GL 1 gerado pelos estudos daquele autor, havia uma única marca ligando dois conjuntos desse grupo (Figura 6). No entanto, essa marca continha mais de 10% de dados perdidos e, quando descartada, o grupo se dividiu em dois. Além disso, se fosse utilizado como critério para a formação dos

grupos uma frequência de recombinação mínima de 0,30 ao invés de 0,35, esse GL também seria dividido em dois. Assim, ao invés de 9 GL, como era de se esperar visto que o número haplóide de cromossomos da espécie é $n = 9$, foram obtidos 10 GL. Contudo, há indicações de que os GL IX e X, ambos constituídos por dois locos no *framework*, sejam na verdade, um único grupo. Isso porque esses dois grupos se unem por intermédio de marcas de segregação 3:1 que foram descartadas por apresentarem dados perdidos (resultado não apresentado). Porém, somente com uma maior saturação de marcas vai ser possível verificar com segurança essa ligação. Aqui, esses GL são apresentados juntos, mas com numeração diferente (Figuras 7 a 10).

Mapa de ligação do acesso IAPAR-123

No mapa do acesso IAPAR-123 179 marcas foram agrupadas em nove GL. A distância total do mapa foi de 471,5 cM, e variou de 11,1 até 93,5 cM por GL com uma média de 52,4 cM (usando-se a função de Kosambi). A distância média entre marcas consecutivas do *framework* foi de 9,8 cM, sendo que o maior intervalo foi de 27,7 cM. Um total de 60 locos bi-parentais foi alocado no mapa desse genitor.

A proporção de marcas acessórias em relação às marcas do *framework* foi de 68%. Estas incluem todos os locos bi-parentais e alguns locos monoparentais. Pode-se verificar que mesmo com marcadores 3:1, a proporção de locos ordenados foi comparável com a obtida por Lopes (2003) para esse genitor, o qual obteve uma proporção de 61,6% de marcas acessórias. A exclusão de marcas com observações perdidas e, ainda, o aumento no número de indivíduos utilizados de 117 para 160 podem ter contribuído para uma ordenação mais confiável.

Nota-se que a dificuldade em se obter a ordem correta dos marcadores pode ser atribuída à formação de *clusters*, ou agrupamento, em determinadas regiões. Regiões adensadas, onde a ordenação é difícil, podem ser consequência do tipo de marcador utilizado para o mapeamento. Vuylsteke et al. (1999) relatam que, em diversos estudos, a combinação das enzimas *EcoRI/MseI* tende a revelar agrupamentos de locos co-localizados com possíveis regiões centroméricas. Em contrapartida, combinações do tipo *PstI/MseI* produzem marcas com distribuição mais uniforme no genoma. Agrupamentos de marcadores AFLP oriundos da combinação *EcoRI/MseI* em regiões específicas dos cromossomos também apareceram nos mapas de batata (Van Eck et al.,

1995), cevada (Becker et al., 1995), soja (Keim et al., 1997) e de *Arabidopsis* (Alonso-Blanco et al., 1998).

O comprimento total dos mapas foi diferente entre os genitores, igual a 727,8 cM para o primeiro e 471,5 cM para o segundo genitor. Os dados de Lopes (2003) referentes aos comprimentos dos mapas desses acessos foram de 681,8 e 411,1 cM para o IAPAR-06 e IAPAR-123, respectivamente. O comprimento dos mapas desses mesmos acessos relatado por Carneiro et al. (2002) foi de 783,5 cM e 728,0 cM para o primeiro e segundo genitores, respectivamente, porém os autores utilizaram marcadores do tipo RAPD.

Um resumo das características dos mapas obtidos no presente estudo se encontra na Tabela 8.

Tabela 8 - Características dos mapas de ligação dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123 construídos com locos AFLP usando a estratégia “duplo pseudocruzamento teste”

Característica	IAPAR-06	IAPAR-123
Número de locos	154	179
Grupos de ligação	10	9
Marcas ordenadas no <i>framework</i>	47	57
Marcas acessórias	107	122
Comprimento do mapa (cM – Kosambi)	727,8	471,5
Comprimento do maior grupo (cM – Kosambi)	212,1	93,5
Comprimento do menor grupo (cM – Kosambi)	3,9	11,1
Comprimento médio dos grupos (cM – Kosambi)	72,8	52,4
Distância média entre marcas (cM – Kosambi)	13,7	9,8

Na Figura 6 são apresentados os mapas de ligação de ambos os genitores obtido por Lopes (2003). Algumas marcas de segregação 1:1 contidas neste mapa não foram incluídas no mapa aqui construído por serem marcas com mais de 10% de dados perdidos ou com distorção de segregação. Nota-se no GL 1 do mapa do IAPAR-06 a grande distância (44,6 cM) entre a marca EM01290a e as outras mais abaixo deste grupo, evidenciando a possível separação desse grupo em dois quando esta é descartada. No presente trabalho, esse grupo deu origem aos grupos I-06 e

VII-06. É possível notar ainda a maior quantidade de marcas acessórias no mapa do IAPAR-123. No presente estudo, as proporções foram semelhantes entre os mapas dos genitores.

Figura 6 – Mapas de ligação dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123, à esquerda e à direita da linha tracejada, respectivamente, obtidos por Lopes (2003)

A correspondência dos GL obtidos no presente estudo e os GL obtidos por Lopes (2003), para os mapas de ambos os genitores, encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Relação entre os grupos de ligação (GL) obtidos no presente estudo e os obtidos por Lopes (2003) para o mapa dos genitores IAPAR-06 e IAPAR-123

IAPAR-06										
GL (presente estudo)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IV	X
GL (Lopes, 2003)	1	2	4	5	6	3	1	7	8	9
IAPAR-123										
GL (presente estudo)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IV	
GL (Lopes, 2003)	7	4	1	6	8	3	9	5	2	

Nas Figuras 7 a 10 são apresentados os mapas de ligação dos genitores aqui obtidos conforme a homologia dos GL, os quais receberam a mesma denominação. Os GL do IAPAR-06 estão denominados com o número do grupo seguido da identificação 06 e os GL do IAPAR-123 seguidos da identificação 123. A homologia entre os GL dos genitores foi estabelecida usando os locos 3:1 comuns entre os mesmos, conforme será visto adiante.

Figura 7 – Mapa de ligação dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123: Grupos I e II

Figura 8 – Mapa de ligação dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123: Grupos III, IV e V

Figura 9 – Mapa de ligação dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123: Grupos VI e VII

VIII - 06

VIII - 123

IX - 06

X - 06

IX - 123

Figura 10 – Mapa de ligação dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123. Grupos: VIII, IX e X

2.3.5 Alinhamento dos mapas

Utilizando-se um total de 67 locos comuns a ambos os genitores foi possível estabelecer a homologia entre 8 GL dos mapas do IAPAR-06 e IAPAR-123. O último par, que corresponde ao GL IV, foi alinhado por exclusão, visto que não havia marcadores com segregação 3:1 em F₁ presentes em ambos os grupos. Os GL homólogos receberam a mesma numeração. Pode-se notar nas Figuras 7 a 10 as marcas bi-parentais comuns entre as marcas acessórias dos GL homólogos. Por exemplo, no GL I, as marcas EM02114, EM09127, EM16270, EM18257, EM20155, EM20219, EM2190, PM03182, PM03265 e PM04214 estão presentes em ambos os genitores.

Embora a utilização de locos dominantes de segregação 3:1 seja complicada do ponto de vista genético-estatístico para fins de detecção de ligação, elas possibilitam a identificação de grupos homólogos. Da maneira como estas marcas foram tratadas no presente estudo, a complicação inerente às mesmas foi minimizada por terem sido todas alocadas como marcas acessórias, servindo apenas para o alinhamento dos GL entre os genitores. Mesmo sendo possível a inclusão de alguns locos bi-parentais no *framework*, estes não foram incluídos, pois esses mapas serão utilizados para o mapeamento de QTL em um *software* que não lida com misturas de segregações, como será visto oportunamente.

Utilizando o mesmo conjunto de dados do presente estudo, Matta (2005) construiu um único mapa para o cruzamento, utilizando os locos bi-parentais como “marcadores ponte” para a integração dos mapas dos genitores. No entanto, conforme verificado pelo autor, houve uma grande dificuldade no agrupamento dos locos, havendo a necessidade de se utilizar valores de *LOD scores* muito altos para a separação de alguns grupos (LOD 10), resultando em oito GL. Também, a ordenação das marcas nesses GL ficou muito prejudicada e pouco confiável. Assim, optou-se, aqui, pela construção de dois mapas com uma ordenação baseada somente em marcadores 1:1, os quais são mais informativos, e a utilização dos locos 3:1 apenas para o alinhamento dos homólogos entre os genitores.

Seefelder et al. (2000) utilizaram marcas AFLP com segregação 1:1 e 3:1 na construção de dois mapas para os genitores do cruzamento entre duas plantas de *Humulus lupulus*. Os autores utilizaram somente locos monoparentais para a construção do *framework* e adicionaram os locos 3:1 só quando os mesmos não alteravam a ordem dos marcadores.

Pelos resultados obtidos no presente estudo, é possível afirmar que a utilização de marcadores 3:1 é eficiente na identificação de homologia entre GL dos genitores do cruzamento. Não foi observada nenhuma redundância na identificação dessa homologia, isto é, nenhum GL de um genitor se alinhou com mais de um GL do outro genitor. Conforme verificado aqui, este tipo de abordagem faz com que a limitação intrínseca deste tipo de marcador seja minimizada e sua informação utilizada da melhor maneira possível.

2.3.6 Mapeamento de QTL

2.3.6.1 Marcas simples

Os mesmos locos utilizados na construção dos mapas de ligação foram usados na análise de marcas simples. Um total de 285 locos polimórficos apresentando padrão de segregação 1:1 e 3:1 foram utilizados. Os locos que apresentaram associação significativa com os caracteres fenotípicos avaliados, detectados pela análise de variância, assim como os respectivos grupos de ligação nos mapas individuais estão listados na Tabela 10.

A análise de marcas simples detectou marcas ligadas a QTL para todas as características em ambos os genitores. Como relatado na Introdução desta tese, o estudo de marcas simples utilizando métodos de quadrados mínimos, como a análise de variância, não permite a estimação da posição dos QTL, mas se constitui em uma abordagem inicial no tocante a sua detecção (Bearzoti, 2000). Pode-se verificar que para as marcas do acesso IAPAR-06, há uma forte sugestão da presença de QTL para as características avaliadas nos GL I, II, IV, VI, VII e IX. As marcas analisadas apresentaram um R^2 variando de 6,9 até 24,6%. Para as marcas do acesso IAPAR-123, há evidência da presença de QTL nos grupos I, II, III, IV, VII, VIII e IX. Para essas marcas, o R^2 variou de 6,8%, para a produção total, até 20,6% para formato médio de frutos. Há um grande número de marcas desse acesso apresentando associação significativa com o formato médio de frutos (36 marcas), teor de sólidos solúveis (22 marcas) e comprimento médio de frutos (20 marcas). Isso, no entanto, não indica a presença de vários QTL para estes caracteres, pois estas marcas podem estar em regiões próximas umas das outras.

É importante considerar que as estimativas dos efeitos das marcas tende a ser sempre menor que o efeito verdadeiro do QTL, já que eventos de recombinação entre este e a marca podem ocorrer (Broman, 2001). Vários marcadores acessórios apresentaram associação significativa com as características fenotípicas avaliadas. Essas marcas alocadas como acessórios não são consideradas no mapeamento por intervalo composto; assim, as informações adquiridas com a análise de marcas simples podem complementar àquelas das análises a seguir.

Tabela 10 - Marcas que apresentaram associação (p-valor < 1%), detectadas pela análise de variância, com as características produção total (PT), número total de frutos (NF), peso médio de frutos (PM), comprimento médio (CM), largura média (LM), porcentagem de polpa (PP), teor de sólidos solúveis (SS) e formato médio de frutos (FM)

(continua)

Caráter	Loco	Genitor	Grupo de ligação ¹	p-valor	R ²	Caráter	Loco	Genitor	Grupo de ligação ¹	p-valor	R ²
PT	EM02256	06	Ia	0,0009	0,1113	LM	EM05318	ambos	VIIIa	0,0018	0,0983
PT	EM02110	06	I	0,0052	0,0801	LM	EM11128	ambos	VIIIa	0,0003	0,1320
PT	EM07328	06	IV	0,0017	0,0989	LM	EM16163	ambos	VIIIa	0,0017	0,0998
PT	EM091050	06	I	0,0018	0,0988	PP	EM02337	06	VI	0,0070	0,0749
PT	EM10121	06	I	0,0088	0,0731	PP	EM06175	06	VIa	0,0057	0,0776
PT	EM13340	06	I	0,0030	0,0896	PP	EM07328	06	IV	0,0056	0,0781
PT	EM16354	06	Ia	0,0058	0,0782	PP	EM07189	06	IVa	0,0053	0,0799
PT	EM19226	06	I	0,0011	0,1072	PP	EM18363	06	VIa	0,0036	0,0865
PT	EM21243	06	Ia	0,0028	0,0913	PP	EM1995	06	VI	0,0011	0,1089
PT	EM2193	06	Ia	0,0010	0,1120	PP	EM21161	06	II	0,0041	0,0843
PT	PM03242	06	IXa	0,0079	0,1084	PP	EM01525	123	I	0,0036	0,0868
PT	EM03276	123	III	0,0085	0,0714	PP	EM021037	123	VIIa	0,0029	0,0905
PT	EM04244	123	IV	0,0099	0,0680	PP	EM02145	123	VIIa	0,0026	0,0922
PT	EM10145	123	IVa	0,0003	0,1307	PP	EM02144	123	VIIa	0,0041	0,0841
PT	EM12199	123	IVa	0,0009	0,1103	PP	EM061227	123	VIIa	0,0016	0,1004
PT	EM13335	123	IVa	0,0092	0,0708	PP	EM10300	123	VII	0,0029	0,0926
PT	EM16260	123	IV	0,0006	0,1186	PP	EM18332	123	VIIa	0,0021	0,0952
PT	EM20321	123	IVa	0,0021	0,0956	PP	EM19276	123	VIIa	0,0019	0,0982
PT	EM21304	123	IVa	0,0033	0,0881	PP	EM21124	123	VII	0,0017	0,0999
PT	EM2296	123	II	0,0074	0,0732	PP	EM20219	ambos	Ia	0,0057	0,0802
PT	EM24470	123	IV	0,0008	0,1148	PP	PM04184	ambos	Ia	0,0039	0,0862
PT	PM06192	123	IV	0,0061	0,0765	PP	PM04216	ambos	VIa	0,0029	0,0922
PT	PM08192	123	IVa	0,0093	0,0705	PP	PM0481	ambos	VIa	0,0019	0,0988
PT	PM08137	123	IV	0,0001	0,1432	SS	EM01161	06	IVa	0,0014	0,1032
PT	EM18218	ambos	IIIa	0,0048	0,0840	SS	EM22394	06	IV	0,0004	0,1260
PT	EM20288	ambos	IIIa	0,0049	0,0804	SS	EM01156	123	IX	0,0049	0,0810
PT	PM07341	ambos	IIIa	0,0051	0,0798	SS	EM021037	123	VIIa	0,0055	0,0792
NF	EM021560	06	X	0,0035	0,0880	SS	EM02230	123	IIa	<,0001	0,1837
NF	EM02256	06	Ia	0,0096	0,0692	SS	EM02145	123	VIIa	0,0024	0,0938
NF	EM07328	06	IV	0,0019	0,0967	SS	EM02144	123	VIIa	0,0015	0,1027
NF	EM091050	06	I	0,0083	0,0718	SS	EM04192	123	IIa	<,0001	0,1747
NF	PM06337	06	X	0,0012	0,1055	SS	EM10300	123	VII	0,0029	0,0923
NF	EM04244	123	IV	0,0098	0,0682	SS	EM151050	123	IIa	<,0001	0,1632
NF	EM10145	123	IVa	0,0002	0,1442	SS	EM16406	123	IX	0,0076	0,0734
NF	EM12199	123	IVa	0,0005	0,1210	SS	EM16308	123	II	0,0008	0,1155
NF	EM16260	123	IV	0,0007	0,1155	SS	EM18332	123	VIIa	0,0038	0,0846
NF	EM20321	123	IVa	0,0011	0,1062	SS	EM20231	123	IIa	<,0001	0,1664
NF	EM21304	123	IVa	0,0029	0,0907	SS	EM20131	123	IIa	<,0001	0,1554
NF	EM24470	123	IV	0,0003	0,1332	SS	EM22112	123	II	0,0001	0,1533
NF	PM08137	123	IV	<,0001	0,1697	SS	EM2296	123	II	<,0001	0,1859
NF	EM18218	ambos	IIIa	0,0066	0,0782	SS	EM2276	123	II	0,0001	0,1485
NF	EM20288	ambos	IIIa	0,0045	0,0819	SS	EM24235	123	IIa	<,0001	0,1539
NF	PM07341	ambos	IIIa	0,0024	0,0932	SS	EM24121	123	IIa	<,0001	0,1700
PM	EM16397	06	IX	0,0091	0,0702	SS	PM06186	123	II	0,0002	0,1397
PM	EM17190	06	IX	0,0024	0,0946	SS	PM07222	123	VIII	0,0023	0,0940
PM	PM03242	06	IXa	0,0043	0,0827	SS	PM10129	123	IX	0,0054	0,0786
PM	EM08395	123	IX	0,0079	0,0726	SS	PM10114	123	IIa	<,0001	0,1492
PM	EM01800	ambos	IX	0,0041	0,0845	SS	EM01800	ambos	IX	0,0004	0,1272
PM	EM05318	ambos	VIIIa	0,0088	0,0701	SS	EM05318	ambos	VIIIa	0,0046	0,0816
PM	EM11128	ambos	VIIIa	0,0011	0,1077	SS	EM16163	ambos	VIIIa	0,0061	0,0772
PM	EM16163	ambos	VIIIa	0,0088	0,0707	FM	EM011623	06	Ia	0,0003	0,1907

Tabela 10 - Marcas que apresentaram associação (p-valor < 1%), detectadas pela análise de variância, com as características produção total (PT), número total de frutos (NF), peso médio de frutos (PM), comprimento médio (CM), largura média (LM), porcentagem de polpa (PP), teor de sólidos solúveis (SS) e formato médio de frutos (FM)

(conclusão)

Caráter	Loco	Genitor	Grupo de ligação ¹	p-valor	R ²	Caráter	Loco	Genitor	Grupo de ligação ¹	p-valor	R ²
CM	EM02256	06	Ia	0,0070	0,0749	FM	EM02337	06	VI	0,0056	0,1174
CM	EM02110	06	I	0,0017	0,0998	FM	EM02256	06	Ia	<,0001	0,2495
CM	EM0799	06	VIIa	0,0012	0,1048	FM	EM07236	06	VI	0,0003	0,1920
CM	EM13340	06	I	0,0014	0,1036	FM	EM08114	06	VIIa	0,0017	0,1481
CM	EM16397	06	IX	0,0003	0,1321	FM	EM16397	06	IX	0,0005	0,1826
CM	EM17190	06	IX	<,0001	0,1608	FM	EM1892	06	II	<,0001	0,2199
CM	EM1790	06	VIIa	0,0010	0,1106	FM	EM19226	06	I	0,0082	0,0720
CM	EM19226	06	I	0,0004	0,1238	FM	EM20107	06	VIIa	<,0001	0,2435
CM	EM21243	06	Ia	0,0023	0,0948	FM	EM21161	06	II	0,0074	0,1155
CM	EM2193	06	Ia	0,0098	0,0711	FM	EM24378	06	VIa	<,0001	0,2419
CM	PM03242	06	IXa	<,0001	0,1540	FM	EM01156	123	IX	0,0054	0,0795
CM	PM09188	06	VI	0,0091	0,0748	FM	EM021037	123	VIIa	<,0001	0,1842
CM	EM01156	123	IX	0,0060	0,0776	FM	EM02230	123	Ia	0,0051	0,0804
CM	EM021037	123	VIIa	0,0039	0,0854	FM	EM02145	123	VIIa	<,0001	0,2064
CM	EM02145	123	VIIa	0,0018	0,0992	FM	EM02144	123	VIIa	<,0001	0,1903
CM	EM02144	123	VIIa	0,0049	0,0813	FM	EM04244	123	IV	0,0031	0,0885
CM	EM04244	123	IV	0,0068	0,0747	FM	EM04192	123	Ia	0,0036	0,0859
CM	EM061227	123	VIIa	0,0029	0,0897	FM	EM061227	123	VIIa	<,0001	0,2048
CM	EM10300	123	VII	0,0050	0,0826	FM	EM10300	123	VII	<,0001	0,2012
CM	EM10145	123	IVa	0,0013	0,1072	FM	EM10145	123	IVa	<,0001	0,1755
CM	EM12199	123	IVa	0,0002	0,1356	FM	EM12199	123	IVa	<,0001	0,1922
CM	EM13335	123	IVa	0,0011	0,1086	FM	EM13335	123	IVa	0,0006	0,1186
CM	EM151400	123	IVa	0,0013	0,1038	FM	EM151400	123	IVa	0,0007	0,1139
CM	EM15248	123	I	0,0043	0,0845	FM	EM151050	123	Ia	0,0062	0,0763
CM	EM16260	123	IV	0,0002	0,1413	FM	EM15273	123	IVa	0,0012	0,1099
CM	EM16232	123	IV	0,0013	0,1055	FM	EM15204	123	IV	0,0001	0,1479
CM	EM20321	123	IVa	0,0001	0,1449	FM	EM16406	123	IX	0,0027	0,0916
CM	EM21304	123	IVa	<,0001	0,1553	FM	EM16308	123	II	0,0023	0,0957
CM	EM24470	123	IV	<,0001	0,1549	FM	EM16260	123	IV	<,0001	0,1714
CM	PM06192	123	IV	0,0021	0,0950	FM	EM16232	123	IV	0,0022	0,0965
CM	PM08137	123	IV	0,0002	0,1379	FM	EM18332	123	VIIa	<,0001	0,1828
CM	PM10129	123	IX	0,0093	0,0690	FM	EM19276	123	VIIa	<,0001	0,1828
CM	EM01800	Ambos	IXa	0,0005	0,1201	FM	EM20321	123	IVa	<,0001	0,1904
CM	EM02509	Ambos	IXa	0,0083	0,0719	FM	EM20231	123	Ia	0,0039	0,0846
CM	PM0368	Ambos	VIIa	0,0006	0,1169	FM	EM20131	123	Ia	0,0039	0,0854
LM	EM0799	06	VIIa	0,0017	0,0986	FM	EM21304	123	IVa	<,0001	0,2041
LM	EM16397	06	IX	0,0006	0,1198	FM	EM22112	123	II	0,0095	0,0733
LM	EM17190	06	IX	0,0032	0,0897	FM	EM2296	123	II	0,0014	0,1018
LM	EM1790	06	VIIa	0,0005	0,1231	FM	EM2276	123	II	0,0037	0,0888
LM	EM1995	06	VI	0,0060	0,0782	FM	EM24470	123	IV	<,0001	0,1906
LM	PM03242	06	IXa	0,0017	0,0990	FM	EM24235	123	Ia	0,0041	0,0861
LM	PM04531	06	VIIa	0,0009	0,1115	FM	EM24121	123	Ia	0,0027	0,0918
LM	EM012292	123	VIII	0,0054	0,0803	FM	PM06192	123	IV	0,0009	0,1099
LM	EM21550	123	VIII	0,0044	0,0830	FM	PM08137	123	IV	<,0001	0,1517
LM	EM2276	123	II	0,0053	0,0821	FM	PM10114	123	Ia	0,0053	0,0790
LM	EM24160	123	VIIIa	0,0070	0,0749	FM	PM0368	ambos	VIIa	0,0016	0,1000
LM	PM07222	123	VIII	0,0071	0,0737	FM	PM05114	ambos	Ia	0,0066	0,0767

¹: grupo de ligação seguido da letra “a” representam marcadores acessórios nos mapas individuais

2.3.6.2 Mapeamento por intervalo composto

Vale ressaltar que para o mapeamento por intervalo composto, realizado pelo programa computacional QTLCartographer[®], somente as marcas alocadas no *framework* são utilizadas nas análises. Desta forma, os GL de ambos os genitores, contendo somente locos com padrão de segregação de 1:1, foram usados no mapeamento de QTL.

Normalmente, no delineamento “pseudocruzamento teste” são produzidos dois mapas, um para cada genitor, e a análise de QTL é realizada separadamente para cada um. No entanto, o poder de detecção de QTL em um genitor pode ser prejudicado pelo aumento da variância residual causada pelo efeito de QTL presentes no outro genitor. Hayashi & Awata (2004) sugerem que marcadores oriundos do outro genitor, associados ao caractere analisado, devem ser incluídos como cofatores no mapeamento por intervalo composto para reduzir a variância residual, aumentando, assim, o poder do teste.

Seguindo esta abordagem, os GL de ambos os genitores foram utilizados simultaneamente na entrada dos dados do programa, fazendo com que 19 GL (10 do IAPAR-06 e 9 do IAPAR-123) fossem lidos. Dessa forma, utilizando os dois pais simultaneamente, o mapeamento por intervalo composto pôde incluir como cofatores marcas de ambos os genitores.

A análise de mapeamento por intervalo composto identificou vários QTL. Para uma melhor apresentação, os resultados estão divididos por caracteres.

QTL para Produção total (PT)

Um total de seis QTL foi mapeado para produção total. Desses, quatro são oriundos do genitor IAPAR-06 e dois do IAPAR-123 (Figura 11 e Tabela 11). A proporção da variação fenotípica explicada por estes QTL variou de 6,6% para o QTL do GL X-06, até 15,0% para o QTL localizado no GL I-06. O limiar genômico foi de 2,78 LOD para este caráter. O maior valor de LOD *score* foi de 6,95 para o QTL localizado na região final do GL I-06. O QTL de maior efeito aditivo foi o encontrado no GL II-23, com um valor de 5,39 kg. Pode-se notar ainda que todos os alelos dos QTL, em ambos os genitores, conferem aumento na produção total.

Em cacau, Crouzillat et al. (2000) detectaram 10 QTL controlando produção total em uma população F_1 . Esses QTL explicaram de 12,1% a 47,1% da variância fenotípica e foram detectados em 15 anos de produção. Sibov et al. (2003) mapearam quatro QTL conferindo produtividade em milho tropical que, individualmente, explicavam de 5,2% a 11,2% da variação fenotípica. Similarmente a este último trabalho, o presente estudo não detectou QTL de grande efeito para produção total.

Pela abordagem adotada no presente estudo, quando dois ou mais picos de LOD ligados foram observados, estando os mesmos dentro do intervalo de confiança de um deles e ainda de efeito com mesmo sinal, foi declarado somente o QTL de maior valor de LOD. É o caso para o QTL do GL II-123 onde, apesar de existir outro pico de LOD ao lado desse QTL, os intervalos de confiança dos dois coincidem.

Estimação dos intervalos de confiança para a posição de um QTL é um assunto de intensas pesquisas no mapeamento genético (Lander & Botstein, 1989; van Ooijein, 1992; Visscher et al., 1996). Intervalos de confiança aproximados podem ser obtidos utilizando a “regra de um LOD”, onde o intervalo de confiança da posição de um QTL é definido pelos valores obtidos quando se desce um LOD do valor máximo (Conneally et al. 1985; Lander & Botstein, 1989). Assim, esse intervalo corresponde à região onde a presença do QTL é aproximadamente 95% provável. No entanto, essa regra pode fornecer intervalos de confiança que são muito pequenos (Lynch & Walsh, 1998). Através de estudos de simulação, van Ooijein (1992), sugeriu que intervalos de confiança deveriam ser baseados em 2-LOD, ao invés de um. Métodos de reamostragem, como *bootstrap*, podem fornecer intervalos de confiança mais robustos (Visscher et al., 1996). O comprimento do intervalo de confiança é influenciado pelo número de indivíduos amostrados, pelo efeito do QTL em questão e a densidade de marcadores (Lynch & Walsh, 1998). Darvasi et al. (1993) mostraram, através de simulações, que a precisão do intervalo de confiança não é significativamente aumentada, pelo uso de mapas mais densos além de um certo ponto, ou seja, aproximadamente uma marca a cada 5 a 10 cM.

Os resultados obtidos pelo mapeamento por intervalo composto para produção total estão de acordo com os resultados obtidos pela análise de marcas simples, na qual foi detectada a associação de marcas nos GL I-06 e IV-06 e nos GL II-123 e IV-123, em regiões muito próximas aos QTL identificados.

As marcas EM091050, EM19226 e PM08137 se apresentaram ligadas aos QTL de maior efeito para este caractere e podem ser úteis no processo seletivo para produção que utilize a seleção assistida por marcadores como ferramenta para aumentar a eficiência de um programa de melhoramento. No entanto, há a necessidade de mais estudos para verificar a estabilidade desses QTL em outros ambientes e outras épocas, para que somente os QTL mais estáveis sejam efetivamente utilizados.

Tabela 11 - Localização e efeitos dos QTL mapeados para produção total utilizando o mapeamento por intervalo composto

Grupo de ligação	Marca mais próxima	Posição ^a	Valor crítico ^b	LOD	Adit ^c	R ²
I – 06	EM19226r	6,32	2,78	5,86	4,38	12,97
I – 06	EM091050a	13,83	2,78	6,95	4,81	15,02
IV – 06	EM07328r	80,62	2,78	4,38	3,31	7,91
X – 06	PM06337a	0,01	2,78	4,07	3,10	6,60
II – 123	EM2296r	41,84	2,78	4,18	5,39	6,80
IV – 123	PM08137r	22,48	2,78	6,88	4,26	12,88

^a Posição mais provável do QTL correspondendo ao pico de LOD, estimado pelo QTLCartographer[®]; distância, em cM, em relação à primeira marca do grupo de ligação;

^b Valor crítico genômico, estimado por 1000 permutações;

^c Efeito aditivo do QTL, estimado pelo QTLCartographer[®]

Figura 11 - Gráficos mostrando as curvas de LOD *score* nos grupos de ligação onde foram mapeados QTL para produção total (PT), em ambos os acessos. São apresentados o valor crítico genômico (linha tracejada) e a posição estimada dos QTL com seus respectivos intervalos de confiança (barra vertical)

QTL para número total de frutos (NF)

Foi mapeado um total de sete QTL para a característica número total de frutos (Figura 12 e Tabela 12). Destes, quatro foram alocados no mapa do acesso IAPAR-06 e três no mapa do outro acesso. A proporção da variação fenotípica explicada por estes QTL variou de 4,6% para o QTL do GL V-06 até 16,5% para o QTL localizado no GL IV-123. Esse último QTL apresentou também o maior efeito aditivo entre todos os outros. O limiar genômico para esta característica foi de 3,01 LOD. Um QTL do GL I-123 teve um efeito aditivo negativo, sendo que o alelo desse QTL é responsável pela diminuição do número de frutos em 35,63 unidades.

Assim como a produção total, o número total de frutos é um caráter muito complexo, sujeito a várias influências ambientais e de natureza biológica. Estas podem incluir o vigor da planta, o número de flores produzidas, a eficiência da polinização, o tipo de flores quanto à curvatura dos estiletes, abscisão natural de frutos e outras. Portanto, os QTL encontrados devem estar relacionados também a essas características.

Garcia et al. (2000) encontraram 19 QTL controlando o número de frutos em uma população oriunda do cruzamento de duas plantas heterozigóticas em *Citrus*. Os autores verificaram que os QTL detectados para número de frutos e para número de sementes por fruto foram mapeados em regiões coincidentes e que os alelos que aumentavam número de frutos também foram responsáveis pelo aumento no número de sementes por fruto. No presente estudo, não foi avaliado o número de sementes por fruto. Liebhard et al. (2003) encontraram três QTL para número de frutos segregando em uma população F_1 de macieira explicando de 3,2 a 10% da variância fenotípica.

Observa-se que várias regiões aqui mapeadas para número de frutos coincidem com as regiões onde foram mapeados QTL para a produção total. É o caso dos QTL nos GL I-06, X-06 e IV-123, cujas posições no mapa se sobrepõem. Essas coincidências na posição dos QTL para essas características podem explicar a alta correlação genética entre as mesmas, conforme visto nas análises fenotípicas ($r_G = 0,87$).

A correlação genética entre duas variáveis pode ser devida a dois mecanismos: como resultado de rotas bioquímicas e regulatórias complexas, um único gene pode afetar várias características, um fenômeno conhecido como pleiotropia; uma segunda causa de correlação

genética é o desequilíbrio de ligação entre genes afetando diferentes características, ou seja, a ligação entre locos (Lynch & Walsch, 1998).

À priori, não é possível afirmar se os QTL mapeados para produção total e número total de frutos são, de fato, os mesmos genes ou genes muito próximos. Um estudo como esse requer a utilização de um número muito grande de progênies e a saturação das regiões onde esses QTL foram detectados com marcadores moleculares. No entanto, quando o modo de ação dos QTL coincidentes é similar, a pleiotropia é uma explicação plausível (Conner et al., 1998). De qualquer maneira, os resultados aqui obtidos, através da análise de correlação, corroboram os resultados do mapeamento de QTL. Conner et al. (1998) estudando o crescimento e o desenvolvimento em macieira verificaram que para várias características que apresentaram forte correlação genética entre elas, também foram mapeados QTL em regiões coincidentes.

O QTL de maior efeito para número total de frutos foi mapeado próximo ao marcador PM08137, o qual também está ligado ao QTL para produção total, sendo um bom candidato para a seleção baseada em marcadores moleculares visando à melhoria dessas características.

Tabela 12 - Localização e efeitos dos QTL mapeados para o caráter número total de frutos utilizando o mapeamento por intervalo composto

Grupo de ligação	Marca mais próxima	Posição ^a	Valor crítico ^b	LOD	Adit ^c	R ²
I – 06	EM091050a	13,83	3,01	7,89	30,74	11,47
III – 06	EM20326a	87,17	3,01	6,47	27,37	7,91
V – 06	EM20135r	11,92	3,01	3,73	19,63	4,55
X – 06	EM021560a	3,01	3,01	6,39	25,88	7,82
I – 123	EM06273r	19,75	3,01	4,07	-35,63	4,69
IV – 123	PM08137r	22,48	3,01	11,07	37,11	16,49
VI – 123	EM09360a	58,90	3,01	4,81	22,22	6,04

^a Posição mais provável do QTL correspondendo ao pico de LOD, estimado pelo QTLCartographer[®]; distância, em cM, da primeira marca do grupo de ligação.

^b Valor crítico genômico, estimado por 1.000 permutações

^c Efeito aditivo do QTL, estimado pelo QTLCartographer[®]

Figura 12 - Gráficos mostrando as curvas de LOD score nos grupos de ligação onde foram mapeados QTL para número total de frutos (NF), em ambos os acessos. São apresentados o valor crítico genômico (linha tracejada) e a posição estimada dos QTL com seus respectivos intervalos de confiança (barra vertical)

QTL para peso médio de frutos (PM)

Para a característica peso médio de frutos foram mapeados quatro QTL, sendo um oriundo do IAPAR-06 e três do IAPAR-123. O menor valor de R^2 foi de 8,4%, para o QTL do GL II-123 e o maior foi de 10,4% para o QTL do GL III-123. Não foram encontrados QTL de grande efeito para esta característica.

Chaim et al. (2001) encontram 5 QTL controlando peso de frutos em pimentão que, em média, explicavam conjuntamente 37% da variância fenotípica. Garcia et al. (2000) comentam sobre a alta correlação entre o peso de frutos e o número de sementes em Citrus. Em maracujá, esta relação pode também ser verdadeira, embora no presente trabalho o número de sementes por fruto não tenha sido avaliado. Wang et al. (2000) detectaram 2 QTL controlando peso de frutos em uma população oriunda do cruzamento de indivíduos heterozigóticos em cereja, explicando 13,7% e 15,5% da variação fenotípica. Grandillo et al. (1999) resumindo uma série de trabalhos relacionados ao mapeamento de QTL para características de fruto em tomate, relatam que um conjunto de 28 QTL, controlando peso de frutos, foi detectado em experimentos utilizando vários tipos de população. Estes QTL foram classificados quanto à magnitude de seus efeitos, sendo que 22% dos QTL explicavam mais de 20% da variância fenotípica e, um destes QTL, denominado de *fw2.2*, teve seus alelos identificados e clonados (Frary et al., 2000).

Tabela 13 - Localização e efeitos dos QTL mapeados para o caráter peso médio de frutos utilizando o mapeamento por intervalo composto

Grupo de ligação	Marca mais próxima	Posição ^a	Valor crítico ^b	LOD	Adit ^c	R^2
IX – 06	EM17190r	9,01	2,72	3,32	11,29	9,45
II – 123	EM1392a	0,01	2,72	3,21	10,75	8,43
III – 123	EM04138a	27,02	2,72	3,96	14,94	10,38
IX – 123	EM08395r	92,69	2,72	3,63	-11,20	9,78

^a Posição mais provável do QTL correspondendo ao pico de LOD, estimado pelo QTLCartographer[®]; distância, em cM, da primeira marca do grupo de ligação.

^b Valor crítico genômico, estimado por 1.000 permutações

^c Efeito aditivo do QTL, estimado pelo QTLCartographer[®]

Figura 13 - Gráficos mostrando as curvas de LOD *score* nos grupos de ligação onde foram mapeados QTL para peso médio de frutos (PM), em ambos os acessos. São apresentados o valor crítico genômico (linha tracejada) e a posição estimada dos QTL com seus respectivos intervalos de confiança (barra vertical)

QTL para comprimento médio de frutos (CM)

Um total de cinco QTL foi mapeado conferindo variação no comprimento médio de frutos (Figura 14 e Tabela 14). Esses QTL foram identificados nos GL I-06, IX-06, IV-123, VII-123 e VIII-123. A proporção da variação fenotípica explicada pelos QTL individualmente variou de 6,1% a 13,6%. O QTL mapeado no GL IX-06 foi o que apresentou o maior efeito, sendo que a presença desse QTL conferiu um acréscimo de 5,91 cm no comprimento dos frutos.

O QTL do GL I-06 apresentou um intervalo de confiança compreendendo o grupo de ligação inteiro. É de conhecimento dos pesquisadores que alguns QTL podem ter intervalos de confiança grandes, o que dificulta a detecção de mais de três QTL por grupo de ligação (Asins, 2002). A precisão das estimativas da posição do QTL é influenciada principalmente pela herdabilidade do caráter e pelo tamanho da população analisada. No presente estudo, a herdabilidade para esta característica foi relativamente alta (83%), sendo o número de indivíduos o fator limitante. O valor da estatística LOD neste QTL está próximo ao valor crítico genômico, podendo ser este um falso positivo, no entanto, o teste de marcas simples detectou vários locos deste GL associados com este caractere, o que sugere, de fato, a presença do QTL.

Chaim et al. (2001) identificaram quatro QTL responsáveis pela variação no comprimento de frutos em pimentão, que em conjunto explicavam 52% da variabilidade fenotípica total.

Tabela 14 - Localização e efeitos dos QTL mapeados para comprimento médio de frutos utilizando o mapeamento por intervalo composto

Grupo de ligação	Marca mais próxima	Posição ^a	Valor crítico ^b	LOD	Adit ^c	R ²
I – 06	EM02110a	1,01	2,63	2,78	0,2094	6,09
IX – 06	EM17190r	10,01	2,63	5,91	0,3201	13,55
IV – 123	EM16260a	14,91	2,63	3,42	0,2365	7,52
VII – 123	EM10300a	0,01	2,63	3,51	-0,2315	7,38
VIII – 123	PM07222a	1,01	2,63	3,68	-0,2467	8,20

^a Posição mais provável do QTL correspondendo ao pico de LOD, estimado pelo QTLCartographer[®]; distância, em cM, da primeira marca do grupo de ligação.

^b Valor crítico genômico, estimado por 1.000 permutações

^c Efeito aditivo do QTL, estimado pelo QTLCartographer[®]

Figura 14 - Gráficos mostrando as curvas de LOD *score* nos grupos de ligação onde foram mapeados QTL para comprimento médio de frutos (CM), em ambos os acessos. São apresentados o valor crítico genômico (linha tracejada) e a posição estimada dos QTL com seus respectivos intervalos de confiança (barra vertical)

QTL para largura média de frutos (LM)

Para a característica largura média de frutos, um total de quatro QTL foi mapeado (Figura 15 e Tabela 15). Desses, o QTL mapeado no GL IX-06 foi responsável por 14,3% da variação fenotípica para a característica. O QTL de menor efeito foi mapeado no GL I-06, explicando 6,4% da variação fenotípica. Este QTL, mapeado na mesma região do QTL para comprimento médio de frutos, também apresentou um intervalo de confiança compreendendo o GL inteiro.

O GL IX-06 apresentou QTL importantes tanto para a largura média de frutos como para peso médio e comprimento médio de frutos. Visto que este grupo é formado por apenas dois marcadores, seria necessária a inclusão de novas marcas para uma melhor compreensão dos QTL ali detectados.

Chaim et al. (2001) detectaram quatro QTL para a largura de frutos em pimentão. Estes QTL foram detectados em dois anos de avaliação e um destes apresentou um grande efeito no fenótipo (R^2 de 42%).

Tabela 15 - Localização e efeitos dos QTL mapeados para largura média de frutos utilizando o mapeamento por intervalo composto

Grupo de ligação	Marca mais próxima	Posição ^a	Valor crítico ^b	LOD	Adit ^c	R^2
I – 06	EM19226r	6,32	2,75	2,79	0,1496	6,36
VII – 06	EM13275r	0,01	2,75	4,08	0,1934	9,65
IX – 06	EM16397a	4,01	2,75	5,44	0,2178	14,26
VIII – 123	PM07222a	1,01	2,75	5,10	-0,2195	13,17

^a Posição mais provável do QTL correspondendo ao pico de LOD, estimado pelo QTLCartographer[®]; distância, em cM, da primeira marca do grupo de ligação.

^b Valor crítico do grupo de ligação, estimado por 1.000 permutações

^c Efeito aditivo do QTL, estimado pelo QTLCartographer[®]

Figura 15 - Gráficos mostrando as curvas de LOD *score* nos grupos de ligação onde foram mapeados QTL para largura média de frutos (LM), em ambos os acessos. São apresentados o valor crítico genômico (linha tracejada) e a posição estimada dos QTL com seus respectivos intervalos de confiança (barra vertical)

QTL para porcentagem de polpa (PP)

Quatro QTL foram mapeados conferindo variação na porcentagem de polpa na população (Figura 16 e Tabela 16). A proporção da variação fenotípica explicada pelos QTL individualmente variou de 6,6% a 11,6%. Para o QTL do genitor IAPAR-06, os alelos foram responsáveis pela diminuição da porcentagem de polpa em 3,1%. O único alelo de efeito aditivo positivo foi encontrado para o QTL do GL VI-123, contribuindo para um aumento de 2,31% na porcentagem de polpa.

Tabela 16 - Localização e efeitos dos QTL mapeados para porcentagem de polpa utilizando o mapeamento por intervalo composto

Grupo de ligação	Marca mais próxima	Posição ^a	Valor crítico ^b	LOD	Adit ^c	R ²
II – 06	EM11278a	108,14	2,87	4,51	-3,05	11,55
I – 123	EM01525a	12,01	2,87	2,88	-2,15	6,56
VI – 123	PM06264r	0,01	2,87	3,66	2,31	7,03
VII – 123	EM10330a	4,01	2,87	3,19	-2,26	7,22

^a Posição mais provável do QTL correspondendo ao pico de LOD, estimado pelo QTLCartographer[®]; distância, em cM, da primeira marca do grupo de ligação.

^b Valor crítico genômico, estimado por 1.000 permutações

^c Efeito aditivo do QTL, estimado pelo QTLCartographer[®]

Figura 16 - Gráficos mostrando as curvas de LOD *score* nos grupos de ligação onde foram mapeados QTL para porcentagem de polpa (PP), em ambos os acessos. São apresentados o valor crítico genômico (linha tracejada) e a posição estimada dos QTL com seus respectivos intervalos de confiança (barra vertical)

QTL para teor de sólidos solúveis totais (SS)

Apesar do acesso IAPAR-06 não ter passado por uma seleção para aumento do teor de sólidos solúveis, como aconteceu com o outro genitor, alelos favoráveis para esta característica foram encontrados. É o caso do QTL detectado no GL VIII-06 (Figura 17 e Tabela 17). Outros quatro QTL foram mapeados nos GL II-123, VI-123, VIII-123 e IX-123. No mapa do acesso IAPAR-06, o QTL do GL IV-06 apresentou um efeito aditivo negativo, sendo responsável pela diminuição de 0,41°Brix no teor de sólidos solúveis. Foram encontrados também QTL de efeito negativo no mapa do outro acesso nos GL II-123, VI-123 e VIII-123, sendo esse último responsável pela diminuição de 0,52°Brix.

QTL de efeitos opostos dos esperados com base no fenótipo dos genitores têm sido identificados. Em arroz, Li et al. (1995) identificaram alelos contribuindo para a altura de plantas no genitor de menor porte. Também em arroz, Monna et al. (2002) identificaram alelos contribuindo para florescimento precoce no genitor de ciclo tardio. Estas observações ajudam a explicar a segregação transgressiva observada em vários estudos (Yano & Sasaki, 1997), onde os alelos dos genitores se combinam gerando indivíduos mais extremos que os pais. No presente trabalho, não se têm informações precisas dos genitores, pois somente o genitor IAPAR-06 foi avaliado em campo. No entanto, sabe-se que o outro genitor é parte de uma população na qual seleção foi aplicada para produção e características industriais do suco.

O teor de sólidos solúveis de frutos tem sido bastante estudado em tomate. Um QTL denominado de *Brix9-2-5*, mapeado em um segmento de 9 cM do cromossomo 9, foi caracterizado e clonado e corresponde a uma região que codifica a enzima invertase apoplástica (*Lin5*), expressa exclusivamente em flores e frutos (Fridman et al. 2000).

Tabela 17 - Localização e efeitos dos QTL mapeados para teor de sólidos solúveis totais utilizando o mapeamento por intervalo composto

Grupo de ligação	Marca mais próxima	Posição ^a	Valor crítico ^b	LOD	Adit ^c	R ²
IV - 06	EM22394a	0,01	2,83	3,74	-0,4064	8,27
VIII - 06	EM22110r	37,27	2,83	3,09	0,3495	6,66
II - 123	EM2296r	40,25	2,83	5,95	-0,4286	10,54
II - 123	EM16308r	61,76	2,83	6,88	-0,4557	11,78
VI - 123	EM19531r	51,23	2,83	3,06	-0,3540	6,53
VIII - 123	PM07222a	0,01	2,83	5,61	-0,5205	12,72
IX - 123	PM10129a	55,10	2,83	4,03	0,3886	8,78

^a Posição mais provável do QTL correspondendo ao pico de LOD, estimado pelo QTLCartographer[®]; distância, em cM, da primeira marca do grupo de ligação.

^b Valor crítico genômico, estimado por 1.000 permutações

^c Efeito aditivo do QTL, estimado pelo QTLCartographer[®]

Figura 17 - Gráficos mostrando as curvas de LOD *score* nos grupos de ligação onde foram mapeados QTL para teor de sólidos solúveis (SS), em ambos os acessos. São apresentados o valor crítico genômico (linha tracejada) e a posição estimada dos QTL com seus respectivos intervalos de confiança (barra vertical)

QTL para formato médio de frutos (FM)

Quatro QTL foram identificados para formato médio de frutos nos grupos II-123, IV-123, VII-123 e IX-123 (Figura 18 e Tabela 18). QTL de grande efeito foram mapeados, explicando até 21% da variação fenotípica. Nenhum QTL foi identificado no mapa do outro acesso.

Os QTL de maior efeito no formato de frutos foram mapeados em regiões coincidentes com QTL para comprimento de frutos, corroborando os resultados da análise de correlação entre estas duas características. Esta relação é esperada, visto que o formato é avaliado pelo quociente entre o comprimento e a largura dos frutos.

QTL influenciando o formato de frutos em tomate têm sido mapeados por marcadores moleculares em vários experimentos. O número estimado de QTL para formato de frutos detectado nesses estudos variou de 2 a 16, tendo sido encontrados QTL de grande efeito (Grandillo et al. 1999). Um desses QTL, denominado de *fs8.1*, foi posteriormente caracterizado, tendo influência também no comprimento e peso de frutos (Ku et al., 2000).

Tabela 18 - Localização e efeitos dos QTL mapeados para o caráter formato médio de frutos utilizando o mapeamento por intervalo composto

Grupo de ligação	Marca mais próxima	Posição ^a	Valor crítico ^b	LOD	Adit ^c	R ²
II - 123	EM2296r	41,25	2,54	4,82	-0,0331	13,77
IV - 123	PM08137r	21,48	2,54	9,49	0,0421	20,12
VII - 123	EM10300a	0,01	2,54	7,02	-0,0441	21,81
IX - 123	EM16406a	4,01	2,54	2,82	-0,0287	9,20

^a Posição mais provável do QTL correspondendo ao pico de LOD, estimado pelo QTLCartographer[®]; distância, em cM, da primeira marca do grupo de ligação.

^c Valor crítico genômico, estimado por 1.000 permutações

^d Efeito aditivo do QTL, estimado pelo QTLCartographer[®]

Figura 18 - Gráficos mostrando as curvas de LOD *score* nos grupos de ligação onde foram mapeados QTL para formato médio de frutos (FM), em ambos os acessos. São apresentados o valor crítico genômico (linha tracejada) e a posição estimada dos QTL com seus respectivos intervalos de confiança (barra vertical)

2.3.6.3 Análise dos QTL

O poder de detecção de um QTL é função do tamanho da população e da herdabilidade do carácter (Lande & Thompson, 1990). A literatura sugere que quando 10 QTL não ligados controlam uma característica com uma herdabilidade de 0,30, uma população F_2 de 100 indivíduos leva a um poder de detecção de QTL de 0,12. Isto quer dizer que, aproximadamente, um entre 10 QTL é detectado. Aumentando-se o tamanho da população para 500 indivíduos, o poder de detecção chega a 0,57 (Beavis, 1994). No presente estudo, o poder de detecção de QTL pode ter sido limitado pelo pequeno tamanho da população de mapeamento (97 indivíduos), mas, por outro lado, houve um aumento no poder pelas altas herdabilidades dos caracteres estudados.

A análise de QTL pela estratégia “pseudocruzamento teste” mostra diferenças em relação aos delineamentos obtidos a partir de linhagens endogâmicas, tanto na capacidade de detectar QTL como nas estimativas de seus efeitos. Enquanto neste último delineamento segregam dois alelos no QTL, no esquema “pseudocruzamento teste” podem segregar até quatro alelos. O valor quantitativo de genótipos alternativos dos marcadores é medido como o efeito de uma substituição alélica sobre a média dos dois possíveis alelos alternativos oriundos do outro genitor. Por exemplo, se o genótipo de um QTL de um genitor for Q_1Q_2 , e do outro genitor for Q_3Q_4 , a análise de QTL essencialmente testa a diferença entre o valor médio fenotípico de $(Q_1Q_3 + Q_1Q_4)$ versus $(Q_2Q_3 + Q_2Q_4)$ no primeiro genitor e de $(Q_3Q_1 + Q_3Q_2)$ versus $(Q_4Q_1 + Q_4Q_2)$ no segundo genitor (Grattapaglia et al., 1995).

A utilização de marcadores dominantes de segregação 3:1 no “pseudocruzamento teste” apresenta um maior viés do que a utilização de apenas marcas 1:1. Marcadores bi-parentais são menos informativos porque a presença de uma banda no gel representa a mistura de três genótipos que não podem ser distinguidos entre si: ++, +- e -+. Considerando um alelo nulo ligado a Q_2 e a Q_4 , a análise testa a diferença entre as médias fenotípicas de Q_2Q_4 contra $(Q_1Q_3 + Q_1Q_4 + Q_2Q_3)$ (Conner et al., 1998). No presente estudo, o mapeamento de QTL foi feito somente com marcadores monoparentais, o que garantiu às análises um maior rigor estatístico. As marcas 3:1 foram utilizadas como acessórias somente para possibilitar a integração e alinhamento de grupos de ligação homólogos. Aproximadamente 1/3 das marcas eram locos bi-parentais.

Devido à natureza genética das plantas heterozigóticas utilizadas nessa estratégia, nenhuma informação genética é conhecida *a priori* sobre o genótipo dos genitores e não é

possível nenhuma construção de genótipos dos QTL. Assim, os únicos QTL que podem ser potencialmente detectados são aqueles que, por acaso, encontram-se em heterozigose nos genitores do cruzamento e para os quais o efeito diferencial entre alelos alternativos dos QTL seja relativamente grande para permitir detecção estatística com o tamanho amostral disponível. Além disso, nenhuma interação intraloco específica pode ser levada em consideração e nenhuma classificação (*ranking*) de alelos por magnitude de efeito de substituição pode ser realizada. Portanto, há um maior “ruído” genético na detecção de QTL por essa abordagem (Grattapaglia et al., 1995).

Apesar dessas limitações, foi possível mapear várias regiões controlando caracteres de produção e qualidade de frutos em maracujazeiro. Esse é o primeiro relato deste tipo de estudo em *Passiflora*.

Um resumo dos QTL mapeados nos mapas genéticos de ambos os acessos é apresentado nas Figuras 19 a 21. Um total de 41 QTL foi identificado para as características avaliadas. Destes, 90% eram QTL de efeitos pequenos a moderados, explicando até 15% da variação fenotípica. QTL de grande efeito foram detectados para produção total (R^2 : 15,02%), número total de frutos (R^2 : 16,49%) e para formato médio de frutos (R^2 : 21,81 e 20,12%). Para os outros caracteres, não foram encontrados QTL de grande efeito.

De maneira similar ao que tem sido publicado em outras espécies (Kearsey & Farqhar, 1998; Bernardo, 2002), a magnitude dos efeitos dos QTL aqui detectados apresentou uma grande variação para uma mesma característica. No entanto, as estimativas da variância fenotípica (V_p) explicada pelos QTL devem ser vistas com cautela. Segundo Bernardo (2002), a utilização de populações pequenas na análise de QTL leva, além de um menor poder de detecção, a uma superestimação dos efeitos dos QTL. Beavis (1994) analisou o efeito do tamanho da população nas estimativas da V_p explicada pelos QTL. Quando 10 QTL controlam um caráter, com uma herdabilidade de 0,63, cada um dos 10 QTL correspondem à 6,3% da V_p . Comparando-se com o verdadeiro valor de 6,3%, a estimativa da proporção média da V_p , devido a cada QTL, aumentou de 6,3% quando se tinha uma população F_2 de 1.000 indivíduos, para 12,7% quando a população era de 100 indivíduos. Segundo o autor, para um mesmo tamanho de população, o viés aumenta com um número maior de QTL.

O conjunto dos QTL identificado neste trabalho para cada característica, individualmente, explicou de 32,4 a 64,9% da variação fenotípica, com uma média de 51,0%.

Wang et al. (2000), mapeando QTL para características de flor e frutos em cereja (*Prunus cerasus* L.), e utilizando o delineamento “pseudocruzamento teste”, encontraram QTL que, em conjunto, explicavam de 17,0 a 47,4% da variância fenotípica. Grandillo & Tanksley (1996), analisando QTL para características hortícolas em tomate, verificaram uma ação cumulativa de 12 a 59% da variação fenotípica dos QTL identificados. A grande proporção da variação fenotípica explicada pelo conjunto dos QTL identificados para cada característica no presente estudo é encorajadora, haja vista as limitações intrínsecas à abordagem de mapeamento utilizada. A variação fenotípica não explicada pelos QTL detectados pode ser devido à: a) QTL em regiões não mapeadas no genoma; b) QTL de efeito muito pequeno que não foram detectados; c) efeitos epistáticos entre QTL; d) QTL que estão em homozigose no mesmo genitor.

O fato de terem sido identificados QTL conferindo variação para um mesmo caráter em GL homólogos não necessariamente sugerem que sejam os mesmos QTL. Assim, por exemplo, no GL I foram mapeados QTL para número total de frutos em ambos os genitores. Isto também aconteceu para o GL IV com QTL para produção total e para o GL VIII com QTL para teor de sólidos solúveis. A situação contrária é bem mais comum, ou seja, QTL conferindo variação em um caráter, mapeado somente em um homólogo. Conforme dito anteriormente, no “pseudocruzamento teste” a detecção de QTL só é possível se os alelos desse QTL em um genitor estiverem em heterozigose. Como os genitores são plantas de diferentes origens, diferentes configurações alélicas para os QTL podem ser encontradas entre eles, fazendo com que certos locos sejam detectados em um genitor e não no outro, e vice-versa.

QTL controlando várias características foram mapeados em regiões coincidentes nos grupos de ligação. No grupo I-06, os QTL para produção total, número total de frutos, comprimento e largura de frutos foram mapeados em regiões muito próximas. No mapa do acesso IAPAR-123, o grupo IV teve QTL mapeados em regiões coincidentes para produção total, número total de frutos, comprimento médio de frutos e formato de frutos. No grupo II os QTL para produção total, teor de sólidos solúveis e formato médio de frutos foram mapeados nas mesmas regiões, assim como os QTL para comprimento de frutos, porcentagem de polpa e formato médio de frutos no grupo VII.

Estudos de mapeamento de QTL, em outras espécies, têm detectado regiões no genoma que parecem conter haplótipos de QTL (Edwards et al., 1987; Fulton et al., 1997). Em tomate, por exemplo, uma região de 25 cM do cromossomo 1 contém QTL para várias características

relacionadas à qualidade de frutos (Fulton et al., 1997). Em cereja, Wang et al. (2000) mapearam QTL afetando período de florescimento, porcentagem de germinação do pólen e mortalidade de pistilos em uma região de 10,8 cM do mesmo grupo de ligação.

Alguns QTL apresentaram intervalos de confiança compreendendo o grupo de ligação inteiro. Os QTL para comprimento médio de frutos e largura média de frutos, no GL I-06, devem ser melhor estudados, visto que suas posições não foram estimadas com precisão. Os grupos formados por apenas dois marcadores também apresentaram esse comportamento, por exemplo, no GL X-06, que apresentou QTL relacionados à produção total e número de frutos total e no GL VII-123, que apresentou QTL conferindo variação na porcentagem de polpa e comprimento médio de frutos. Apenas o QTL relacionado ao formato médio de frutos apresentou uma posição mais precisa nesse último GL. Assim, populações maiores e genotipadas para um maior número de marcas seriam necessárias para uma melhor precisão nas estimativas das posições dos QTL.

O aumento no número de marcas utilizadas seria melhor aproveitado somente se um maior número de indivíduos fosse genotipado. Com o aumento do número de indivíduos, marcas antes alocadas como acessórias poderiam ser incluídas no *framework*, aumentando assim a quantidade de informação útil para o mapeamento de QTL.

Figura 19 – Posições dos QTL mapeados nos GL dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123 para os caracteres produção total (PT), número total de frutos (NF), peso médio de frutos (PM), comprimento médio (CM), largura média (LM), porcentagem de polpa (PP), teor de sólidos solúveis (SS) e formato médio de frutos (FM). As barras correspondem aos intervalos de confiança da posição dos QTL

Figura 20 – Posições dos QTL mapeados nos GL dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123 para os caracteres produção total (PT), número total de frutos (NF), peso médio de frutos (PM), comprimento médio (CM), largura média (LM), porcentagem de polpa (PP), teor de sólidos solúveis (SS) e formato médio de frutos (FM). As barras correspondem aos intervalos de confiança da posição dos QTL

Figura 21 – Posições dos QTL mapeados nos GL dos acessos IAPAR-06 e IAPAR-123 para os caracteres produção total (PT), número total de frutos (NF), peso médio de frutos (PM), comprimento médio (CM), largura média (LM), porcentagem de polpa (PP), teor de sólidos solúveis (SS) e formato médio de frutos (FM). As barras correspondem aos intervalos de confiança da posição dos QTL

2.3.6.4 Perspectivas

A habilidade de se mapear QTL em população segregante de maracujá-amarelo foi confirmada no presente estudo. Mapas genéticos mais densos e a disponibilidade de marcadores codominantes, multialélicos e transportáveis, tipo os SSR, representariam uma melhora na habilidade de conduzir mapeamento de ligação e análise de QTL na espécie. Também, a avaliação de populações maiores em outros locais e em vários anos poderia confirmar a presença desses QTL ou detectar novos QTL, estimar seus efeitos e posições com uma maior precisão e assim explorar de maneira segura essas informações.

Para que seja possível implementar um programa de seleção assistida por marcadores que aumente a eficiência dos métodos de seleção convencionais, deve-se dispor de marcadores fortemente ligados com genes de interesse e que tenham efeito relativamente pronunciado na expressão fenotípica, além de serem estáveis nos ambientes e épocas de plantio. Além disso, eles devem ser práticos do ponto de vista de manipulação em laboratório e de baixo custo para permitir a avaliação de um grande número de plantas.

O maracujá é uma planta alógama obrigatória e apresenta alto nível de heterozigose e, a exemplo de outras espécies, as principais características de interesse são quantitativas. Assim, grandes populações são necessárias para obter genótipos que concentrem alelos favoráveis a múltiplas características. Por ser uma cultura semi-perene, com período de produção prolongado, exigir grande área experimental e intensos tratos culturais, os experimentos apresentam dificuldades práticas de avaliação e um custo relativamente elevado, fatores que dificultam o uso de grandes populações experimentais de melhoramento. A partir das informações adquiridas com o mapeamento de QTL será possível selecionar ainda na fase de viveiro os materiais mais promissores os quais seriam multiplicados e levados ao campo, aumentando a eficiência dos programas de melhoramento do maracujazeiro e reduzindo a área, o tempo e, conseqüentemente o custo dos experimentos.

As informações obtidas no presente trabalho devem ser vistas como um estudo preliminar de mapeamento de QTL e suas aplicações. Apesar de terem sido obtidas informações relevantes a respeito de caracteres de produção e qualidade de frutos para a cultura, algumas considerações devem ser feitas. A associação de marcador a um QTL, detectado em determinado cruzamento, pode não ser o melhor alelo que existe na população de melhoramento, pois outros alelos de

efeito igual ou até melhor provavelmente existam. Como o processo de domesticação de populações de maracujazeiro é extremamente recente, há uma grande variabilidade alélica ainda presente nos acessos cultivados a ser explorada. Portanto, a seleção assistida por marcadores dependerá da capacidade de se descobrir, mapear e medir a magnitude dos QTL de maior efeito em populações de melhoramento.

Por fim, cabe salientar que as informações obtidas com o presente trabalho são inéditas para a espécie e deverão fornecer subsídios para futuros trabalhos de melhoramento de maracujazeiro visando obter populações mais produtivas e com maior qualidade de frutos.

3 CONCLUSÕES

A população oriunda do cruzamento de duas plantas dos acessos de maracujá-amarelo IAPAR-06 e IAPAR-123 apresenta ampla variabilidade genética que pode ser explorada para a seleção dos melhores clones;

Marcadores dominantes bi-parentais podem ser utilizados na construção de mapas de ligação para o estabelecimento de homologia entre os grupos dos genitores;

É possível mapear QTL para características de importância agronômica em maracujazeiro-amarelo utilizando a abordagem do “duplo pseudocruzamento teste”, utilizando mapeamento por intervalo composto;

Ambos os acessos avaliados (IAPAR-06 e IAPAR-123) possuem QTL favoráveis para características de produção e qualidade de frutos.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, D.R.D.; SANTOS, C.C.F. Importância econômica e mercado. In: BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. (Ed.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 9-31.

AKAMINE, E.K.; G. GIROLAMI. Polination and fruit set in the yellow passion fruit. University of Hawaii. Agricultural Experiment Station, **Technical Bulletin**, Honolulu, n.39, 44 p. 1959.

ALBUQUERQUE, A.S. **Seleção de genitores e híbridos em maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims)**. 2001. 90p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2001.

ALMEIDA, L.P. de; BOARETO, M.A.C.; SANTANA, R.G. de; NASCIMENTO, G.M.; SOUZA, P.J.; SÃO JOSÉ, A.R. Estaquia e comportamento de maracujazeiros (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) propagados por vias sexual e vegetativa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.13, n.1, p.153-156, 1991.

ALONSO-BLANCO, C.; PEETERS, A.J.M.; KOORNNEEF, M.; LISTER, C.; DEAN, C.; VAN DEN BOSH, N.; POT, J.; KUIPER, M.T.R. Development of an AFLP based linkage map of Ler, Col and Cvi *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a Ler/Cvi recombinant inbred line population. **Plant Journal**, Gainesville, v.14, p.259-271, 1998.

ASINS, M.J. Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. **Plant Breeding**, Berlin, v.121, p.281-291, 2002.

BAILEY, N.T.J. **Introduction to the mathematical theory of genetic linkage**. London: Oxford University Press, 1961. 298 p.

BARBIN, D. **Componentes de variância**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento de Matemática e Estatística, 1993. 108p.

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

BASTEN, C.J.; WEIR, B.S.; ZENG, Z-B. Zmap—a QTL cartographer. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION: COMPUTING STRATEGIES AND SOFTWARE, SMITH, C.; GAVORA, J.S.; BENKEL, B.; CHESNAIS, J.; FAIRFULL, W.; GIBSON, J.P.; KENNEDY, B.W.; BURNSIDE, E.B. (Ed.). 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Guelph, Ontario, Canada, 1994, v.22, p.65-66.

BASTEN, C.J.; WEIR, B.S.; ZENG, Z-B. **QTL Cartographer, Version 1.17**. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. 2004.

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

BEAVIS, W.D. The power and deceit of QTL experiments: Lessons from comparative QTL studies. **Proceedings of Corn and Sorghum Industry Research Conference**, Beltsville, v.49, p.250-266, 1994.

BEAVIS, W.D.; GRANT, D.; ALBERTSEN, M.; FINCHER, R. Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their associations with qualitative genetic loci. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.83, p.141-145, 1991.

BECKER, J.; VOS, P.; KUIPER, M.; SALAMINI, F.; HEUN, M. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.259, p.65-73, 1995.

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

BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Woodbury, Minnesota: Stemma Press, 2002. 369p.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.32, p. 314-331, 1980.

BROMAN, K.W. Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. **Lab Animal**, New York, v.30, n.7, p.44-52, 2001.

BRUCKNER, C.H. Técnicas e perspectivas do melhoramento do maracujazeiro. (compact disc). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., Campos dos Goytacazes, 2003. **Palestras**. Campos dos Goytacazes: Cluster Informática, 2003.

BRUCKNER, C.H.; MELETTI, L.M.M.; OTONI, W.C.; ZERBINI JUNIOR, F.M. Maracujazeiro. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, 2002. 422 p.

BRUCKNER, C.H.; CASALI, V.W.D.; MORAES, C.F. de; REGAZZI, A.J.; SILVA, E.A.M. da. Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Acta Horticulturae**, Bélgica, n. 370, p.45-57, 1995.

BUETOW, K.H.; CHAKRAVARTI, A. Multipoint gene mapping using seriation. I. General methods. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.41, p.180-188, 1987.

CARNEIRO, M.S. **Mapas de ligação de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. 2001. 92p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2001.

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.; VENCovsky, R.; LEITE JÚNIOR, R.P.; STENZEL, N.M.C.; VIEIRA, M.L.C. RAPD-based genetic linkage maps of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). **Genome**, Ottawa, v.45, n.4, p.670-678, 2002.

CASASOLI, M.; MATTIONI, C.; CHERUBINI, M.; VILLANI, F. A genetic linkage map of European chesnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.102, p.1190-1199, 2001.

CERVERA, M-T; STORME, V.; IVENS, B.; GUSMÃO, J.; LIU, B.H.; HOSTYN, V.; SLYCKEN, J.V.; MONTAGU, M.V.; BOERJAN, W. Dense genetic Linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. **Genetics**, Bethesda, v.158, p.787-9-809, 2001.

CHAIM, A.B.; PARAN, I.; GRUBE, R.C.; JAHN, M.; van WIJK, R.; PELEMAN, J. QTL mapping of fruit-related traits in pepper (*Capsicum annum*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.102, p.1016-1028, 2001.

CHAN JUNIOR, H.; KWOK, S. Identification and determination of sugar in some tropical fruit products. **Journal of Food Science**, Chicago, n.40, p.419-420, 1975.

CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, Bethesda, v.138, p.963-971, 1994.

COELHO, A.S.G. Considerações gerais sobre a análise de QTL. In: PINHEIRO, J.B.; CARNEIRO, I.F. (Ed.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000, p.1-20.

COELHO, A.S.G. TreeMap - *Software* para construção de mapas genéticos em cruzamentos derivados de genótipos não-endogâmicos. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO, 2005.

COELHO, A.S.G.; SILVA, H.D. **Construção de mapas genéticos e mapeamento de QTL's**. Piracicaba, 2002. 65 p. (apostila).

CONNELLY, P.M.; EDWARDS, J.H.; KIDD, K.K.; LALOUEL, J.-M.; MORTON, N.E.; OTT, J.; WHITE, R. Report of the committee on methods of linkage analysis and reporting. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v.40, p.356-359, 1985.

CONNER, P.J.; BROWN, S.K.; WEEDEN, N.F. Molecular marker analysis of quantitative traits for growth and development in juvenile apple trees. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.96, p.1027-1035, 1998.

CRESPEL, L.; CHIROLLET, M.; DUREL, C.E.; ZHANG, D.; MEYNET, J.; GUDIN, S. Mapping of qualitative and quantitative phenotypic traits in *Rosa* using AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.105, p.1207-1214, 2002.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.19, p.299 – 306, 2001.

CROUZILLAT, D.; MENARD, B.; MORA, A.; PHILLIPS, W.; PETIARD, V. Quantitative trait analysis in *Theobroma cacao* using molecular markers. **Euphytica**, Wageningen, v.114, p.13-23, 2000.

CROUZILLAT, D.; LERCETAU, E.; PETIARD, V.; MORERA, J.; RODRIGUEZ, H.; WALKER, D.; PHILLIPS, W.; RONNING, C.; SCHNELL, R.; OSEI, J.; FRITZ, P. *Theobroma cacao* L.: a genetic linkage map and quantitative trait loci analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.93, n.1/2, p.205-214, 1996.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1997. 390 p.

CUNHA, M.A.P. Recursos genéticos e modificações em métodos de seleção para produtividade em maracujá. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.18, n.3, p. 423, 1996.

CUNHA, M.A.P. Banco ativo de germoplasma de maracujá. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, 2., Londrina, 1999. **Anais**, Londrina: IAPAR/SBF, 1999. p.72-73.

DARVASI, A.; WEINREB, A.; MINKE, V.; WELLER, J.I.; SOLLER, M. Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. **Genetics**, Bethesda, v.134, p.943-951, 1993.

D'EECKENBRUGGE, G.C. Exploração da diversidade genética das passifloras (compact disc). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., Campos dos Goytacazes, 2003. **Palestras**. Campos dos Goytacazes: Cluster Informática, 2003.

DEBENER, T.; MATTIESCH, L. Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.99, p.891-899, 1999.

DOERGE, R.W.; ZENG, Z-B; WEIR, B.S. Statistical issues in the search for genes affecting quantitative traits in experimental populations. **Statistical Science**, Beachwood, v.12, p.195-219, 1997.

DORNELAS, M.C.; TAVARES, F.C.A.; OLIVEIRA, J.C. de. VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* spp. **Plant Cell Reports**, Berlim, v. 15, p. 106-110, 1995.

DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 3. ed. New York: John Wiley, 1998. 706p.

EISENHART, C. The assumptions underlying the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v.3, n.1, p.1-21, 1947.

EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. 1. Number, genomic distribution and types of gene action. **Genetics**, Bethesda, v.116, p.113-125, 1987.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. New York: Longman Scientific & Technical, 1996. 464p.

FERNANDES, A.A.; REGO, M.M.; BRUCKNER, C.H.; PEREIRA, K.J.C.; RANGEL, A.R.P. Comparação entre técnicas de autofecundação em maracujazeiro *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14., Curitiba, 1996. **Anais**, Londrina: IAPAR, 1996. p. 334.

FERREIRA, F.R. Germoplasma de *Passiflora* no Brasil. In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.). **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1994. p. 24 – 26.

FERREIRA, F.R. Recursos genéticos e germoplasma de maracujá (*Passiflora* spp). In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, 3., Viçosa, 2002. **Anais**, Viçosa: UFV/SBF, 2002. p. 63-66.

FERREIRA, F.R.; OLIVEIRA, J.C. Germoplasma de *Passiflora*. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. (Ed.). **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p. 61 – 77.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEM, 1998. 220p.

FISHER, R.A. The correlations between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. **Transactions of the Royal Society of Edinburg**, Edinburg, v.52, p. 399-433, 1918.

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

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Maracujá. **Agrianual 2004**: Anuário da agricultura brasileira. p. 359-365. São Paulo, 2004.

FRIDMAN, E.; PLEBAN, T. ZAMIR, D. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. **Proceedings of the National Academy Science**, Washington, v.97, n.9, p.4718-4723, 2000.

FULTON, T.M.; BECK-BUNN, T.; EMMATTY, D.; ESHED, Y.; LOPEZ, J.; PETIARD, V.; UHLLIG, J.; ZAMIR, D.; TANKSLEY, S.D. QTL analysis of an advanced backcross of *Lycopersicon peruvianum* to the cultivated tomato and comparisons with QTLs found in other wild species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.95, p.881-894, 1997.

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

GARCIA, M.R.; ASINS, M.J.; CARBONELL, E.A. QTL analysis of yield and seed number in *Citrus*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.101, p.487-493, 2000.

GEBHARDT, C.; RITTER, E.; DENEGER, T. SCHACHTSCHABEL, U.; WALKEMEIER, B.; UHRIG, H.; SALAMINI, F. RFLP-analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.78, p.65-75, 1989.

GIACOMETTI, D.C.; FERREIRA, F.R. Situação do germoplasma de espécies frutíferas mais importantes no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2., Salvador, 1977. **Anais**, Cruz das Almas: SBF, 1997. p. 421-424.

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. São Paulo: Livraria Nobel, 2000. 477p.

GRANDILLO, S.; TANKSLEY, S.D. QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.92, p.935-951, 1996.

GRANDILLO, S.; KU, H.M.; TANKSLEY, S.D. Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.99, p.978-987, 1999.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies vegetais: *Eucalyptus* como modelo. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES – INGLIS, M.C. (Ed.) **Recursos genéticos & melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. cap. 30, p.967-993.

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

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

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

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

HALDANE, J.B.S. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. **Journal of Genetics**, Londres, v.8, p.299-309, 1919.

HALDANE, J.S.B. The effect of variation on fitness. **American Nature**, Washington, v.71, p.337-349, 1937.

HEMMAT, M.; WEEDEN, N.F.; MANGANARIS, A.G.; LAWSON, D.M. Molecular marker linkage map for apple. **Journal of Heredity**, Washington, v.85, p.4-11, 1994.

HOFFMANN, M. Polinização do maracujá amarelo *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. In: MANICA, I. (Ed.). **Maracujá: Temas selecionados: Melhoramento, morte prematura, polinização, taxionomia**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. p. 58-70.

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

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

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

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

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

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

KAYA, Z.; SEWELL, M.M.; NEALE, D. Identification of quantitative trait loci influencing annual height- and diameter-increment growth in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.98, p.586-592, 1999.

KEARSEY, M.J.; HYNE, V. QTL analysis: a simple 'marker regression' approach. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.90, p.698-702, 1994.

KEARSEY, M.J.; FARQUHAR, A.G.L. QTL analysis in plant; where are we now? **Heredity**, Londres, v.80, p.137-142, 1998.

KEATS, B.J.; SHERMEN, S.L.; MORTON, N.E.; ROBSON, E.B.; BUETOW, K.H.; CANN,, H.M.; CARTWRIGHT, P.E.; CHAKRAVARTI, A.; FRANVKE, U.;GREEN, P.P.; OTT, J. Guideline for human linkage maps: an international system for linkage maps (ISLM, 1990). **Genomics**, Londres, v.9, p.557-560, 1991.

KEIM, P.; SCHUPP, J.M.; TRAVIS, S.E.; CLAYTON, K.; ZHU, T.; SHI, L.; FERREIRA, A.; WEBB, D.M. A high-density soybean genetic map based on AFLP markers. **Crop Science**, Madison, v.37, p.537-543, 1997.

KENIS, K.; KEULEMANS, J. Genetic linkage maps of two apple cultivars (*Malus x domestica* Borkh.) based on AFLP and microsatellite markers. **Molecular Breeding**, Nova York, v.15, p. 205-219, 2005.

KEMPTHORN, O. **An introduction to genetic statistics**. New York: John Wiley, 1966. 545p.

KIRKPATRICK, S.; GELATT, C.D.; VECCHI, M.P. Optimization by simuled annealing. **Science**, Washington, v.220, p.671-680, 1983.

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

KNAPP, S.J. Using molecular markers to map multiple quantitative trait loci: model for backcross, recombinant inbred and double-haploid progeny. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.81, p.333-338, 1991.

KNIGHT JUNIOR, R.J.; WINTERS, H.F. Pollination and fruit set of the yellow passion fruit in southern Florida. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Wallingford, v.75, p. 412-418, 1962.

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

KU, H.-M.; GRANDILLO, S.; TANKSLEY, S.D. *fs8.1*, a major QTL, sets the pattern of tomato carpel shape well before anthesis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.101, p.873-878, 2000.

LANDE, R.; THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics**, Bethesda, v.124, p.743-756, 1990.

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

LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHANSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, E.E.; NEWBURG, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, Londres, v.1, p.174-181, 1987.

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

LEITE, R.A.S.; BLISKA, F.M.M.; GARCIA, A.E.B. Aspectos econômicos da produção e mercado. In: ITAL, **Maracujá**. Campinas: ITAL, 1994. p.154-176.

LERCETEAU, E.; PLOMION, C.; ANDERSSON, B. AFLP mapping and detection of quantitative trait loci (QTL) for economically important traits in *Pinus sylvestris* : a preliminary study. **Molecular Breeding**, Nova York, v.6, p.451-458, 2000.

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

LI, Z.; PINSON, S.R.M.; STANSEL, J.W.; PARK, W.D. Identification of quantitative trait loci (QTLs) for heading date and plant height in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.91, p.374-381, 1995.

LIBERATO, J.R. Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides em maracujá. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; MONTEIRO, A.J.A.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. Viçosa: UFV, 2002, v.2, p. 699-826.

LIEBHARD, R.; KELLERHALS, M.; PFAMMATTER, W.; JERTMINI, M.; GESSLER, C. Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Plant Molecular Biology**, Athens, v.52, p.511-526, 2003.

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

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

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

LEITÃO FILHO, H.F.; ARANHA, C. Botânica do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO DA CULTURA DO MARACUJÁ, 1., Campinas, 1971. **Anais**, Campinas: SBF, 1974. 10p.

LOPES, R. **Mapas de ligação AFLP e identificação de genes de resistência à *Xantomonas campestris* pv. *passiflorae* em maracujá-amarelo**. 2003. 126 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.V.O.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C.; CARNEIRO, M.S. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP): aspectos técnicos e interpretação genética. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 64-68, 2003.

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

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

MALIEPAARD, C.; ALSTON, F.H.; VAN ARKEL, G.; BROWN, L.M.; CHEVREU, E.; DUNEMANN, F.; EVANS, K.M.; GARDINER, S.; GUILFORD, P.; VAN HEUSDEN, A.W.; JANSE, J.; LAURENS, F.; LYNNM J.R.; MANGANARIS, A.G.; DEN NIJS, A.P.M.; PERIAM, N.; RIKKERINK, E.; ROCHE, P.; RYDER, C.; SANSAVINI, S.; SCHIMIDT, H.; TARTARINI, S.; VERHAEGH, J.J.; VRIELING-VAN GINVEL, M.; KING, G.J. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-alelic markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.97, p.60-73, 1998.

MALUF, W.R.; SILVA, J.R.; GRATTAPAGLIA, D.; TOMA-BRAGHINI, M.; CORTE, R.D.; MACHADO, M.A.; CALDAS, L.S. Genetic gains via clonal selection in passion fruit *Passiflora edulis* Sims. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.12, n.4, p. 833-841, 1989.

MANICA, I.; OLIVEIRA JÚNIOR, M.E. Histórico do cultivo do maracujá no Brasil (compact disc). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., Campos dos Goytacazes, 2003. **Palestras**. Campos dos Goytacazes: Cluster Informática, 2003.

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

MARTIN, F.W.; NAKASONE, H.Y. The edible species of *Passiflora*. **Economic Botanic**, Havaí, v. 24, p. 333 – 343, 1970.

MARTINEZ, O.; CURNOW, R.N. Estimation the locations and the sizes of the effects of quantitative trait loci using flanking markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.85, p. 480-488, 1992.

MARTINEZ, O.; CURNOW, R.N. Missing markers when estimating quantitative trait loci using regression mapping. **Heredity**, Londres, v.73, p.198-206, 1994.

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

MELETTI, L.M.M. **Caracterização agronômica de progênies de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims. F. *flavicarpa* Deg.).** 1998. 92p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1998.

MELETTI, L.M.M. Comportamento de híbridos e seleções de maracujazeiro (*Passifloraceae*) (compact disc). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., Campos dos Goytacazes, 2003. **Palestras.** Campos dos Goytacazes: Cluster Informática, 2003.

MELETTI, L.M.M.; BRUCKNER, C.H. Melhoramento genético. In: BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. (Ed.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado.** Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 345-385.

MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; PINTO-MAGLIO, C.A.F.; MARTINS, F.P. Caracterização de germoplasma de maracujazeiro (*Passiflora* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 14, n.2, p. 157 – 162, 1992.

MELETTI, L.M.M., SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; MARTINS, F.P. Caracterização de germoplasma de *Passiflora* – *P. amethystina* e *P. cincinnata*. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1., Campinas, 1997. **Anais**, Campinas, 1997, p. 73-74.

MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; AZEVEDO FILHO, J.A. Caracterização de germoplasma de *Passiflora* II – *P. serrato-digitata* e *P. mucronata*. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, 2., Londrina, 1999. **Anais**, Londrina: SBF/IAPAR, 1999. p. 85-86.

MELLETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; PINTO-MAGLIO, C.A.F.; MARTINS, F.P. Caracterização agronômica e seleção de germoplasma de maracujá (*Passiflora* spp.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13., Salvador, 1994. **Anais**, Cruz das Almas: SBF. 1994. v.3, p. 821-822.

MENG, X.; RUBIN, D.B. Maximum likelihood estimation via ECM algorithm: A general framework. **Biometrika**, Nova York, v.80, p.267-268, 1993.

MONFORTE, A.J.; TANKSLEY, S.D. Fine mapping of a quantitative trait locus (QTL) from *Lycopersicon hirsutum* chromosome 1 affecting fruit characteristics and agronomic traits: breaking linkage among QTLs affecting different traits and dissection of heterosis for yield. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.100, p.471-479, 2000.

MONNA, L.; LIN, H.X.; KOJIMA, S.; SASAKI, T.; YANO, M. Genetic dissection of a genomic region for a quantitative trait locus, *Hd3*, into two loci, *Hd3a* and *Hd3b*, controlling heading date in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.104, p.772-778, 2002.

MORGANTE, M.; SALAMINI, F. From plant genomics to breeding practice. **Current opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v.14, p.214-219, 2003.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Londres, v.8, p.1134-1137, 1980.

NAKASONE, H.Y.; PAULL, R.E. **Tropical fruits**. New York: CAB International, 1998. 445p. (Crop production science in horticulture series, 7).

NELSON, C.D.; NANCE, W.L.; DOUDRICK, R.L. A partial genetic linkage map of slash pine (*Pinus elliotti* Engelm var. *elliottii*) based on random amplified polymorphic DNAs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.87, p.145-151, 1993.

NIKAIDO, A.M.; YOSHIMARU, H.; TSUMURA, Y.; SUYAMA, Y.; MURAI, M.; NAGASAKA, K. Segregation distortion for AFLP markers in *Criptomeria japonica*. **Genes and Genetic Systems**, Suíça, v.74, p.55-59, 1999.

NOGUEIRA FILHO, G.C.; RONCATTO, G.; RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J.C. Avanços em propagação vegetativa do maracujazeiro (compact disc). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., Campos dos Goytacazes, 2003. **Palestras**. Campos dos Goytacazes: Cluster Informática, 2003.

OLIVEIRA, J.C. **Melhoramento genético de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg visando aumento de produtividade**. 1980. 133p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1980.

OLIVEIRA, J.C. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **A cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto: L. Summa, 1987. p. 273-283.

OLIVEIRA, J.C.; FERREIRA, F.R. Melhoramento genético do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L. **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal, SP: FUNEP, 1991. p. 211-239.

OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, 5., Jaboticabal, 1998. **Anais**, Jaboticabal: FUNEP, 1998. p. 291-314.

OLIVEIRA, J.C.; PAYÃO DEMATTÊ, M.E.S.; CARNIER, P.E.; PRIOLLI, R.H.G. Híbridaço interespecfica entre *Passiflora edulis* vs. *Passiflora caerulea* e *Passiflora edulis* vs. *Passiflora coccnea*. In: REUNIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CINCIA, 40., So Paulo, 1988. **Resumos**, So Paulo: SBPC, 1998. p. 797- 798

OTONI, W.C. Potencial da biotecnologia no melhoramento de fruteiras. In: SIMPÓSIO BRASILEIRA DE MELHORAMENTO DE FRUTEIRAS, 2. Viçosa, 2000. **Resumos**. Viçosa: UFV, DFT, 2000. p. 102-121.

PEREIRA, M.C.; OLIVEIRA, J.C.; NACHTIGAL, J.C. Propagação vegetativa do maracujá-suspiro (*Passiflora nitida*) por meio de estacas herbáceas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, 5., Jaboticabal, 1998. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 1998. p. 317.

PIZA JUNIOR, C.T. A cultura do maracujá na região sudeste do Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, 5., Jaboticabal, 1998. **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, 1998. p. 20-48.

PIZA, JR.C.T.; QUAGGIO, J.A.; SILVA, J.R.; KAVATI, R.; MELETTI, L.M.M.; SÃO JOSÉ, A.R. Adubação do maracujá. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. **Recomendações de calagem e adubação para o Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1996. p. 148-149.

PLOMION, C. DUREL, C-E; O'MALEY, D. Genetic dissection of height in maritime pine seedlings raised under accelerated growth condition. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.93, p. 849-858, 1996.

PRIOLLI, R.H.G. **Avaliação morfológica de híbridos entre *Passiflora* spp e comportamento em relação ao nematóide formador de galhas *Meloidogyne incógnita* Kofoid, White (1919) Chitwood (1949) raça 1**. 1991. 88p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1991.

PROVINCE, M.A. Sequential methods of analysis for genome scan. In: RAO, D.C.; PROVINCE, M.A. **Dissection of complex traits**. San Diego: Academic Press, 1999. 583 p.

PROVINE, W.B. **The origins of theoretical population genetics**. Chicago: University Chicago Press, Chicago. 1971. 201 p.

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

REGO, M.M.; BRUCKNER, C.H.; SILVA, E.A.M.; FINGER, F.L.; PEREIRA, K.J.C. Pollen tube behavior in yellow passion fruit following compatible and incompatible crosses. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.101, p.685-689, 2000.

REMINGTON, D.L.; WHETTEN, R.W.; LIU, B.H.; O'MALLEY, D.M. Construction of an AFLP genetic map with nearly complete genome coverage in *Pinus taeda*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.98, p.1279-1292, 1999.

RITTER, E. GEBHARDT, C. SALAMINI, F. Estimation of recombination frequencies and construction of linkage maps from crosses between heterozygous parents. **Genetics**, Bethesda, v.125, p.645-654, 1990.

RUGGIERO, C. Alguns fatores que podem influir na frutificação. In: Ruggiero, C. (Ed.). **Maracujá**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p. 279-287.

RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A.R.; VOLPE, C.A.; OLIVEIRA, J.C.; DURINGAN, J.F.; BAUMGARTNER, J.G.; SILVA, J.R.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, M.E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V.P. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1996. 64p. (FRUPEX. Produções Técnicas, 19).

SAKIYAMA, N.S. Marcadores moleculares e as hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Botucatu, v.11, n.2, p. 204-206, 1993.

SANTANA, E.N.; LAU, D. Controle do vírus que causa endurecimento-dos-frutos-do-maracujazeiro. In: ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R.; MONTEIRO, A.J.A., COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: fruteiras**. Viçosa: UFV, 2002. v.2, p. 827-836.

SATAGOPAN, J.M.; YANDELL, B.S.; NEWTON, M.A.; OSBORN, T.C. A Bayesian approach to detect quantitative trait loci using Markov Chain Monte Carlo. **Genetics**, Bethesda, v.144, p.805-816, 1996.

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

SCALFI, M.; TROGGIO, M.; PIOVANI, P.; LEONARDI, S.; MAGNASCHI, G.; VENDRAMIN, G.G.; MENOZZI, P. A RAPD, AFLP and SSR linkage map, and QTL analysis in European beech (*Fagus sylvatica* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.108, p.433-441, 2004.

SEWELL, M.M.; BASOLI, D.L.; MEGRAW, R.A.; WHEELER, N.C. Identification of QTL influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). I. Physical wood properties. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.101, p.1273-1281, 2000.

SEWELL, M.M.; DAVIS, M.F.; TUSKIN, G.A.; WHEELER, N.C.; ELAM, C.C.; BASSOLI, D.L.; NEALE, D.B. Identification of QTL influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). II. Chemical wood properties. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.104, p.1214-222, 2002.

SHEPHERD, M.; CROSS, M.; DIETERS, M.J.; HENRY, R. Branch architecture QTL for *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis* hybrids. **Annual Forestry Science**, Sri Lanka, v.59, p. 617-625, 2002.

SIBOV, S.T.; SOUZA JR., C.L.; GARCIA, A.A.F.; MANGOLIN, C.A.; BENCHIMOL, L.L.; SOUZA, A.P. Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. 2. Quantitative trait loci (QTL) for grain yield, plant height, ear height and grain moisture. **Hereditas**, Lund, v.139, p.107-115, 2003.

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

SIMONE, M. de; MORGANTE, M.; LUCCHIN, M.; PARRINI, P.; MAROCCO, A. A first map of *Cichorium intybus* L. using a one-way pseudo-testcross and PCR-derived markers. **Molecular Breeding**, Nova York, v.3, n.6, p.415-425, 1997.

SNOW, N. New chromosome reports in *Passiflora* (*Passifloraceae*). **Systematic Botany**, Nova York, v.18, n.2, p. 261-273, 1993.

SOARES-SCOTT, M.D. **Caracterização citogenética de algumas espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora***. 1998. 65p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1998.

SOLLER, M.; BRODY, T. On the power of experimental designs for the detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.47, p.35-39, 1976.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H.; DICKEY, D.A. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1997. 666p.

STENZEL, N.M.C.; SERA, T. Melhoramento genético de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Paraná. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISA EM MARACUJAZEIRO, 2., Londrina, 1999. **Anais**, Londrina: IAPAR-SBF, 1999, p. 81.

STROMMER, J.; PETERS, J.; ZETHOF, J.; KEUELEIRE, P.; GERATS, T. AFLP maps of *Petunia hybrida*: building maps when markers cluster. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.105, p.1000-1009, 2002.

STUBER, C.W.; EDWARDS, M.D.; WENDEL, J.F. Molecular marker-facilitates investigations of quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its components traits. **Crop Science**, Madison, v.27, p.639-648, 1987.

TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review Genetics**, Palo Alto, v.27, p.205-33, 1993.

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

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

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

VAN ECK, H.J.; VAN DER VOORT, J.R.; DRAAISTRA, J.R.; VAN ZANDVOORT, P.; VAN ENCKEVORT, E.; SEGERS, B.; PELEMAN, J.; JACOBSEN, E.; HELDER, J.; BAKKER, J. The inheritance of chromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring, **Molecular Breeding**, Nova York, v.1, p.397-410, 1995.

VAN OOIJEN, J.W. Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.84, p.803-811, 1992.

VAN OOIJEIN, J.W.; BOER, M.P.; JANSEN, R.C.; MALIEPAARD, C. **MapQTL® version 4.0**: Software for the calculation of QTL positions on genetic maps. Wageningen: Plant Research International. 2000.

VAN OOIJEN, J.W.; VOORRIPS, R.E. **JoinMap®** version 3.0: software for the calculation of genetic linkage maps. Wageningen: Plant Research International, 2001.

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

VERHAEGEN, D. PLOMION, C.; GION, J.M.; POITEL, M.; COSTA, P.; KREMER, A. Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus* using RAPD markers: 1. Detection of QTL in interspecific hybrid progeny, stability of QTL expression across different ages. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.95, p.597-608, 1997.

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

VIEIRA, M.L.C. Hibridação somática em plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.3, p.36-40, 1997.

VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. Regeneration of plants from protoplasts of *Passiflora* species (passion fruit). In: **Plant protoplasts and genetic engineering**. Berlin: Springer-Verlag, 1996. p.108-119. (Biotechnology in agriculture and forestry, v.38).

VISSCHER, P.M.; THOMPSON, R.; HALEY, C.S. Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. **Genetics**, Bethesda, v.143, p.1013-1020, 1996.

VOGL, C.; XU, S. Multipoint mapping of viability and segregation distorting loci using molecular markers. **Genetics**, Bethesda, v.155, p.1439-1447, 2000.

VOORRIPS, R.E. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **Journal of Heredity**, Washington, v.93, p.77-79, 2002.

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

VUYLSTEKE, M.; MANK, R.; ANTONISE, R.; BASTIAANS, E., SENIOR, M.L.; STUBER, C.W.; MELCHINGER, A.E.; LUBBERSTEDT, T.; XIA, X.C.; STAM, P.; ZABEAU, M.; KUIPER, M. Two high-density AFLP linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.99, n.6, p.921-935, 1999.

WALDELICE, O.P.; LIMA, J.A.A.; NETO, L.G.P.; RAMOS, N.F.; VIEIRA, F.C. Melão Tupã: produtividade, qualidade do fruto e resistência à viroses. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, n.3, p.539-544, 2003.

WANG, D.; KARLE, R.; IEZONI, A.F. QTL analysis of flower and fruit traits in sour cherry. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.100, p.535-544, 2000.

WELLER, J.L. Maximum likelihood techniques for the mapping and analysis of quantitative trait loci with the aid of genetic markers. **Biometrics**, Washington, v.42, p.627-640, 1986.

WHITTAKER, J.C.; THOMPSON, R.; VISSCHER, P.M. On the mapping of QTL by regression of phenotypes on marker type. **Heredity**, Englewood Cliffs, v.77, p.23-32, 1996.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKY, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Londres, v.18, p.6531-6535, 1990.

WRIGHT, S. Correlation and causation. **Journal Agriculture Research**, Washington, v.20, p.557-585, 1921.

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

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

YANO, M.; SASAKI, T. Genetic and molecular dissection of quantitative traits in rice. **Plant Molecular Biology**, Oxford, v.35, p.145-153, 1997.

YIN, T.; HUANG, M.; WANG, M.; ZHU, L.; ZENG, Z.; WU, R. Preliminary interespecific genetic maps of *Populus* genome constructed from RAPD markers. **Genome**, Ottawa, v.44, p.602-609, 2001.

YOUNG, N.D. Construction a plant genetic linkage map with DNA markers. In: PHILLIPS, R.L.; VASIL, I.K. **DNA-based markers in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994, p.39-57.

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

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

ZENG, Z-B. **Statistical Methods for Mapping Quantitative Trait Loci**. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC: 2001, 128p. (Publicação didática).

ANEXO

Tabela 20 - Dados climáticos da região onde foram coletados os dados fenotípicos, no período experimental

Mês	Temperatura média (°C)	Umidade relativa média (%)	Temperatura máxima (°C)	Umidade relativa máxima (%)	Temperatura mínima (°C)	Umidade relativa mínima (%)	Precipitação (mm)
Janeiro	23,7	92,0	29,1	100	20,1	70	297,6
Fevereiro	25,3	85,0	31,9	100	20,4	57	52,5
Março	23,2	80,6	29,4	97	18,5	53	177,5
Abril	21,8	76,5	28,4	97	16,5	46	55,0
Maio	18,1	75,0	25,3	98,0	11,8	41,4	54,2
Junho	19,2	74,1	27,5	98,1	12,4	39,8	8,9

Fonte: Base de dados da estação meteorológica automatizada da ESALQ/USP.