Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Estudo de uma população segregante (F_1) de maracujá-doce: enriquecimento do mapa de ligação e mapeamento de QTL para produção e qualidade de frutos

Larissa DI Cássia Laperuta

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

Piracicaba
2011

Larissa DI Cássia Laperuta
Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas

Estudo de uma população segregante (F_1) de maracujá-doce: enriquecimento do mapa de ligação e mapeamento de QTL para produção e qualidade de frutos

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

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

Piracicaba
2011

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

Laperuta, Larissa DI Cássia
Estudo de uma população segregante (F1) de maracujá-doce: enriquecimento do mapa de ligação e mapeamento de QTL para produção e qualidade de frutos / Larissa DI Cássia Laperuta. - - Piracicaba, 2011.
134 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

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

CDD 634.425
L311e

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

A você, Waldemar Maschieri Netto, por

todo amor, paciência, carinho, respeito

e, principalmente, pela confiança...

Dedico.

À minha família,

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças todos os dias.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e ao Departamento de Genética pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado e pela excelente estrutura oferecida.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela orientação e pelos ensinamentos ao longo desses quatro anos.

Ao Prof. Dr. Isaías Olívio Geraldi, pela grande colaboração no decorrer deste trabalho e pela paciência sempre.

Ao Prof. Dr. Antonio Augusto Franco Garcia, pela grande colaboração com o trabalho, pelos ensinamentos e pela disponibilidade em tirar dúvidas sempre.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelo conhecimento trasmitido.

À Química Valentina de Fátima De Martin, do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC/ESALQ), pela colaboração durante os sequenciamentos.

Ao Dr. Rodrigo Gazaffi, pela ajuda com os difíceis QTL.

Ao senhor Hildebrando Borgonove, pela colaboração durante o experimento.

Aos amigos do Laboratório, Alessandra, Anselmo, Augusto, Carla, Guilherme, Helen, Luciane, Patrícia e Taislene, pela convivência sempre agradável, pelas risadas e pelo aprendizado.

Ao técnico do Laboratório e amigo, Carlos Alberto de Oliveira, pelas conversas, pelo auxílio e pela colaboração durante todo o trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Genética, em especial à secretária Léia e à bibliotecária Maria da Glória, pelo auxílio prestado.

Aos meus pais e meus irmãos, pelo apoio e incentivo sempre.

Ao Netto, que além de me ajudar nas coletas de dados, foi a pessoa que mais me incentivou, mais me “suportou”, que mais teve paciência e que eu sei que posso contar sempre, nas horas boas ou ruins. Muito obrigada por ser você.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO..... 9
ABSTRACT..... 11
1 INTRODUÇÃO..... 13
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 17
2.1 A cultura do maracujazeiro..... 17
2.2 Marcadores moleculares, com ênfase em AFLP, SSR, RGA e TRAP..... 19
2.3 Mapas genéticos em plantas, com ênfase para espécies de cruzamento..... 22
2.4 Mapeamento de QTL..... 26
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 31
3.1 Material vegetal..... 31
3.2 Condução do experimento..... 31
3.3 Avaliação fenotípica da população de mapeamento (F_1)..... 33
3.4 Análises dos dados fenotípicos..... 33
3.5 Análises moleculares..... 35
3.5.1 Marcadores RGA..... 35
3.5.2 Marcadores TRAP..... 40
3.6 Atribuição de marcas RGA e TRAP no mapa de ligação integrado de *Passiflora alata*..... 41
3.7 Detecção e mapeamento de QTL..... 42
3.7.1 Mapeamento por intervalo composto..... 43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 47
4.1 Análises fenotípicas..... 47
4.1.1 Análises das médias..... 50
4.1.1.1 Diâmetro médio de fruto (DF)..... 51
4.1.1.2 Comprimento médio de fruto (CF)..... 54
4.1.1.3 Peso médio de fruto (PF)..... 57

4.1.1.4 Espessura média da casca (EC) 60
4.1.1.5 Peso médio da casca (PC)..... 63
4.1.1.6 Peso médio da polpa (PP)..... 66
4.1.1.7 Teor de sólidos solúveis totais (SST)..... 69
4.1.1.8 Número médio de fruto (NF)..... 72
4.1.1.9 Produção (PR)..... 75
4.2 Análises moleculares: genotipagem da população de mapeamento (F_1) e segregação das marcas RGA e TRAP..... 79
4.2.1 Marcas RGA..... 79
4.2.2 Marcas TRAP..... 81
4.3 Sequenciamento das marcas RGA 82
4.4 Alocação das marcas no mapa de ligação integrado..... 83
4.5 Mapeamento de QTL..... 96
4.5.1 QTL para diâmetro médio de fruto (DF)..... 98
4.5.2 QTL para comprimento médio de fruto (CF)..... 101
4.5.3 QTL para peso médio de fruto (PF)..... 102
4.5.4 QTL para espessura média da casca (EC)..... 104
4.5.5 QTL para peso médio da casca (PC) 107
4.5.6 QTL para peso médio da polpa (PP)..... 109
4.5.7 QTL para teor de sólidos solúveis totais..... 111
4.5.8 QTL para número médio de fruto (NF)..... 113
4.5.9 QTL para produção (PR)..... 114
4.6 Considerações sobre os QTL mapeados em maracujá-doce..... 116
5 CONCLUSÕES..... 121
REFERÊNCIAS..... 123

RESUMO

Estudo de uma população segregante (F_1) de maracujá-doce: enriquecimento do mapa de ligação e mapeamento de QTLs para produção e qualidade de frutos

A cultura do maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis, 2n = 18) não apresenta expressão comercial como à do maracujá-amarelo. No entanto, por se tratar de uma frutífera relativamente nova nos mercados, com grande potencial de expansão devido ao seu valor agregado, há necessidade de se realizarem estudos genéticos e de melhoramento visando a sua expansão comercial, que deve vir acompanhada pela geração de conhecimento científico. Assim, o objetivo deste estudo foi enriquecer o mapa genético integrado da espécie com marcadores funcionais e mapear QTL relacionados à produção e qualidade de fruto. Para tal, foi utilizada uma população F_1 composta por 180 indivíduos, provenientes do cruzamento simples entre dois acessos de maracujá-doce. Para a construção do mapa de ligação, utilizou-se um algoritmo que estima, por verossimilhança, simultaneamente, a fase de ligação e a frequência de recombinação, especialmente desenhado para espécies não endogâmicas. Em paralelo, 100 genótipos dessa mesma população foram avaliados fenotipicamente em dois locais, durante dois anos, para caracteres de interesse agronômico. As análises de QTL foram feitas pelo método de mapeamento por intervalo composto e marcadores com diferentes padrões de segregação. Os dados fenotípicos mostraram que existe variabilidade genética na população F_1 para ser explorada com fins de melhoramento. Um novo mapa de ligação integrado foi gerado com 1786,11 cM, com uma densidade entre marcas de 4,16 cM. Foram alocados no mapa integrado cinco marcadores do tipo RGA nos grupos de ligação I, II e VI. De um total de 39 QTL, seis QTL estão associados ao caráter diâmetro médio de fruto, quatro ao comprimento médio de fruto, cinco ao peso médio de fruto, cinco à espessura média da casca, cinco ao peso médio da casca, quatro ao peso médio da polpa, cinco ao teor de sólidos solúveis totais, três ao número médio de frutos e dois ao caráter produção. A porcentagem da variação fenotípica explicada por estes QTLs variou de 5,67, para o caráter produção, a 23,52%, para o caráter teor de sólidos solúveis totais. A despeito do número e da importância dos QTL mapeados neste trabalho, é necessário o desenvolvimento de marcadores moleculares mais informativos para a saturação do mapa genético e a obtenção de estimativas cada vez mais acuradas, visando incorporar dados moleculares em programas de melhoramento genético da cultura.

Palavras-chave: Maracujá-doce; RGA; Mapa Genético; Mapeamento de QTL; *Passiflora*.

ABSTRACT

A study of a sweet passion fruit segregating population (F_1): enrichment of the linkage map and QTL mapping for yield and fruit quality

The sweet passion fruit crop (*Passiflora alata*, 2n = 18) does not present a commercial value as the yellow passion fruit crop. However, as it is a crop that recently entered the markets, with increasing potential for expansion due to its aggregated value, it is important to develop genetic and breeding studies to allow this expansion, which need to be accompanied by scientific knowledge generation. Therefore, the aim of the present study was to enrich the integrated genetic map of the species with functional markers and mapping QTL related to yield and fruit quality. We used an F_1 population composed of 180 individuals derived from a single cross between two accessions of sweet passion fruit. For linkage map construction, a likelihood-based algorithm for simultaneously estimating linkage phase and recombination fraction, specially designed for outcrossing species, was used. Separately, 100 genotypes of the same population were phenotypic evaluated in two localities, during two years, for agronomic traits. QTL mapping was carried out by performing composite interval analysis and using markers with different segregation ratios. Phenotypic data showed that there is genetic variability in the F_1 population to be exploited in breeding programs. A novel linkage map spanning 1786,11 cM, with an average marker density of 4,16 cM was constructed. We attributed five RGA markers in the linkage groups I, II and VI. Out of 39 QTL, six were associated with the trait average fruit width, four with average fruit length, five with average fruit weight, five with average skin thickness, five with average skin weight, four with average pulp weight, five with soluble solids content, three with average fruit number and two QTL were detected for fruit yield. The percentage of phenotypic variation explained by these QTL ranged from 5,67, for the trait yield to 23,52% for the trait soluble solids content. Despite of the number and importance of the QTL here mapped, new and informative markers are necessary to be developed to achieve map saturation, and providing more accurate estimates aiming at incorporating molecular information in breeding programs of the crop.

Keywords: Sweet Passion Fruit; RGA; Genetic map; QTL mapping; *Passiflora*

1 INTRODUÇÃO

Os maracujazeiros pertencem à ordem Passiflorales e à família Passifloraceae que é representada por 20 gêneros e mais de 450 espécies (KILLIP, 1938; ULMER & MacDOUGAL, 2004). O maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) é uma das espécies do subgênero *Passiflora*, superseção Laurifolia, série Quadrangulares (MacDOUGAL; FEUILLET, 2004).

Embora várias espécies de *Passiflora* tenham sido domesticadas no período colonial, os pomares comerciais de maracujá (doce e amarelo) passaram a contribuir para a atividade econômica do País somente na década de 80 do século XX. O maracujazeiro-amarelo ou azedo (*P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.), ocupa mais de 95% dos pomares comerciais do Brasil (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2007), correspondendo à praticamente toda a área plantada e produção de maracujazeiros no país, que é destinada para o mercado de frutas e para a indústria de sucos. Grande parte dos pomares comerciais de maracujá-amarelo é composta por variedades selecionadas seja para produção, qualidade de frutos ou resistência a pragas e doenças. Devido aos preços diferenciados, a cultura do maracujá-doce vem ganhando importância por ser apreciada para consumo *in natura* e para compor *blends* em sucos industrializados. Além disso, suas folhas possuem propriedades farmacológicas associadas à produção de passiflorina, um calmante natural (MELETTI; MAIA, 1999), e suas flores têm valor ornamental. Apesar da pequena quantidade de fruta que chega ao mercado, ela atinge melhores cotações que o maracujá-amarelo, ocorrendo uma variação nos preços em função da época do ano, qualidade da fruta e distância do mercado consumidor (CEASA/Minas Gerais, 2010). No Estado de São Paulo, a cultura do maracujá-doce concentra-se em algumas regiões produtoras como São João da Boa Vista, Registro, Pindamonhangaba, Piracicaba, Barretos, Presidente Prudente, Limeira e Mogi Mirim e, segundo levantamento da CATI (2003), a área ocupada está em torno de 170 ha, sendo a área média por produtor de 1,40 ha.

A seleção visual, que também é muito praticada pelos fruticultores de maracujá-amarelo, tem sido extensivamente realizada por aqueles que plantam maracujazeiro-doce, uma vez que não existem variedades comerciais.

Considerando todas as regiões brasileiras, os dados de produção são apresentados para ambas as espécies cultivadas, o maracujá-amarelo e o maracujá-doce. Segundo levantamento do IBGE/Elaboração Agrianual (FNP, 2010) a área cultivada é de 46.866 ha e a produção de 664.286 toneladas, apresentando uma média de produção de 14,17 toneladas por hectare. Estes dados apontam para um aumento significativo da área de plantio na última década, cuja estimativa era de 33.000 ha de área cultivada, revelando o crescimento e o aumento da importância da cultura. Os estados brasileiros com maior produção de maracujá-doce são Santa Catarina, Distrito Federal e São Paulo, onde a produção pode chegar a 50 toneladas de frutos por hectare.

Os pomares comerciais de maracujá-doce apresentam acentuada variabilidade genética, verificando-se, como conseqüência, variações fenotípicas pronunciadas entre indivíduos para caracteres relacionados à planta, inflorescência e ao fruto, tais como: densidade de inflorescência, número de flores e de frutos, uniformidade de distribuição e maturação de frutos, coloração da polpa de frutos maduros, formato, espessura da casca, peso, comprimento e diâmetro de frutos, aroma, consistência, oxidação e peso da polpa, relação polpa/semente, teor de sólidos solúveis totais e de acidez, relação acidez/sólidos solúveis totais, percentagem de ácido ascórbico e málico e percentagem de açúcares totais. Também, as sementes apresentam-se variáveis quanto ao seu número por fruto, à morfologia, ao peso fresco, à percentagem de germinação e ao vigor.

Como não existe nenhuma variedade selecionada de maracujá-doce, os novos plantios são feitos por sementes obtidas de frutos selecionados de pomares produtivos com características de frutos com formato ovalado, “sem pescoço” e base arredondada, frutos grandes com mais de 400 gramas de massa, coloração amarelo-alaranjada, doce e com sabor e aroma agradáveis (SAVAZAKI, 2003). A falta de uma variedade melhorada é um dos problemas enfrentados pelos produtores, assim como a incidência de doenças. Particularmente, no Estado de São Paulo, as principais são: bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), verrugose (*Cladosporium herbarum* Link) *gloeosporioides*) e uma

virose que causa o endurecimento dos frutos causada pelo vírus PMV (*Passion fruit woodness virus*) (SAVAZAKI, 2003).

Segundo Santos Filho et al. (2004), ainda é limitado o número de produtos fitossanitários registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para aplicação em pomares de maracujazeiro. O uso indiscriminado de agrotóxicos no ambiente faz com que haja a necessidade de estudar e explorar o germoplasma de *Passiflora,* visando à seleção de genótipos e à formação de populações melhoradas que reúnam características agronômicas superiores, relativamente à qualidade de fruto, produção e resistência a pragas e doenças.

O avanço das tecnologias advindas do conhecimento de genética molecular tem contribuído com os programas de melhoramento, mesmo para espécies pouco estudadas sob o ponto de vista genético. Atualmente, a geração de variedades melhoradas tende a incorporar metodologias de genética molecular. Por exemplo, a identificação de marcadores moleculares ligados fisicamente a genes que controlam caracteres de importância agronômica pode auxiliar no processo de seleção (COLLARD; MACKILL, 2008). Um dos métodos para determinar esse tipo de associação envolve a construção de mapas de ligação (HAYWARD et al., 1994; JONES et al., 2009), nos quais podem ser localizadas regiões que contêm locos responsáveis pelo controle de características quantitativas (*Quantitative Trait Loci* – QTL).

As populações convencionais de mapeamento (F_2 ou retrocruzamentos, por exemplo) são originadas a partir de genitores endogâmicos e derivam de autofecundações ou retrocruzamentos. Porém, nos maracujazeiros a polinização cruzada é condicionada pelo fenômeno da auto-incompatibilidade, onde o pólen de uma planta é incapaz de fertilizar as flores da mesma planta, e,consequentemente, a obtenção de populações endogâmicas não é possível. Além disso, o fenômeno da depressão por endogamia pode ocorrer, inviabilizando o estabelecimento de plantas autofecundadas em experimentos a campo. Outro fator a ser considerado é a dificuldade em se trabalhar com linhagens homozigóticas devido ao caráter perene de algumas culturas, ou seja, para as plantas que apresentam um longo ciclo reprodutivo torna-se impraticável a realização de autofecundações sucessivas. Desse modo, para populações derivadas de genitores nãoendogâmicos ou de espécies de cruzamento,

tem-se usado populações F_1 segregantes ou famílias de irmãos completos. No caso do maracujá amarelo (SUASSUNA et al., 2003) e doce (FERREIRA et al., 2010), a autoincompatibildade é o principal motivo que leva à utilização de populações F_1 segregantes para o mapeamento.

No caso específico do maracujá-doce, o interesse está em identificar e localizar locos quantitativos associados a características de produção, qualidade de fruto e resistência a doenças, em especial aquela causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.

Dessa forma, o objetivo geral deste trabalho foi caracterizar uma população F_1 segregante de maracujá-doce, cultivada em dois ambientes e durante dois anos de produção, relativamente a características de qualidade de fruto e produção. Em paralelo, buscou-se associar os dados fenotípicos com perfis moleculares gerados por marcadores do tipo AFLP, microssatélites, RGA e TRAP. Mais especificamente, a proposta teve por objetivos: (i) enriquecer o mapa de ligação integrado de maracujá-doce e (ii) identificar e mapear QTL associados à expressão de características de importância agronômica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do maracujazeiro

O termo maracujazeiro é usado para referir-se a várias espécies do gênero *Passiflora* L., o qual pertence à classe Dicotyledonae, subclasse Archichlamydeae, ordem Passiflorales, subordem Flacoutiineae e família Passifloraceae (LIMA; CUNHA, 2004; ULMER; MAC DOUGAL, 2004). Há cerca de 400 espécies de *Passiflora*, sendo que 120 destas são nativas do Brasil.

As flores são actinomorfas, variando de tamanhos de 1 cm (*P. multiflora* e *P. suberosa*) a 22 cm (*P. speciosa*) e possuem cores variadas, podendo ser de cor vinho, branca, azul, violeta, rosa ou vermelha (ULMER; MacDOUGAL, 2004). Os frutos são arredondados ou alongados, e possuem coloração verde, amarela-alaranjada, ou com manchas verde-claras. Possuem tamanhos que variam de 0,7 cm (*P. suberosa*) até 30 cm (*P. quadrangularis*). As folhas também possuem tamanhos e formas variadas, podendo ser arredondadas ou partidas (ULMER; MacDOUGAL, 2004).

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 autopolinização, como a presença dos estigmas no ápice do androginóforo, numa posição superior às anteras, que estão localizadas logo abaixo dos estigmas. Ocorre o fenômeno da protandria e, algumas espécies apresentam autoincompatibilidade, ou compatibilidade parcial, devido a um sistema esporofítico homomórfico, como *P. edulis* e *P. alata* (BRUCKNER et al., 1995; MANICA et al., 2005).

Os polinizadores naturais dos maracujazeiros são as mamangavas (*Xylocopa ssp*). Esse inseto é o principal agente polinizador em função de seu tamanho, que possibilita a coleta de póen e a polinização ao mesmo tempo (MELETTI, 2003).

O maracujá-doce é uma espécie originária do Brasil, com distribuição nos estados da Bahia, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (SALOMÃO & ANDRADE, 1987). Foi verificada a existência de maracujá-doce também no Espírito Santo, Rondônia, Amazonas e Pará (JUNQUEIRA et al., 2003), e no Maranhão, Piauí, Tocantins, Goiás e Distrito Federal (MANICA et al., 2005).

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, embora nem todos cultivem a mesma espécie (MANICA et al., 2005).

A exploração comercial dessa fruta no Brasil teve início a partir de 1960, quando tipos silvestres cultivados começaram a ser vendidos, se destacando por serem muito aromáticos e com baixa acidez, apesar de casca grossa e pouca polpa. Além do consumo *in natura*, outro atrativo do maracujá-doce é o conteúdo de passiflorina, um calmante natural extraído das folhas, que vem atraindo a atenção das indústrias farmacêuticas para fabricação de medicamentos e para o tratamento de excitações nervosas, ansiedade e insônia (MELETTI; MAIA, 1999; MANICA; OLIVEIRA Jr., 2005), além de seu valor ornamental associado às flores coloridas e perfumadas.

O maracujá-doce é uma espécie com grande potencial produtivo, sendo os estados brasileiros com maior produção Santa Catarina, Distrito Federal e o estado de São Paulo, onde a produção pode chegar a 50 toneladas de frutos por hectare. Neste estado, destacam-se os municípios de Registro, Iguape e Marília como os maiores produtores. No entanto, a produtividade nacional ainda é muito baixa, situando-se ao redor de 10 a 15 t/ha (KAVATI; PIZA JR.; 2002; MANICA et al., 2005). Porém, apesar da pequena quantidade de fruta que chega ao mercado, ela atinge melhores cotações que o maracujá-amarelo, ocorrendo uma variação nos preços em função da época do ano, qualidade da fruta e distância do mercado consumidor (CEASA/MINAS, 2007).

A cultura do maracujazeiro-doce caracteriza-se por ser uma atividade familiar, desenvolvida em pequenas propriedades, com tamanho entre três e cinco hectares, o que representa uma alternativa para os pequenos proprietários, contribuindo para valorizar o trabalho do pequeno agricultor (MELETTI, 2003; NOGUEIRA FILHO et al., 2003). Porém, ao mesmo tempo, exige mão-de-obra especializada para a execução dos tratos culturais, como podas, polinização artificial, controle de plantas daninhas e controle fitossanitário (DAMATTO Jr; LEONEL; PEDROSO, 2005). Outro importante aspecto relacionado à cultura é a possibilidade de bons rendimentos ao produtor por unidade de área, porque o maracujá-doce atinge preços unitários muito expressivos no segmento de frutas frescas (MANICA et al., 2005).

A propagação do maracujá-doce pode ser feita através de semente ou por métodos vegetativos, como enxertia, estaquia e micropropagação. No entanto, ela 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 (DAMATTO Jr; LEONEL; PEDROSO, 2005).

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

2.2 Marcadores moleculares, com ênfase em AFLP, SSR, RGA e TRAP

Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Existem 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) e os SSR – *Simple Sequence Repeats* - ou microssatélites (LITT & LUTTY, 1989) 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), ambos baseados na PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Há outros marcadores que tem por base a PCR, porém um ou ambos os *primers* são assentados em sequencias alvo, como os RGA - *Resistance Gene Analogs* - (PFLIEGER et al., 2001; VALLAD et al., 2001; LÓPEZ et al., 2003; VAN DER LINDEN et al., 2004) e os TRAP - *Target Region Amplification Polymorphism* - (HU & VICK, 2003) e que, portanto, dependem de sequenciamento.

Os AFLP exploram a 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 a praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR. 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 é a sua dominância (VOS et al., 1995). Alelos de um mesmo loco são revelados pela presença ou ausência de uma banda que, por sua vez, resulta da amplificação de um fragmento que é visualizado em gel de poliacrilamida. No entanto, não é possível saber se o loco amplificado está em homozigose ou heterozigose. Sendo assim, os marcadores dominantes não permitem a distinção entre genótipos homozigóticos dominantes e heterozigóticos, os quais constituem apenas uma classe, isto é, a que apresenta o alelo amplificado (banda). Os indivíduos nos quais o alelo não é amplificado constituem a outra classe, homozigótica para ausência da banda, qualquer que seja o motivo pelo qual o fragmento não foi amplificado.

Os microssatélites consistem de seqüências simples repetidas, de um a seis nucleotídeos repetidos *in tandem*, que encontram-se amplamente distribuídos em genomas de eucariotos e procariotos. São regiões do genoma que estão sob taxas de mutação muito elevadas, que variam de loco para loco, sendo esta variação de 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos por loco, por geração (SCHLÖTTERER, 2000). Estas mutações são responsáveis por tornar os microssatélites tão informativos do ponto de vista genético, pois muitos alelos são gerados por loco (STRAND et al., 1993). As seqüências microssatélites em um loco variam de um indivíduo para o outro, entretanto as seqüências de DNA que as flanqueiam são bastante conservadas entre indivíduos da mesma espécie. Conhecendo estas regiões adjacentes às seqüências microssatélites, é possível o desenho de pares de *primers* específicos, possibilitando a amplificação, via PCR, dos fragmentos que contêm o DNA repetitivo em diferentes genótipos. Além disso, os microssatélites são marcadores co-dominantes, ou seja, ambos alelos de um indivíduo heterozigótico podem ser visualizados no gel (SUGANUMA & CIAMPI, 2005).

Recentemente, devido ao advento da genômica, vários marcadores têm sido desenvolvidos e dependem, basicamente, do conhecimento de sequencias alvo onde são assentados um ou ambos os *primers* permitindo, via PCR, a amplificação de segmentos específicos.

Os chamados marcadores RGA *(Resistance Gene Analogs)* também se classificam como marcadores do tipo dominante. Os RGAs são marcadores relacionados a genes de resistência. A clonagem de genes de resistência possibilitou o desenvolvimento desta classe de marcadores chamados “marcadores homólogos a genes de resistência” ou, do termo em inglês, *resistance gene-like markers*. O seu desenvolvimento valeu-se de conhecimentos obtidos nas áreas de genômica e de mapeamento comparativo e vem sendo utilizada com sucesso no mapeamento de genes de resistência (CAMARGO, 2001).

O maior grupo de genes de resistência de plantas já clonados codifica para proteínas com um domínio de ligação a nucleotídeos (NBS) na região N-terminal, e para uma região com repetições ricas em leucina (LRR) no C-terminal. Estes genes conferem resistência a diversos patógenos incluindo vírus, bactérias, fungos e nematóides (ROSSI et al., 1998). Enquanto a região LRR é muito variável, a região NBS apresenta motivos conservados (KOBE & DEISENHOFER, 1994). Para diversas espécies de plantas, foram desenhados diferentes conjuntos de *primers* degenerados para a região NBS, os quais foram utilizados na amplificação de sequências genômicas. A análise das sequências nucleotídicas amplificadas e do seu produto de tradução indicou similaridade com genes de resistência putativos conhecidos, sendo então denominados análogos a genes de resistência ou RGAs. Usando esta metodologia, Madsen et al. (2003), por exemplo, identificaram em cevada 30 sequências de RGA com similaridade a genes de resistência em arroz. Mais recentemente, Hanai et al. (2010) alocaram 32 marcas RGA no mapa núcleo de feijão.

A técnica TRAP revela fragmentos polimórficos em seqüências alvos de genes candidatos putativos. Os TRAPs são amplificados por um *primer* fixo desenhado a partir de uma seqüência alvo EST (*Expressed Sequence Tag*) depositada em um banco de dados, NCBI, por exemplo (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) e um segundo *primer* de seqüência arbitrária, exceto para os núcleos ricos em AT ou CG que pareiam com íntrons e éxons, respectivamente. Estes marcadores foram usados para avaliar a diversidade genética entre acessos de girassol selvagem (*Helianthus annuus* L.) (HU et al., 2003), em *fingerprinting* de cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) (HU et al., 2005), na marcação de um gene recessivo em girassol (ROJAS-BARROS et al., 2005) e no

mapeamento QTL em populações endogâmicas intervarietais de trigo (*Triticum aestivum* L.) (LIU et al., 2005).

Outro marcador importante que revela polimorfismos em uma única base, são os SNPs (*Single NucleotidePolymorphism*). Esses marcadores se baseiam na variação de um único nucleotídeo em regiões codificadoras ou não do genoma e podem contribuir diretamente para um fenótipo ou podem estar associados a ele como resultado de um desequilíbrio de ligação (NASU et al., 2002). Trata-se do tipo mais comum de variação genética (EDWARD; POOLE; BARKER, 2008), sendo os SNPs os marcadores mais polimórficos e abundantes, evolutivamente conservados e de expressão codominante. Os SNPs também já foram utilizados como ferramenta para saturar mapas genéticos e como pontes para integrar mapas individuais gerados em espécies de cruzamento.

Ainda cabe citar os polimorfismos de conformação de fita simples de DNA que podem ser usados para identificar SNPs e, consequentemente, como marcadores genéticos. Os SSCP (*Singlestrand Conformation Polymorphisms*) baseiam-se na mobilidade das fitas simples de DNA em gel não desnaturante de poliacrilamida; esta mobilidade é função tanto do tamanho do fragmento quanto da estrutura tridimensional que a molécula adquire no contexto de interações entre os nucleotídeos. A técnica é tida como altamente sensível, pois fragmentos de DNA com o mesmo tamanho podem revelar diferentes confôrmeros devido à mutação em um único sítio. A rotina de géis SSCP tem sido comum em exames de DNA para detectar doenças em humanos (KOMAR, 2009), mas pode ser utilizada como estratégia, inclusive para o mapeamento genético (FUKUOKA et al., 1994; GALEANO et al., 2009).

2.3 Mapas genéticos em plantas, com ênfase para espécies de cruzamento

O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética de espécies e, potencialmente, no melhoramento de plantas.

Os primeiros mapas de ligação em plantas foram construídos com o uso de marcadores isoenzimáticos (TANKSLEY; RICK, 1980; VALLEJOS et al., 1991; VALLEJOS; SAKIYAMA; CHASE, 1992; PHILIPP, WEHLING e WRICKE, 1994).

Mapas genéticos são formados por grupos de ligação nos quais está representada a ordem e a distância entre marcadores genéticos (morfológicos ou moleculares). Os grupos de ligação correspondem ao complemento haplóide de cromossomos de uma espécie. Os mapas genéticos apresentam importantes aplicações para o conhecimento básico da organização e evolução do genoma de uma espécie, além da possibilidade de mapeamento de QTL.

Cada etapa da construção de um mapa genético deve ser analisada com cuidado. Por exemplo, o estabelecimento de populações segregantes adequadas deve tomar por base o sistema reprodutivo do organismo, as características de interesse nos genitores, no caso de plantas cultivadas, e o número de indivíduos amostrados resultantes do cruzamento. Já para a etapa de genotipagem dos locos na população de mapeamento e nos progenitores, deve-se observar o tipo de marcador (dominante ou codominante) e a quantidade dos marcadores utilizados. Finalmente, após a verificação da segregação individual dos locos estudados, as metodologias de genética-estatística devem ser adequadas e robustas de tal modo a otimizar a verificação da ligação, a estimativa da distância e a ordenação dos marcadores nos grupos de ligação (TANKSLEY, 1993; SEMAGN; BJØRNSTAD; NDJIONDJOP, 2006).

As populações mais comumente utilizadas na construção de mapas genéticos são F_2, populações provenientes de retrocruzamento, populações derivadas por autofecundação a partir da geração F_2 e linhagens endogâmicas recombinantes (RILs – *Recombinant Inbred Line*). Porém, como já descrito anteriormente, o mecanismo de auto-incompatibilidade do maracujazeiro, impede ou limita a produção desses tipos de população. Em espécies de ciclo longo, como o eucalipto, por exemplo, esta limitação também é levada em consideração. Para contornar esse problema, inicialmente, foi adotada a estratégia *2-way pseudo testcross* (RITTER et al., 1990). Nessa estratégia, a configuração do cruzamento não é conhecida a *priori*, como em um cruzamento-teste clássico, mas inferida a *posteriori*, após a análise da segregação. Essencialmente, são construídos dois mapas de ligação, um para cada genitor, em função de qual deles possui o alelo heterozigoto para o loco do marcador. O resultado final é a obtenção de dois mapas, no qual cada um apresenta marcadores que segregam em cada genitor. Esta é uma abordagem muito utilizada na prática, pois permite o pronto uso das

metodologias e softwares desenvolvidos para populações experimentais (AITKEN et al., 2008; BUNDOCK et al., 2008; CARNEIRO et al., 2002; CHEN et al., 2008; GAUDET et al., 2008; LANTERI et al., 2006; LOPES et al., 2006; MYBURG et al. 2003; PIPERIDIS et al. 2008). Tal metodologia foi utilizada de forma eficiente para espécies de cruzamento ou auto-incompatíveis (CARLSON et al.,1991; GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994, MALIEPAARD et al., 1997). Porém, essa abordagem tem o inconveniente de gerar mapas individuais, ou seja, um para cada genitor, pois aproveita apenas marcadores moleculares dominantes que segregam na proporção 1:1.

Nesse contexto, foram construídos dois mapas genéticos de maracujá-amarelo. No primeiro deles foram utilizados marcadores moleculares do tipo RAPD (CARNEIRO et al., 2002) e, no segundo, marcadores do tipo AFLP (LOPES et al., 2006).

Contudo, o uso de marcadores biparentais ou de locos cujos alelos estão presentes em ambos os genitores permite a construção de um mapa único, integrando os grupos de ligação. Apesar de os marcadores dominantes contribuírem para a saturação dos grupos de ligação e uma maior caracterização genômica da espécie, marcadores biparentais dominantes com segregação 3:1 e codominantes com segregação 1:2:1 e 1:1:1:1 devem ser utilizados como ponte, sendo esses últimos os mais informativos (WU et al., 2002). Devido à maioria dos locos estar em heterozigose, diversos padrões de segregação podem ocorrer (Tabela 1). Wu et al. (2002) afirmam que é possível a ocorrência de até 18 tipos de segregação, com até quatro alelos informativos para as espécies diplóides.

Os dois tipos de segregação mais informativos, A e B, (WU et al., 2002) (Tabela 1) só podem ser detectados através de marcadores codominantes, como os microssatélites e os SNPs. Portanto, as análises de ligação em espécies de cruzamento obrigatório devem fazer uso desse tipo de marcadores visando a construção de um mapa integrado para a população em estudo.

Oliveira et al., (2008), recentemente, construíram um mapa único de maracujá-amarelo, integrado com base em dados de AFLP gerados por Lopes (2003) e SSR. Esta integração só foi possível devido ao emprego da metodologia proposta por Wu et al. (2002).

O mapa integrado de maracujá-doce foi construído por Nunes (2010) e consiste, basicamente, em um arcabouço de marcadores do tipo AFLP com alguns marcadores microssatélites. Este mapa foi adensado por Pereira (2010), através da introdução de marcas SNPs, SSCPs e M-AFLPs.

Tabela 1 – Configurações genéticas dos locos marcadores, segundo o tipo de cruzamento, e os respectivos padrões de bandas observadas (alelos) nos genitores e nas progênies oriundas de cruzamentos entre genitores não-endogâmicos

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

Fonte: Adaptado de Wu et al. (2002)

2.4 Mapeamento de QTL

A utilização de marcadores moleculares para mapear e caracterizar QTL (*Quantitative Trait Loci*) está fundamentada no desequilíbrio de ligação existente numa população segregante, fazendo com que sejam geradas associações entre os marcadores e o QTL. Uma associação significativa entre os marcadores e a expressão do caráter pode evidenciar a presença de um QTL próximo fisicamente ao marcador. De forma geral, para a realização do mapeamento é necessária uma população que apresente variabilidade genética e elevado desequilíbrio de ligação.

Várias metodologias já foram propostas para a detecção e estimação dessas regiões, o que permitiu um acúmulo considerável de informações sobre base genética de caracteres quantitativos de importância agronômica para as principais culturas, como milho, soja e tomate por exemplo. Entretanto, ao observar as propriedades biológicas dos materiais em estudo, os trabalhos podem ser classificados em dois grupos: i) mapeamento de QTLs para populações experimentais (com linhagens endogâmicas); ii) mapeamento em populações obtidas com cruzamento de indivíduos não endogâmicos, como por exemplo as progênies de irmãos completos (LIN et al., 2003).

No caso da espécie em estudo, *Passiflora alata* Curtis, o mapeamento obrigatoriamente é feito em populações obtidas com o cruzamento de indivíduos não endogâmicos, uma vez que, como dito anteriormente, a espécie apresenta autoincompatibilidade, ou seja, a obtenção de linhagens endogâmicas é inviável. Nesses casos, o mapeamento de QTL é feito usando uma progênie segregante F_1 (irmãos-germanos) obtida do cruzamento entre indivíduos não aparentados e fenotipicamente contrastantes. Quando não se conhece a fase de ligação entre QTL e o marcador, o mapeamento é dificultado, pois a fase de ligação é fundamental para determinar a origem dos alelos de interesse. O poder de detecção do QTL será tanto maior quanto maior for a cobertura do genoma pelos marcadores, bem como o número de indivíduos genotipados e analisados fenotipicamente para os caracteres quantitativos (LANDER; BOTSTEIN, 1989). Nesta situação, para que se possam identificar QTL, podem-se utilizar diversas metodologias, desde as mais simples, como análise de marcas individuais, até modelos que analisam mais de uma região do

genoma, simultaneamente (JANSEN; STAM, 1994, ZENG, 1994, KAO; ZENG; TEASDALE, 1999). O mapeamento de QTL nessa situação normalmente é conduzido através de três abordagens: marcas analisadas individualmente, *2-way pseudo testcross* e mapeamento de QTLs em progênies de irmãos completos baseado em mapa integrado.

A análise individual de marcas permite a associação entre marcadores e fenótipos. Pode ser útil quando se dispõe de progênies de irmãos completos, pois pode ser aplicada para marcadores com qualquer padrão de segregação. A metodologia de mapeamento de QTL que envolve marcas simples baseia-se na comparação entre as médias das classes genotípicas dos marcadores, o que pode ser realizado por meio do teste *t*, análise de variância, regressão linear simples (LYNCH; WALSH, 1998) e teste da razão de verossimilhança (WELLER, 1986). Como vantagem, esta metodologia apresenta simplicidade e rapidez, podendo ser facilmente estendida para múltiplos locos, não sendo necessário se ter um mapa de ligação para essas análises. No entanto, apresenta o inconveniente de não dinstiguir um QTL de pequeno efeito, localizado próximo a um marcador, de um QTL de grande efeito, localizado mais distante do marcador, comprometendo, assim, a estimação correta dos efeitos e da posição no genoma de cada QTL. O estudo de epistasia é relativamente simples, porém apresenta baixo poder estatístico.

Já o *2-way pseudo testcross* (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994) utiliza marcadores com segregação 1:1 para a construção do mapa de ligação e o mapeamento de QTLs. Como são construídos dois mapas de ligação, um para cada genitor, a desvantagem dessa abordagem é a impossibilidade de que marcadores com outros tipos de segregação sejam utilizados na construção dos mapas e, consequentemente impedindo a geração de um mapa único e integrado. Em relação ao mapeamento de QTL, somente é possível detectar com precisão os QTL que segregam em um dos genitores e que não possuam efeito de dominância.

Em 1989, Lander e Botstein propuseram uma nova metodologia denominada mapeamento por intervalo. Este método utiliza, para análise, marcadores adjacentes flanqueando um possível QTL, permitindo, dessa forma, o aumento no poder de detecção, precisão nas estimativas dos efeitos e nas posições dos QTL. Entretanto, o

mapeamento por intervalo, que avalia um intervalo de cada vez, sem considerar o restante da informação do genoma, apresenta problemas de detecção, especialmente quando existem outros QTL de grande efeito no mesmo ou em outros grupos de ligação. Desse modo, não há como determinar se o efeito significativo observado é devido a um QTL ou a vários. Além disso, quando múltiplos QTL estão presentes, um problema comum é a observação de falsos positivos, ou seja, são detectados QTL inexistentes ou QTL fantasmas.

Um outro método, que combina mapeamento por intervalo e regressão linear múltipla e tem como característica principal evitar que um QTL presente em qualquer posição do genoma interfira no mapeamento do QTL no intervalo considerado foi proposto por Jansen (1993, 1996) e Zeng (1993, 1994). Com o intuito de eliminar os QTL fantasmas, esses autores propuseram um modelo de regressão múltipla, denominado mapeamento por intervalo composto (CIM). Este método apresenta como limitação o fato de não considerar o efeito epistático entre os genes, ou seja, o efeito de interação entre alelos de diferentes locos é ignorado (ZENG, 1994).

Um modelo que incorpora a estimativa de epistasia foi desenvolvido por Kao et al. (1999). Esse modelo considera múltiplos intervalos simultaneamente e foi denominado de mapeamento por intervalos múltiplos.

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

Relativamente às passifloras comerciais, Moraes (2005) mapeou QTL associados à produção e a diversos caracteres de qualidade de fruto em maracujá-amarelo e Lopes (2006), mapeou um QTL de resistência à bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae.* Esses dois autores utilizaram a metodologia de mapeamento por intervalo composto (CIM) para o mapeamento de QTL.

Estudos sobre QTL também têm sido realizados em outras fruteiras. Conner et al. (1998) mapearam QTL associados ao crescimento e à altura de planta no período juvenil em macieiras e Kenis et al. (2008) mapearam QTL para qualidade de frutos na

mesma cultura. Freeman et al. (2008) mapearam QTL relacionados ao mecanismo de defesa de eucaliptos contra a ação de herbívoros e Zhang et al. (2010) mapearam QTL associados à qualidade de frutos de cerejeira.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

A população de mapeamento foi obtida de um cruzamento controlado entre dois acessos de *Passiflora alata,* sendo o masculino (SV3) coletado em uma propriedade particular (Sítio Valente) localizada em Piracicaba, SP e o feminino (2(12)) fornecido pelo Dr. *Nilton Junqueira* (Embrapa – CPAC).

3.2 Condução do experimento

O cruzamento entre os acessos SV3 e 2(12) foi realizado em casa-de-vegetação, em outubro de 2006. Foram utilizadas duas flores do genitor 2(12) em início de abertura das sépalas, protegidas com saco de papel, dois dias antes da antese. Os frutos foram colhidos em janeiro de 2007. Em março de 2007 foi realizada a semeadura da população de mapeamento F_1. Foram plantadas 256 sementes em duas bandejas de isopor com 128 células contendo substrato Plantmax®. As mudas foram transferidas em maio de 2007 para vasos plásticos (1L) contendo 75% de terra e 25% de substrato.

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

A parcela experimental foi constituída por três plantas (clones) dispostas em linhas. O espaçamento utilizado foi de 3m entre linhas e 5m entre plantas na linha totalizando 15m lineares para cada parcela. A condução das plantas foi feita em espaldeira com fio de arame (tipo frutifio) a 2m de altura do solo. Desde o plantio, foram realizados todos os tratos culturais recomendados, tais como: condução da planta, poda, adubação, controle das ervas daninhas e controle de pragas e doenças.

O experimento foi conduzido em dois ambientes: na Estação Experimental Anhembi, do Departamento de Genética da ESALQ/USP, nas proximidades do distrito de Anhumas, a 55 km de Piracicaba, SP (22º47' latitude sul, 48º07' longitude oeste e

altitude de 500 m) e na propriedade rural do Sr. *Hildebrando Borgonove* na cidade de Descalvado, SP (21º54' latitude sul, 47º37' longitude oeste e altitude de 679 m) a 140 km de Piracicaba. Os plantios foram realizados em fevereiro e abril de 2008 em Anhembi e Descalvado, respectivamente (Figuras 1 e 2).

O delineamento experimental utilizado foi o látice quadrado 10 x 10 com duas repetições em cada ambiente.

Figura 1 – Experimento instalado na Estação Experimental Anhembi

Figura 2 – Experimento instalado no município de Descalvado, SP

3.3 Avaliação fenotípica da população de mapeamento (F_1)

A população de mapeamento F_1 foi avaliada para os caracteres de produção e qualidade do fruto durante dois anos de produção: 2009 e 2010. Os caracteres avaliados por parcela, individualmente, foram:

1) Diâmetro médio de frutos ou calibre (DF): obtido medindo-se a região equatorial do fruto com o uso de paquímetro digital. Foram medidos 10 frutos por parcela e os valores são expressos em milímetros (mm); ;
2) Comprimento médio de frutos (CF): obtido medindo-se o eixo longitudinal do fruto com o uso de paquímetro digital. Foram medidos 10 frutos por parcela e os valores são expressos em milímetros (mm);
3) Peso médio de frutos (PF): obtido com a pesagem de 10 frutos por parcela, usando balança digital, sendo a leitura expressa em gramas (g);
4) Espessura média da casca (EC): obtida pela medição da casca na porção mediana de frutos cortados com o uso de paquímetro digital. Foram medidos 10 frutos por parcela e os valores são expressos em milímetros (mm);
5) Peso médio da casca (PC): obtida com a pesagem da casca de 10 frutos por parcela, com auxílio de balança digital, sendo a leitura expressa em gramas (g);
6) Peso médio da polpa (PP): obtida conforme a expressão PF – PC;
7) Teor de sólidos solúveis totais (SST): determinado por refratometria através de refratômetro portátil com leitura na faixa de 0 a 32º Brix. Foram medidos 10 frutos por parcela e os valores são expressos º Brix;
8) Número de frutos por parcela (NF): o número total de frutos foi contado nas parcelas a cada três meses;
9) Produção (PR): obtida em kg por parcela de acordo com a seguinte expressão: (PFxNF)/1000.

3.4 Análises dos dados fenotípicos

Os dados fenotípicos coletados em campo foram analisados comparativamente em relação às médias dos dois locais (Anhembi e Descalvado) e dos dois anos de

produção (2009 e 2010) (Figuras 3 e 4). Futuramente serão realizadas estimativas de parâmetros genéticos e estatísticos para que se dê continuidade ao trabalhado visando o melhoramento da cultura do maracujá-doce.

Figura 3 – Experimento em fase de produção na Estação Experimental Anhembi

Figura 4 – Experimento em fase de produção no município de Descalvado, SP

3.5 Análises moleculares

Para as análises moleculares foi utilizado DNA genômico dos dois genótipos parentais e de 180 indivíduos da população F_1 em estudo. Esse DNA foi extraído e quantificado por Nunes (2010) através do método CTAB (DELLAPORTA; WOODS; KICKS, 1983). Após a requantificação em gel de agarose 0,8%, o DNA foi aliquotado a uma concentração de 50ng/µL.

3.5.1 Marcadores RGA

Para o desenvolvimento dos marcadores RGA foram utilizados *primers* degenerados desenhados, especialmente, para buscar sequências conservadas nos genes de resistência a patógenos em plantas (Tabela 2).

Tabela 2 – *Primers* degenerados e suas respectivas sequências utilizados no desenvolvimento das marcas RGA

Primer	*Sequência 5' – 3'	Domínio
NBSa-F	GGA ATG GGK GGA CTY GGY AAR AC	NBS/*P-loop*
NBSa-R	ATC ATA ACT TAT TTT KAG	NBS-LRR/Motivo 2
Kdc-F	ATG GGA AGG AAG TAT TCC AA	Quinase
Kdc-R	ARG TTC CAC AGG ACA TCA CC	Quinase
Kde-F	AAG AAA TTG CGG TAA AAA GGC TA	Quinase
Kde-R	AAG ATT CTG GCC ATC CCA AAA TC	Quinase
RGP-F	GGN ATG GGY GGB RTH GGY AAR AC	NBS/*P-loop*
RGHDR2	CAR MGC YAA WGG YAA DCC	NBS/hidrofóbico
P2-R	A CCR AAN GAR TAN ACR TC	STK/subdomínio X
P3-F	TNG GNS ANG GNG KNT TYG G	STK/subdomínio I
PR5	AAC AAY TGY CCR TAC ACC GT	Proteína de defesa/PR5
PR5-As	GGA TCA TCT TGW GGR TAR CTA TA	Proteína de defesa/PR5
Glus	RYN GGN GTW TGY TAY GG	Proteína de defesa/PR2
Glus-As	CAD CCR CTY TCN GAY AC	Proteína de defesa/PR2

* Código para bases mistas: Y=C ou T; R=A ou G; W= A ou T; B=C, G ou T; H=A, C ou T;D=A, G ou T; S=C ou G; K=G ou T; M=A ou C; S=C ou G; D=A, G ou T; V=A, C ou G; N=A, C, G ou T; I=inosina.

Os *primers* foram adaptados de van der Linden et al. (2004), Lanaud et al. (2004), Pflieger et al. (2001), Vallad et.al. (2001), Geffroy et al. (1999) e Leister et al. (1996).

O procedimento adotado para o desenvolvimento dos marcadores RGA foi constituído de três etapas:

Etapa 1 - Digestão enzimática do DNA

O DNA genômico foi digerido com quatro enzimas de restrição que geram fragmentos abruptos: *Alu*I (New England BioLabs®), HaeIII (Fermentas™) e *Ssp*I (New England BioLabs®), as quais reconhecem um sítio com 4pb e *Dra*I (Fermentas™) que reconhece um sítio com 6pb. Um total de 200ng de DNA foi digerido com 6U de enzima, em um volume total de 20µL, seguindo as recomendações dos fabricantes. A reação ocorreu em termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), a 37°C durante 4h, com posterior inativação enzimática a 80°C durante 20 min.

Etapa 2 - Preparo e ligação dos adaptadores

Os adaptadores foram preparados pela mistura equimolar de dois oligonucleotídeos para uma concentração final de 40µM. A mistura foi aquecida a 65°C por 10 min e resfriada lentamente a temperatura ambiente. A seguir, os adaptadores foram ligados às extremidades dos fragmentos gerados pela restrição, em um volume de 40µL, contendo: 20µL de DNA digerido, 0,5µL de adaptador (40µM), 4µL de tampão de ligação (10X), 1,2 unidades da enzima de ligação T4-DNA ligase (New England BioLabs®), e água destilada deionizada para completar o volume. A reação de ligação ocorreu em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied biosystems), a 16°C durante 14h, com posterior inativação das enzimas conforme recomendações do fabricante.

Etapa 3 - Amplificação dos locos RGA via PCR

As reações foram realizadas em volume de 20 µL, contendo 3 µL de DNA digerido e ligado aos adaptadores, 1,5mM de $MgCl_2$, 0,2mM de dNTP, 0,25µM do *primer* RGA, 0,25µM do *primer* complementar ao adaptador, 10X do tampão de PCR, 1U da enzima Taq DNA polimerase (Promega®) e água destilada deionizada para

completar o volume. Para garantir a amplificação de fragmentos esperados, ou seja, entre o adaptador e a região conservada de gene de resistência, os adaptadores foram desenhados de tal forma a evitar que ocorra a amplificação de fragmentos do tipo adaptador-adaptador. Por isso, há dois tipos de adaptadores (oligonucleotídeos), um deles contendo a região de anelamento do *primer*, e o outro sem a região de anelamento do *primer* com sua extremidade 3' bloqueada por um radical amino. O bloqueio da extremidade 3' de um dos oligonucleotídeos evita a sua extensão pela DNA polimerase e, dessa forma, impede a formação do sítio de anelamento do *primer* do adaptador. Assim, no primeiro ciclo de amplificação não existe no adaptador, o sítio de anelamento do *primer*, o que garante a extensão da primeira fita apenas a partir do *primer* âncora (fase linear da PCR). Esta primeira extensão ocorre até o final do fragmento, gerando assim, o sítio de anelamento do *primer* complementar ao adaptador. Então, a partir do segundo ciclo, ocorre a extensão da segunda fita (fase exponencial da PCR). As reações de amplificação foram realizadas em dois estágios. Após a desnaturação inicial de 5 min a 94°C , ocorreu um primeiro estágio, composto por 8 ciclos, com desnaturação de 45s a 94°C , anelamento de 50s com temperatura iniciando em 58°C e tendo uma redução de 1°C a cada ciclo, e extensão de 1 min a 72°C . Um segundo estágio foi programado, composto por 25 ciclos, com desnaturação de 45s a 94°C , anelamento de 50s a 50°C e extensão de 1 min a 72°C. Ao final deste ciclo ocorreu uma incubação adicional de 7 min a 72°C para extensão dos fragmentos. Foram utilizados 14 *primers* degenerados RGA e 4 enzimas de restrição, totalizando 56 combinações enzima/*primer* diferentes (Tabela 3).

Após a última etapa do processo, foi realizada a separação dos locos amplificados. Os produtos resultantes da PCR foram desnaturados através da adição de igual volume de tampão desnaturante (0,2% de azul de bromofenol, 0,2% de xileno cianol, 10mM EDTA, pH 8,0, e 95% de formamida) e aquecimento a 95ºC por 5 min. Uma alíquota de 2,5µL de cada amostra foi então aplicada em gel de poliacrilamida de 0,4mm de espessura [acrilamida/bisacrilamida (19:1) 6%, uréia 7,5M, tampão TBE 1X], o qual foi submetido a uma potência constante de 75W por cerca de 4h, usando-se um aparato de eletroforese Sequi-Gen® (Bio-Rad). *Ladders* de 100pb e 25pb foram usados como marcadores de massa molecular.

Tabela 3 – Combinações de enzimas+*primers* utilizadas para a amplificação dos locos RGA

Enzima + *primers*			
*Alu*I+NBSa-F	*Hae*III+NBSa-F	*Ssp*I+NBSa-F	*Dra*I+NBSa-F
*Alu*I +NBSa-R	*Hae*III +NBSa-R	*Ssp*I +NBSa-R	*Dra*I +NBSa-R
*Alu*I +Kdc-F	*Hae*III +Kdc-F	*Ssp*I +Kdc-F	*Dra*I +Kdc-F
*Alu*I +Kdc-R	*Hae*III +Kdc-R	*Ssp*I +Kdc-R	*Dra*I +Kdc-R
*Alu*I +Kde-F	*Hae*III +Kde-F	*Ssp*I +Kde-F	*Dra*I +Kde-F
*Alu*I +Kde-R	*Hae*III +Kde-R	*Ssp*I +Kde-R	*Dra*I +Kde-R
*Alu*I+RGP-F	*Hae*III +RGP-F	*Ssp*I +RGP-F	*Dra*I +RGP-F
*Alu*I +RGHDR2	*Hae*III +RGHDR2	*Ssp*I +RGHDR2	*Dra*I +RGHDR2
*Alu*I +P2-R	*Hae*III +P2-R	*Ssp*I +P2-R	*Dra*I +P2-R
*Alu*I +P3-F	*Hae*III +P3-F	*Ssp*I +P3-F	*Dra*I +P3-F
*Alu*I +PR5	*Hae*III +PR5	*Ssp*I +PR5	*Dra*I +PR5
*Alu*I +PR5-As	*Hae*III +PR5-As	*Ssp*I +PR5-As	*Dra*I +PR5-As
*Alu*I +Glus	*Hae*III +Glus	*Ssp*I +Glus	*Dra*I +Glus
*Alu*I +Glus-As	*Hae*III +Glus-As	*Ssp*I +Glus-As	*Dra*I +Glus-As

A coloração foi realizada com nitrato de prata ($AgNO_3$) em cinco etapas, de acordo com Creste et al. (2001), com algumas modificações, como descrito a seguir:

Etapa 1 (fixação): a fixação do gel foi feita por imersão em solução de etanol 10% e ácido acético 1%, agitando por 10 min, seguida de uma lavagem com água destilada e deionizada, durante 1 min, com agitação.

Etapa 2 (oxidação): o pré-tratamento foi realizado com solução de ácido nítrico 1,5% durante 3 min, seguindo-se uma nova lavagem do gel com água destilada deionizada durante 1 min.

Etapa 3 (impregnação com prata): a impregnação do gel foi feita em solução de nitrato de prata 0,2% durante 20 min, sob agitação, seguida de duas novas lavagens com água destilada deionizada, com duração de 30 segundos cada.

Etapa 4 (revelação): para a revelação dos géis, foi utilizada uma solução de 2L contendo 60g de Na2CO3 e 2,0mL de formaldeído (37%). Nesta etapa, 1 litro da solução foi aplicada sobre o gel até começarem a surgir bandas. Após este passo, a solução foi descartada e o outro litro foi adicionado para finalizar o processo de revelação. Após a revelação da placa, a solução foi descartada.

Etapa 5 (bloqueio): o bloqueio da revelação foi feito em solução de ácido acético 5% durante 5 min, seguindo-se de uma nova lavagem com água destilada deionizada

durante 1 min. Após este passo, para a secagem do gel, a placa foi colocada em posição vertical em um local seco e arejado, sob temperatura ambiente.

Após o processo de coloração, os géis foram genotipados sobre uma fonte de luz branca, e digitalizados por um *scanner* (Epson Expression 10000 XL). Cada loco foi analisado quanto à presença do fragmento (1) ou ausência dele (0) na população de mapeamento. Após a leitura dos dados moleculares para fins de genotipagem da população de mapeamento, foi usado um teste de aderência do x^2 para verificar a ocorrência de distorção de segregação mendeliana loco a loco. Para cada teste, foi obtido um valor de *P*, com base na hipótese H_0. Como foram feitos múltiplos testes, foi necessário considerar um nível de significância conjunto e, por isso, utilizou-se o critério da "razão de falsas descobertas" (FDR – *False Discovery Rate*), proposto por Storey e Tibshinari (2003).

Em seguida, as bandas que apresentaram segregação no gel de acrilamida foram excisadas e mantidas em 50µL de TE por 48h a temperatura ambiente. Foram realizadas reações de reamplificação nas mesmas condições adotadas na PCR anterior, mas para um volume final de 50µL e substituindo-se o DNA genômico por 5µL da eluição da banda excisada. Para verificar se houve reamplificação e se a mesma foi específica, alíquotas de 5µL de cada produto da reação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, acrescido de 0,5X de *SYBR®Safe DNA gel strain* (Promega) e visualizadas sob luz UV, utilizando-se como marcador de massa molecular *ladder* de 100pb. Nas reamplificações positivas e específicas, os produtos das reações foram purificados com auxílio do *QIAquick® PCR Purification Kit* (QIAGEN), conforme especificações do fabricante. As concentrações dos fragmentos foram estimadas a partir da eletroforese de alíquotas de 5µL de cada purificação mais 2µL do corante azul de bromofenol em gel de agarose 1%, acrescido de 0,5X de *SYBR®Safe DNA gel strain* (Promega), comparando-as com concentrações conhecidas de DNA do fago ƛ sob luz UV. Procurou-se normalizar as purificações a fim de garantir uma relação ótima entre o tamanho do inserto e a quantidade de fragmento usada nas reações de sequenciamento direto, nas quais foram utilizados de 47,5 a 110ng de DNA (a depender do comprimento do fragmento, conforme as especificações do fabricante do *kit* de sequenciamento). As reações de sequenciamento foram realizadas contendo de

4,0µL de sequencing reagent premix (DYEnamic™ ET Terminator Kit, GE Healthcare Life Sciences), 0,1µM de *primer* M13/pUC –46 *reverse* (5'-GAGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'), e água ultra-pura esterilizada para um volume final de 10 µL, além dos frgamentos de DNA. As amplificações ocorreram em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied biosystems) utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 1 min, seguida de 35 ciclos de 95°C por 20 s, 55°C por 15 s e 60°C por 1 min. As reações foram precipitadas pela adição de acetato de amônia (7,5 M) ou acetado de sódio (1,5 M) mais EDTA (250 mM), conforme as especificações do fabricante do *kit* de sequenciamento, e etanol absoluto gelado, sendo cada *pellet* ressuspendido em 10 µL de formamida. A injeção e a eletroforese capilar no sequenciador automático ABI PRISM® 3100 (Applied Biosystems) foram realizadas, por técnico especializado, no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC, USP/ESALQ, Piracicaba-SP). O *software* CODONCODE ALIGNER foi usado para a visualização dos eletroferogramas e correção das sequências de nucleotídeos.

3.5.2 Marcadores TRAP

Para o desenvolvimento dos marcadores TRAP foram testados os mesmos *primers* utilizados no desenvolvimento das marcas RGA (Tabela 2). No caso do TRAP, esses *primers* são chamados fixos, e um *primer,* denominado arbitrário, é utilizado também. Neste estudo utilizou-se o *primer* arbitrário Arbi1, cuja sequência é 5'GACTGCGTACGAATTAA3'. As reações ocorreram em um volume final de 15 µL contendo os seguintes componentes: 20ng/µL de DNA genômico, 1,5mM de $MgCl_2$, 0,20 mM de dNTPs, 0,5µM de *primer* arbitrário e 0,8µM de *primer*, 1X de tampão de reação Go Taq (Promega®), 1U de Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega®) e água Milli-Q autoclavada para completar o volume. A PCR se deu em termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), iniciando pela desnaturação do DNA a 94°C por 3 min, seguida por duas etapas. A primeira foi constituída de cinco ciclos, de uma desnaturação a 94°C por 50s , anelamento a 35°C por 50s e extensão a 72°C por 1 min. A segunda etapa teve 35 ciclos, compostos de desnaturação a 94°C por 50s,

anelamento a 50°C por 50s e extensão 72°C por 1 min, se encerrando com uma extensão final a 72°C por 7 min.

As etapas posteriores, como separação dos produtos amplificados pela PCR através de eletroforese, coloração dos géis de poliacrilamida e genotipagem das marcas TRAP ocorreram conforme descrito anteriormente para os marcadores RGA.

3.6 Atribuição de marcas RGA e TRAP no mapa de ligação integrado de *Passiflora alata*

O mapa integrado de maracujá-doce, construído por Nunes (2010) e adensado por Pereira (2010), consiste de um arcabouço de marcas AFLP (296), vários locos SSR (59), M-AFLPs (106) e um SNP.

Para a introdução de novas marcas no mapa de ligação foram usados os dados do mapa de Nunes (2010) e Pereira (2010). Para a verificação de possíveis distorções da segregação esperada, os resultados observados para cada loco marcador foram submetidos ao teste de aderência do qui-quadrado (x^2) corrigido pelo critério de Bonferroni, que considera um nível de significância conjunto já que são feitos múltiplos testes. As marcas que apresentaram distorção das proporções mendelianas no teste de aderência não foram utilizadas na construção do mapa de ligação.

A análise para estimar simultaneamente a fração de recombinação e a fase de ligação utilizando o método proposto por Wu et al. (2002) baseou-se na abordagem multiponto implementada no OneMap v. 1.1-1 (MARGARIDO; GARCIA; SOUZA, 2007), pacote do *software* estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010). O conjunto de dados englobou, além dos locos marcadores uniparentais dos tipos D1 e D2 (1:1), os locos com as outras configurações genéticas, A (1:1:1:1), B (1:2:1) e C (3:1). Tomando por base a Tabela 1 de tipos de cruzamentos de acordo com Wu et al. (2002), cada alelo foi codificado com letras de *a*, *b*, *c* e *d*, sendo cada um deles codominante em relação aos demais, enquanto a ausência foi codificada como *o* (alelos nulos) e tratada como recessiva.

Inicialmente, para determinar os grupos de ligação, foram feitos testes de dois pontos (função '*twopts*') entre as marcas utilizando o algoritmo *Expectation*

Maximization (EM) (DEMPSTER; LAIRD; RUBIN, 1977). Para tanto, as marcas foram designadas para os diferentes grupos de ligação usando como critérios LOD *score* mínimo de 5,6 e fração de recombinação igual a 0,5. No ordenamento das marcas, a análise multiponto utilizou cálculos de verossimilhança via cadeias ocultas de Markov (LANDER; GREEN, 1987; WU et al. 2002) implementados no algoritmo EM (*Expectation Maximization*). Com base nesta metodologia, foi realizada a ordenação das marcas nos respectivos GL, usando a função '*order.seq',* a qual as ordena com o auxílio de duas outras funções: '*compare'* (compara todas as possíveis ordens dos marcadores em uma sequência) e '*try.seq'* (tenta inserir marcadores em um determinado grupo de ligação). Foram avaliadas 60 possíveis ordens exaustivamente; em seguida, uma nova marca foi escolhida e o processo foi reiniciado; tal processo foi repetido até que todas as marcas fossem posicionadas no *framework* (MOLLINARI et al. 2009). Foi utilizado o algoritmo *'ripple'* (LANDER et al. 1987) para verificar possíveis erros no ordenamento, o qual também foi usado em todos os mapas de *P. alata* previamente construídos (NUNES, 2010; PEREIRA, 2010). Finalmente, utilizando a função '*map'*, foram desenhados os GL a partir da estimativa multiponto. Para converter as frequências de recombinação em distâncias de mapa, expressas em centiMorgans (cM), foi adotada a função de mapeamento de Kosambi (1944).

O desenho do mapa final resultante dessa análise foi realizado no *software* MapChart v. 2.2 (VOORRIPS, 2002).

3.7 Detecção e mapeamento de QTL

As análises de QTL foram realizadas utilizando-se as médias fenotípicas dos caracteres que apresentaram variabilidade genética, quais sejam: diâmetro médio de frutos (DF), comprimento médio de frutos (CF), peso médio de frutos (PF), espessura média da casca (EC), peso médio da casca (PC), peso médio da polpa (PP), teor de sólidos solúveis totais (SST), número de frutos (NF), produção (PR). Foram utilizados os dados fenotípicos dos 100 indivíduos da população F_1, avaliados em dois ambientes e em dois anos de produção e os dados moleculares de 180 indivíduos da mesma população F_1 (os 100 indivíduos instalados em campo + 80 indivíduos provenientes do mesmo cruzamento que gerou essa F_1).

3.7.1 Mapeamento por intervalo composto

O mapa de ligação gerado, conforme descrito anteriormente, foi usado para fins de mapeamento de locos quantitativos, pelo método de mapeamento por intervalo composto (CIM). As análises foram feitas utilizando o modelo genético estatístico proposto por Gazaffi (2009), modelo este que permite mapear locos quantitativos em populações F_1 segregantes, oriundas do cruzamento simples entre irmãos-germanos.

Metodologia e modelo estatístico - A partir de uma progênie de irmãos-germanos, oriundos do cruzamento entre dois genitores P e Q, não aparentados, diplóides e com mapa de ligação conhecido (Figura 5), sendo m e m+1 marcadores que flaqueiam um intervalo definido, com alelos 1 ou 2, tem-se quatro arranjos para os genótipos destes locos $P^{\{1,2\}}{}_m$, $P^{\{1,2\}}{}_{m+1}$, $Q^{\{1,2\}}{}_m$ *e* $Q^{\{1,2\}}{}_{m+1}$, em que {1,2} indicam os possíveis alelos de cada loco. Pressupondo a presença de um QTL neste dado intervalo, cujos alelos são representados por P^1 e P^2, para o genitor P e Q^1 e Q^2, para o genitor Q, assume-se que os alelos P^1 e Q^1 tem efeito positivo sobre o fenótipo. Tal cruzamento está representado na figura 5.

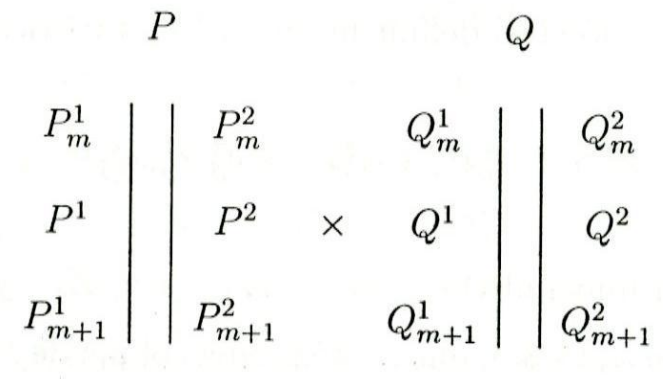

Figura 5 – Representação do cruzamento entre os genitores P e Q, com os quatro arranjos para os genótipos dos locos quantitativos $P\{1,2\}m$, $P\{1,2\}m+1$, $Q\{1,2\}m$ *e* $Q\{1,2\}m+1$,sendo os alelos dos marcadores m e m+1, P1, P2, Q1 e Q2 os alelos dos QTL

As possíveis classes genotípicas para os QTL são P^1Q^1, P^1Q^2, P^2Q^1 e P^2Q^2, sendo a respectiva segregação esperada de 1:1:1:1. Sendo assim, é possível definir três contrastes ortogonais entre as médias genotípicas das quatro classes:

$$P^1Q^1+P^1Q^2-P^2Q^1-P^2Q^2$$

$$P^1Q^1-P^1Q^2+P^2Q^1-P^2Q^2$$

$$P^1Q^1-P^1Q^2-P^2Q^1+P^2Q^2$$

Os dois primeiros contrastes referem-se aos efeitos aditivos dos QTL nos genitores P e Q, respectivamente, e o terceiro refere-se à interação devido à dominância dos efeitos aditivos de cada genitor. Nesta metodologia, o genótipo de cada QTL é inferido com base nos genótipos dos marcadores flanqueadores. Assumiu-se que as probabilidades condicionais para os genótipos dos QTL são multiponto, sendo que foram obtidas a partir do mapa de ligação construído via HMM, usando o *software* OneMap (MARGARIDO et al., 2007). O mapeamento proposto é explicado pelo seguinte modelo estatístico (1):

$$yj=Z_J\gamma+\alpha_p*x_{pj}{}^*+\alpha_q{}^*x_{qj}{}^*+\delta_{pq}{}^*\ x_{pj}{}^*x_{qj}{}^*+\epsilon_j \qquad (1)$$

em que:

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

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

γ é o vetor de parâmetros (1+3c) x 1 contendo o intercepto (μ) e coeficientes de regressão linear múltipla (αp, αq e δpq) para os cofatores;

α_{p^*} e α_{q^*} são os efeitos aditivos para o QTL nos genitores P e Q, respectivamente;

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

ϵ_j é o erro com ~ N(0, σ2).

Na análise, o genitor P refere-se a SV3 e o genitor Q refere-se a 2(12). Na tabela 4 são apresentados os valores que x_{pj^*} e x_{qj^*} podem assumir.

Tabela 4 – Valores de x_{pj^*} e x_{qj^*} de acordo com a configuração genotípica dos genitores

$xpj*$		$xqj*$	
Valor	Condição	Valor	Condição
1	P^1Q^1	1	P^1Q^1
1	P^1Q^2	−1	P^1Q^2
−1	P^2Q^1	1	P^2Q^1
−1	P^1Q^2	−1	P^1Q^2

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

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

O procedimento de busca por QTL foi realizado através da comparação da verossimilhança dos modelos, considerando a presença de um possível QTL (H_α: pelo menos um efeito diferente de zero) *versus* modelo sem QTL (H_0: H_0:$\alpha p*=\alpha q*=\delta pq*=0$).

Após a identificação dos QTLs, foram feitas inferências a respeito das fases de ligação dos mesmos, com base nos sinais das estimativas de α^*_p α^*_q. Na definição dos contrastes, adotou-se a configuração $P^1_m P^1 P^1_{m+1}/P^2_m P^2 P^2_{m+1} \times Q^1_m Q^1 Q^1_{m+1}/Q^2_m Q^2 Q^2_{m+1}$, assumindo que os alelos P^1 e Q^1 causam aumento no valor fenotípico. Definiu-se tal configuração como sendo de associação em ambos os genitores, o que implica em estimativas positivas para α^*_p α^*_q (Figura 5). Caso outras configurações ocorressem, simplesmente, surgiriam mudanças nos sinais das estimativas. No entanto, independente da configuração real, os contrastes definidos para o desenvolvimento do modelo sempre testaram os mesmos efeitos, exceto para os sinais. Neste contexto, a determinação da fase de ligação entre marcadores e QTL pôde ser inferida de forma simples, com a identificação dos alelos que promovem o aumento ou redução do valor fenotípico, não sendo portanto necessário incluir as fases de ligação no modelo, como feito por Lin et al. (2003).

A segregação dos QTL depende das relações de dominância entre os alelos. Para inferi-las, diversas hipóteses estatísticas apropriadas já foram definidas por Gazaffi (2009). Tais hipóteses foram testadas apenas nas posições para as quais QTL foram mapeados numa primeira etapa, evitando, dessa forma, os problemas de realização de

múltiplos testes. Assim, foi estabelecido um procedimento em duas etapas para mapear os QTL, identificando seus efeitos, a fase de ligação e o padrão de segregação. Inicialmente, fez-se uma busca pelo genoma por possíveis QTL, testando-se simultaneamente a significância dos efeitos α^*_{p} , α^*_{q} e δ^*_{pq}.

Nas posições com evidências da presença de QTL, testes complementares foram conduzidos (H_{01}, H_{02} e H_{03}). Se apenas um efeito foi significativo, concluiu-se que há segregação 1:1 e as fases de ligação foram facilmente inferidas. Caso mais de uma estimativa fosse significativa, testes complementares foram necessários e realizados considerando os sinais dessas estimativas. Para as situações nas quais dois efeitos foram estatisticamente significativos, testes sobre igualdade desses efeitos foram realizados, sendo possível inferir se a segregação era 1:2:1 ou 1:1:1:1. Quando o QTL apresentou todos os efeitos significativos, fez-se necessário testar três hipóteses complementares H_{04}, H_{05} e H_{06} (GAZAFFI, 2009). Neste caso, se todas as hipóteses não foram rejeitadas, concluiu-se que a segregação era 3:1. Nas situações em que apenas uma hipótese não foi rejeitada, concluiu-se que a segregação era 1:2:1. Nos demais casos, concluiu-se que a segregação era 1:1:1:1. Em todos os casos, as fases de ligação foram deduzidas a partir dos sinais das estimativas, segundo proposto por Gazaffi (2009).

Para a seleção de cofatores foram empregados, métodos de regressão múltipla entre fenótipos e marcadores, com a seleção de modelos utilizando o critério de informação bayesiano, ou BIC (SCHWARZ, 1978), até a seleção do modelo final com no máximo $2n$ parâmetros para evitar super-parametrizações (SAKAMOTO; KITAGAWE; ISHIGURO, 1986; WANG; BASTEN; ZENG, 2007). As análises foram desenvolvidas num *software* usando ambiente de programação R (R Development Core Team, 2010), que deve ser disponibilizada segundo A.A.F.GARCIA (Comunicação pessoal).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises fenotípicas

As análises dos dados fenotípicos para o segundo ano de produção foi bastante prejudicada em um dos ambientes onde estava instalado o experimento. Isto ocorreu em virtude da incidência de uma doença fúngica, a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). A antracnose é encontrada em todas as regiões que cultivam maracujá no Brasil e tem grande importância por surgir na parte aérea das plantas em qualquer idade, sendo difícil o seu controle quando as condições climáticas são propícias às epidemias (JUNQUEIRA et al*.,* 2005).

O fungo é disseminado por sementes, respingos de chuva, insetos e implementos agrícolas. O surgimento da antracnose é favorecido pela elevada umidade, principalmente com chuvas freqüentes e abundantes e temperatura média (26 e 28ºC), ocasionando o desfolhamento, morte dos ponteiros e podridão de frutos. O patógeno sobrevive em restos de cultura e tecidos afetados na própria planta, fazendo com que a doença seja mais freqüente e severa em determinada área a partir do segundo ano de cultivo (LIBERATO, 2002).

Segundo registros da Estação Meteorológica Automatizada do Posto Meteorológico do Departamento de Engenharia de Biossistemas (LEB – ESALQ – USP) localizado em latitude 22° 42' 30" sul e longitude de 47° 38' 00" oeste, a uma altitude de 546m em Piracicaba, SP, o ano de 2010 foi atípico com relação às chuvas, quando comparado aos últimos dez anos (Tabela 5).

Pode-se observar na Tabela 5 que a média de precipitação para o ano de 2010, mesmo quando se considera apenas o primeiro semestre, já é relativamente alta, comparativamente aos demais anos. Um fator importante são as precipitações dos meses de Janeiro a Março, justamente quando ocorre o pico de produção do maracujazeiro, onde se observaram maiores níveis de chuvas quando comparados ao ano anterior.

Tabela 5 – Precipitação em milímetros (mm) entre os anos de 2000 a 2010 em Piracicaba, SP

Anos	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Média
2000	235,9	124,0	185,3	0,8	5,3	5,2	60,4	84,4	91,2	114,2	239,2	196,2	111,84
2001	229,6	92,7	164,2	24,1	60,6	19,9	27,2	44,2	48,4	173,3	152,4	204,2	103,40
2002	320,2	187,9	272,4	27,2	112,4	0,0	23,4	79,6	45,6	49,4	176,4	164,7	121,60
2003	302,4	58,6	180,9	55,2	54,7	9,2	16,4	17,8	12,1	89,2	168,0	139,9	92,03
2004	196,4	194,0	79,1	92,3	105,9	49,7	78,4	0,0	7,1	156,9	105,9	99,8	97,13
2005	238,7	67,8	111,6	30,7	164,3	42,5	8,1	24,1	38,4	120,4	117,8	127,1	90,96
2006	240,5	176,2	154,0	33,7	2,0	18,6	32,4	17,4	54,7	80,3	200,2	251,7	105,14
2007	267,0	241,9	80,5	36,8	58,4	22,6	169,3	0,0	1,9	92,6	120,3	188,6	106,66
2008	418,5	153,7	132,4	174,6	72,4	43,5	0,0	68,7	46,1	108,7	24,3	153,0	116,33
2009	162,0	143,5	125,1	21,8	10,6	55,1	61,6	61,4	143,8	56,7	196,5	274,3	109,37
2010	250,2	158,6	99,0	76,4	24,4	16,7							104,22

Tais condições climáticas foram pontos limitantes à continuação e tomada de dados no segundo ano de produção em Descalvado, em virtude de terem sido criadas condições muito favoráveis ao desenvolvimento do patógeno causador da antracnose e condições que dificultaram, chegando a impossibilitar, o controle da doença no pomar.

Nas figuras de 6 a 8 são mostradas comparações entre plantas sadias e plantas infectadas pelo fungo causador da antracnose no mesmo local de cultivo.

Figura 6 – À esquerda uma planta totalmente debilitada e desfolhada devido à ocorrência da antracnose; à direita uma planta saudável de mesmo genótipo e cultivada no mesmo local da primeira planta

Figura 7 – À esquerda um fruto com a base mole e totalmente fermentado em consequência da doença; à direita um fruto perfeitamente saudável e com todas as características de qualidade exigidas pelo mercado consumidor

Figura 8 – Aspecto do campo experimental localizado em Descalvado, SP, atacado pela doença no ano de 2010 (acima); aspecto do campo sadio em fase de floração no mesmo local, no ano de 2009

4.1.1 Análises das médias

As análises dos dados fenotípicos foram tomadas com base em 100 indivíduos da população F_1, dois anos de produção, 2009 e 2010, e em dois locais distintos, sendo eles Anhembi e Descalvado. Cada caráter foi analisado e discutido aqui com base nas médias obtidas nos experimentos. Dessa forma, foram apresentados também os dados de produção dos tratamentos que não foram perdidos de Descalvado em 2010. Futuramente, uma análise visando obter as estimativas de parâmetros genéticos e estatísticos será realizada para que se dê continuidade ao presente trabalho.

4.1.1.1 Diâmetro médio de fruto (DF)

Na tabela 6 estão apresentadas as médias do caráter diâmetro médio de fruto. Essa medida foi realizada em milímetros e tomada através da utilização de paquímetro digital.

Através dos dados da tabela 6 pode-se observar uma evidente variabilidade para o caráter diâmetro de frutos, variando de 35,27 a 83,34 mm. Foi observado que houve, aparentemente, uma redução no diâmetro dos frutos de um ano para o outro. Considerando que está se tratando de caracteres quantitativos, como esperado, alguns genótipos aparentemente apresentaram maiores diâmetros em Anhembi, enquanto outros se desenvolveram melhor em Descalvado em função da interação genótipo x ambiente.

A figura 9 mostra a dispersão dos dados do caráter DF nos dois locais e nos dois anos de produção avaliados.

Tabela 6 – Diâmetro médio de frutos (mm) em Anhembi e Descalvado nos anos de produção 2009 e 2010

Diâmetro médio de fruto (DF)					Diâmetro médio de fruto (DF)				
Genótipo	A2009	A2010	D2009	D2010	Genótipo	A2009	A2010	D2009	D2010
8	64,64	63,81	63,73	60,64	87	62,65	62,31	71,42	65,86
9	75,21	73,85	79,44	72,00	88	65,50	63,98	73,01	64,98
10	73,40	73,39	75,46	72,60	89	69,47	69,91	70,36	.
11	75,04	75,40	75,73	67,43	91	73,09	71,13	76,14	.
12	69,64	70,42	74,20	70,30	92	63,88	60,70	67,72	63,46
13	72,04	69,91	70,43	64,69	93	62,74	62,65	65,67	.
14	74,12	72,16	70,02	70,82	94	81,72	70,71	75,80	74,16
15	71,51	67,77	64,01	68,01	95	75,70	75,12	80,55	67,83
16	65,76	67,01	65,08	66,22	96	60,79	61,03	67,06	68,24
17	64,24	65,50	65,10	69,01	97	69,05	66,95	67,94	60,99
18	69,28	65,16	72,55	71,01	98	63,29	62,53	69,44	61,56
20	71,80	71,96	74,79	69,35	99	62,39	64,54	60,05	72,67
21	81,72	78,55	83,34	74,62	100	74,49	73,40	73,35	68,00
37	74,83	74,63	67,22	62,46	102	76,23	74,68	78,58	.
43	78,11	74,75	69,90	.	103	72,13	72,56	82,17	79,16
44	70,02	69,72	65,71	63,48	106	81,05	81,65	73,92	82,93
45	69,80	69,29	67,10	.	107	77,18	75,77	74,31	77,44
47	77,08	80,22	75,88	68,84	109	78,46	77,44	71,72	.
48	64,99	65,56	70,56	68,98	110	72,74	72,40	76,03	65,70
49	81,04	80,26	78,40	76,48	111	67,64	70,26	36,75	.
50	75,78	76,98	70,70	70,80	113	68,76	74,98	65,40	.
52	63,53	64,72	65,68	67,34	114	68,92	68,67	72,33	.
53	69,97	69,40	67,43	.	115	63,35	66,21	69,49	78,33
54	68,88	69,27	74,18	70,87	122	72,92	64,16	69,60	66,46
55	69,82	67,75	68,42	68,96	123	69,81	69,66	68,27	65,91
56	71,69	72,11	74,37	70,77	124	71,86	67,36	69,23	.
58	70,39	70,31	69,90	71,53	125	73,90	73,67	78,26	76,77
59	72,34	73,17	75,11	71,88	126	71,88	64,64	69,69	67,13
60	55,00	71,38	72,41	69,02	127	72,10	63,77	71,24	.
61	78,75	70,80	74,20	70,93	129	76,95	73,72	72,97	.
62	60,69	64,23	63,67	57,25	130	72,65	71,95	68,13	.
63	71,27	70,46	80,73	67,27	132	74,54	68,74	76,29	.
64	76,93	75,91	70,60	72,30	134	72,79	75,97	74,89	65,21
65	73,51	73,78	62,59	67,01	135	72,12	73,02	74,42	.
66	68,28	70,42	73,38	66,74	136	77,84	71,54	79,92	.
67	70,98	71,59	74,39	76,45	137	75,73	74,68	79,04	78,17
68	69,61	65,65	62,97	63,70	138	73,17	71,92	71,38	.
69	61,29	61,10	69,02	.	139	73,08	70,82	70,91	.
71	73,96	73,91	71,69	65,16	140	77,34	79,01	69,98	70,85
73	70,96	68,23	69,11	66,22	143	66,20	67,78	71,68	.
74	67,69	69,85	76,54	70,12	144	70,94	78,40	72,45	73,72
76	68,89	68,06	62,01	61,17	145	72,44	70,64	64,17	72,46
77	72,88	73,89	67,36	69,61	147	66,52	62,89	64,69	61,20
78	74,33	64,92	65,50	.	148	65,61	61,69	35,27	.
79	68,70	66,21	71,29	71,92	149	68,05	67,97	66,99	59,74
82	64,16	74,45	69,47	72,03	150	70,02	66,89	63,75	58,31
83	74,80	74,68	77,49	.	151	63,91	68,08	71,00	60,29
84	72,84	71,55	73,81	65,28	152	68,25	64,78	36,20	75,86
85	77,65	78,41	76,70	72,28	153	67,87	67,31	72,26	.
86	66,67	65,10	70,41	70,69	154	63,48	62,84	35,03	67,07

Nota: A2009 = dados de Anhembi em 2009; A2010 = dados de Anhembi em 2010; D2009 = dados de Descalvado em 2009; D2010 = dados de Descalvado em 2010

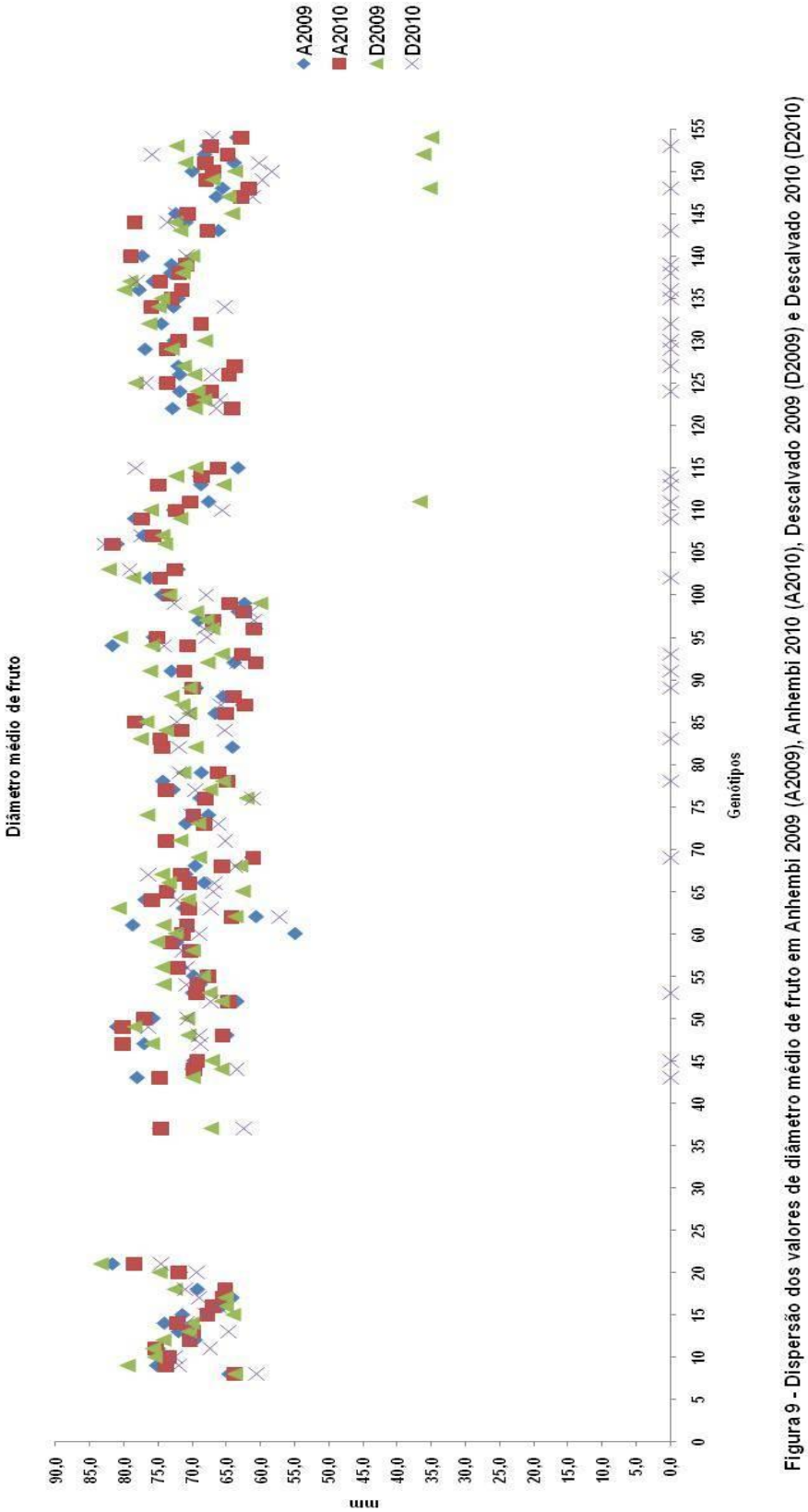

Figura 9 - Dispersão dos valores de diâmetro médio de fruto em Anhembi 2009 (A2009), Anhembi 2010 (A2010), Descalvado 2009 (D2009) e Descalvado 2010 (D2010)

4.1.1.2 Comprimento médio de fruto (CF)

Na tabela 7 estão apresentadas as médias do caráter comprimento médio de fruto. Essa medida foi realizada em milímetros e tomada através da utilização de paquímetro digital.

Também para este caráter foi observada uma acentuada variabilidade genética na população. Os valores de comprimento de fruto variaram de 58,9 a 138,64 mm evidenciando uma variabilidade bastante significativa. Foi observado que houve, aparentemente, redução e aumento no comprimento dos frutos de um ano para o outro. Da mesma forma que para o caráter anterior, conclui-se que por se tratarem de carcateres quantitativos, cuja interação com o ambiente é esperada, essa variação, apesar de bastante acentuada, está de condizente. Moraes (2005) também encontrou uma grande variabilidade em uma população F_1 de maracujá amarelo para os caracteres DF e CF. Esse mesmo autor mostrou que esses caracteres são correlacionados positivamente, portanto o comportamento de um caráter interfere diretamente no comportamento do outro.

A figura 10 mostra a dispersão dos dados do caráter CF nos dois locais e nos dois anos de produção avaliados.

Tabela 7 – Comprimento médio de frutos (mm) em Anhembi e Descalvado nos anos de produção 2009 e 2010

Comprimento médio de fruto (CF)					Comprimento médio de fruto (CF)				
Genótipo	**A2009**	**A2010**	**D2009**	**D2010**	**Genótipo**	**A2009**	**A2010**	**D2009**	**D2010**
8	96,64	95,64	97,92	93,91	87	105,57	106,36	112,22	110,06
9	118,40	120,16	124,47	123,36	88	106,71	101,77	120,40	108,84
10	124,09	124,90	122,47	131,30	89	110,95	111,00	104,94	.
11	113,68	113,99	114,46	104,72	91	109,57	108,22	114,08	.
12	111,68	117,65	122,09	114,96	92	108,29	108,95	119,53	120,05
13	128,72	126,23	127,64	122,73	93	101,46	101,88	108,46	.
14	113,74	112,04	110,57	115,43	94	118,80	110,76	114,91	116,06
15	115,31	104,63	98,42	114,61	95	113,51	111,49	114,78	105,86
16	105,44	114,46	108,52	113,74	96	102,91	103,19	113,31	122,53
17	96,72	98,78	100,47	106,37	97	114,77	112,92	116,13	113,22
18	109,27	102,86	112,65	115,30	98	111,69	111,12	117,89	114,46
20	112,72	112,97	112,14	109,67	99	99,54	102,15	92,23	113,44
21	125,58	121,62	132,68	116,31	100	113,64	112,02	125,35	113,38
37	115,97	116,16	108,17	98,44	102	128,17	120,96	120,70	.
43	128,80	124,42	117,44	.	103	123,48	124,28	130,54	132,05
44	106,85	106,46	105,37	101,22	106	133,72	136,11	114,69	136,48
45	104,99	103,97	104,71	.	107	129,57	126,55	118,60	127,83
47	119,30	121,06	121,53	110,58	109	117,85	117,98	112,01	.
48	96,93	95,56	107,85	112,18	110	118,63	115,78	121,39	108,59
49	132,80	133,08	125,82	130,33	111	112,06	113,28	58,90	.
50	113,75	116,00	100,78	112,67	113	120,81	124,06	110,39	.
52	101,17	100,17	115,41	120,55	114	107,11	106,54	109,70	.
53	110,14	108,89	103,17	.	115	115,92	118,19	120,73	132,84
54	99,74	101,69	108,77	107,61	122	114,48	104,98	112,57	112,57
55	105,12	103,73	99,82	99,57	123	113,10	116,99	114,75	117,59
56	112,37	112,67	113,55	114,09	124	111,59	105,17	109,92	.
58	118,54	113,55	114,95	124,70	125	111,37	113,11	115,08	119,44
59	124,90	125,87	130,92	118,52	126	122,73	109,24	109,65	106,64
60	102,23	101,12	112,64	115,76	127	117,33	100,52	113,90	.
61	109,90	102,90	110,46	117,81	129	120,27	115,50	115,76	.
62	106,17	105,97	106,68	108,81	130	111,64	107,21	103,49	.
63	116,78	116,28	138,64	106,60	132	111,88	106,49	110,61	.
64	111,56	109,01	104,33	115,32	134	113,96	117,61	114,35	99,75
65	124,21	123,40	48,96	114,16	135	110,91	112,71	115,95	.
66	117,53	122,65	120,26	115,78	136	123,68	113,19	126,92	.
67	119,92	120,64	121,30	139,21	137	127,65	124,65	130,64	132,20
68	114,07	110,24	109,29	105,18	138	108,53	112,47	111,87	.
69	105,49	102,66	115,74	.	139	111,12	108,11	110,40	.
71	117,42	123,61	117,19	108,56	140	119,96	119,02	120,40	116,61
73	113,80	113,06	113,63	115,75	143	102,22	104,53	106,55	.
74	105,06	107,73	113,39	111,97	144	128,84	133,65	126,47	128,67
76	116,40	115,20	101,14	110,54	145	115,94	115,19	111,52	117,09
77	103,27	105,22	100,88	110,00	147	110,38	105,15	110,45	107,84
78	121,08	112,26	110,12	.	148	107,69	101,47	58,50	.
79	111,34	110,27	113,88	115,15	149	113,04	112,16	112,44	98,78
82	105,50	116,85	109,06	120,67	150	123,60	119,92	109,20	135,09
83	118,85	118,01	136,04	.	151	95,71	102,77	105,40	93,57
84	120,94	116,41	125,86	113,18	152	107,76	111,30	53,67	120,76
85	134,92	136,04	129,93	122,91	153	115,69	119,30	121,70	.
86	112,86	116,53	124,72	125,34	154	102,18	105,30	59,41	113,76

Nota: A2009 = dados de Anhembi em 2009; A2010 = dados de Anhembi em 2010; D2009 = dados de Descalvado em 2009; D2010 = dados de Descalvado em 2010

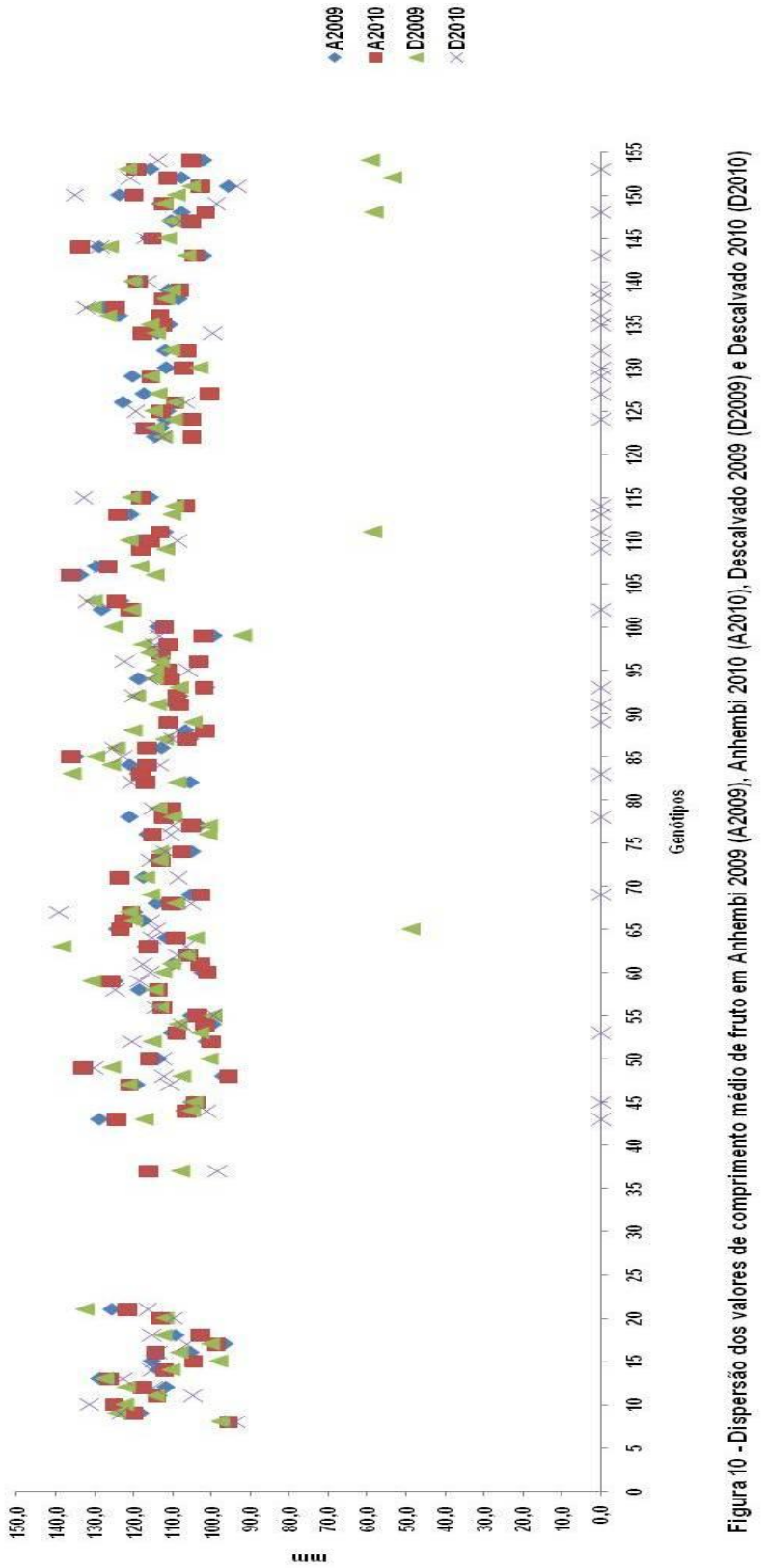

Figura 10 - Dispersão dos valores de comprimento médio de fruto em Anhembi 2009 (A2009), Anhembi 2010 (A2010), Descalvado 2009 (D2009) e Descalvado 2010 (D2010)

4.1.1.3 Peso médio de fruto (PF)

Na tabela 8 estão apresentadas as médias do caráter peso médio de fruto. Essa medida foi realizada em gramas e tomada através da utilização de balança digital.

Mais uma vez a variabilidade genética foi bastante evidente. Os frutos apresentaram valores que variaram de 95,58 a 319,18 g. Aparentemente não se observaram diferenças muito discrepantes no peso dos frutos entre os dois anos de avaliação. As diferenças mais evidentes foram entre os dois locais estudados. Também, como discutido anteriormente, deve haver uma forte interação dos genótipos com os ambientes avaliados. O genótipo 78 mostrou ter se desenvolvido melhor em Anhembi do que em Descalvado. Já o genótipo 115 apresentou comportamento exatamente oposto, apresentando frutos mais pesados em Descalvado (Tabela 8).

A figura 11 mostra a dispersão dos dados do caráter PF nos dois locais e nos dois anos de produção avaliados.

Tabela 8 – Peso médio de frutos (g) em Anhembi e Descalvado nos anos de produção 2009 e 2010

Peso médio de fruto (PF)						Peso médio de fruto (PF)				
Genótipo	**A2009**	**A2010**	**D2009**	**D2010**		**Genótipo**	**A2009**	**A2010**	**D2009**	**D2010**
8	133,19	130,33	127,04	118,04		87	138,08	139,68	178,80	172,75
9	210,99	199,26	257,88	228,51		88	166,62	139,17	209,12	189,87
10	231,26	237,27	220,90	259,59		89	189,07	187,98	157,11	.
11	192,59	184,83	177,91	154,77		91	194,33	179,52	210,22	.
12	180,75	172,78	220,78	193,08		92	148,87	111,70	171,44	142,05
13	213,73	175,35	196,17	194,50		93	117,54	120,89	144,55	.
14	213,21	196,35	190,21	214,71		94	244,44	203,73	188,29	233,79
15	202,35	157,92	124,04	208,76		95	235,36	221,71	276,47	176,63
16	139,78	156,27	136,26	180,35		96	128,61	128,33	197,05	242,86
17	129,54	137,61	142,45	190,05		97	181,38	167,49	181,83	150,61
18	166,86	127,03	188,84	202,96		98	148,59	145,23	176,85	148,55
20	176,85	172,65	203,93	183,13		99	124,38	135,68	94,42	193,74
21	286,91	256,51	326,02	237,50		100	174,01	167,09	215,57	202,88
37	217,31	205,74	152,98	150,23		102	238,59	210,16	216,05	.
43	258,20	237,49	214,48	.		103	219,95	226,54	284,32	282,14
44	159,60	158,65	148,29	149,76		106	307,07	317,89	222,04	319,18
45	177,73	175,62	142,00	.		107	268,38	254,09	228,70	285,40
47	240,13	259,87	218,73	182,47		109	232,41	223,34	216,01	.
48	140,54	134,63	156,32	203,42		110	186,48	179,34	214,19	170,00
49	311,14	306,74	256,49	286,29		111	157,13	149,47	108,18	.
50	249,24	243,56	180,15	257,46		113	187,41	247,72	147,13	.
52	124,65	133,84	167,26	203,23		114	196,26	187,62	193,79	.
53	189,09	206,30	153,40	.		115	147,28	162,59	186,60	229,33
54	159,98	164,74	199,20	205,15		122	188,69	168,27	194,30	181,93
55	164,62	145,10	149,02	139,34		123	197,49	181,57	181,41	173,90
56	180,74	181,65	177,43	193,84		124	184,51	138,94	157,37	.
58	196,75	175,72	185,02	202,35		125	205,27	208,31	243,06	245,11
59	227,90	234,89	276,83	212,88		126	187,26	166,16	148,73	145,20
60	113,24	151,37	193,25	217,23		127	186,30	124,30	218,07	.
61	244,70	159,52	221,11	219,47		129	204,80	183,64	202,35	.
62	133,67	138,92	148,82	142,17		130	206,34	200,93	142,02	.
63	218,13	203,36	363,77	197,73		132	195,07	154,06	161,92	.
64	216,90	205,11	143,78	205,51		134	212,36	220,21	225,35	161,11
65	224,98	226,45	120,77	202,64		135	214,66	216,86	254,74	.
66	164,75	196,55	215,18	189,53		136	239,47	168,59	282,16	.
67	190,69	193,66	219,61	234,55		137	236,33	229,03	276,97	282,63
68	175,44	130,60	152,85	150,82		138	212,71	178,20	222,41	.
69	130,84	131,72	180,77	.		139	201,85	181,44	184,91	.
71	199,48	207,78	168,55	136,71		140	229,38	193,77	214,07	199,10
73	192,33	156,23	174,48	191,04		143	131,18	146,04	146,06	.
74	168,85	183,87	217,68	201,66		144	183,59	228,95	200,16	244,11
76	174,20	166,69	108,77	148,61		145	172,09	164,74	138,96	215,50
77	175,70	185,28	155,78	206,66		147	155,64	119,07	148,76	150,44
78	237,32	151,46	167,59	.		148	165,37	127,20	102,16	.
79	184,10	148,97	190,56	226,88		149	167,89	160,76	172,55	119,09
82	125,46	174,82	145,95	211,45		150	211,19	191,19	141,59	156,96
83	245,59	246,38	289,63	.		151	122,43	150,27	162,97	128,76
84	211,13	193,47	218,86	176,27		152	157,59	169,01	85,90	238,82
85	304,15	310,70	278,32	242,27		153	187,28	182,74	206,93	.
86	177,54	154,99	241,46	224,27		154	130,30	129,18	95,58	161,69

Nota: A2009 = dados de Anhembi em 2009; A2010 = dados de Anhembi em 2010; D2009 = dados de Descalvado em 2009; D2010 = dados de Descalvado em 2010

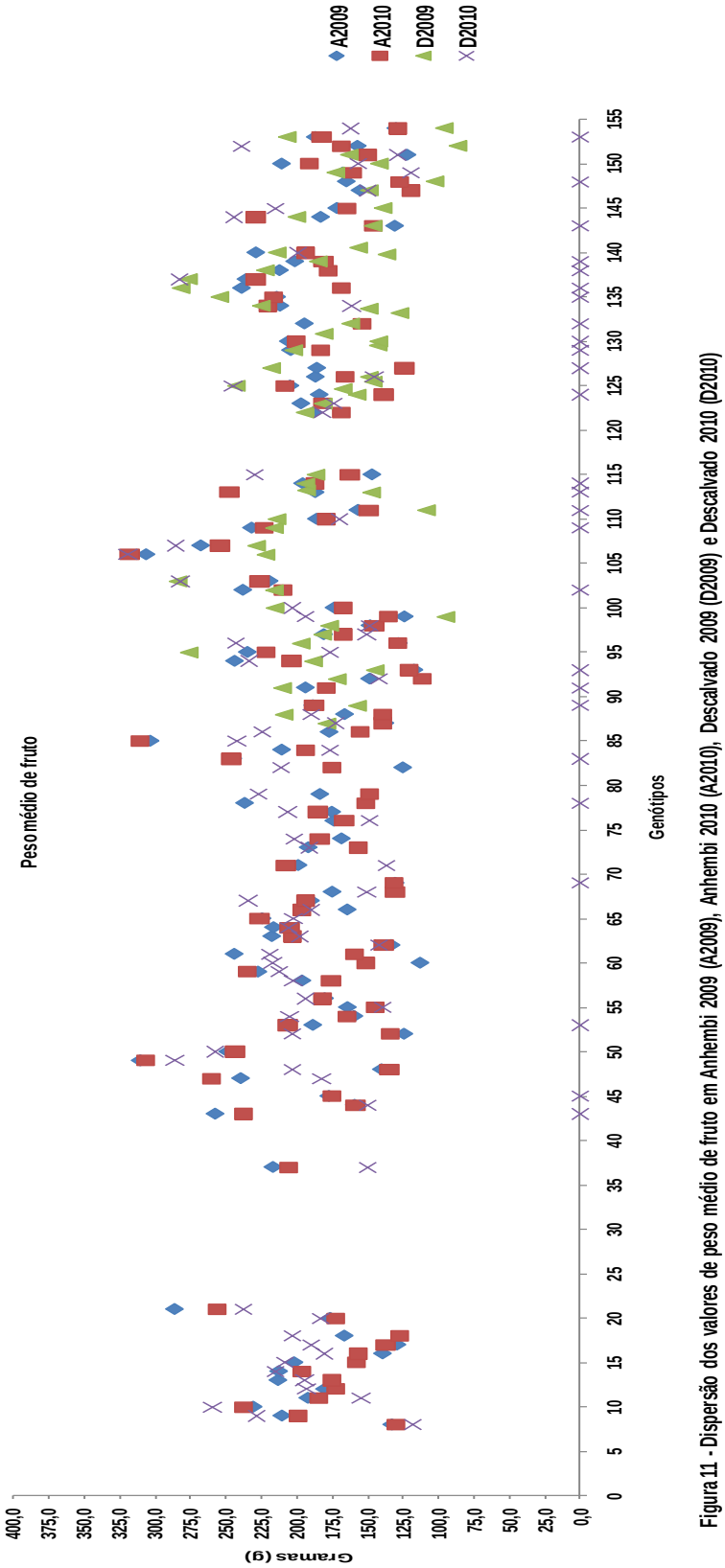

Figura 11 - Dispersão dos valores de peso médio de fruto em Anhembi 2009 (A2009), Anhembi 2010 (A2010), Descalvado 2009 (D2009) e Descalvado 2010 (D2010)

4.1.1.4 Espessura média da casca (EC)

Na tabela 9 estão apresentadas as médias do caráter espessura média da casca. Essa medida foi realizada em milímetros e tomada através da utilização de paquímetro digital.

Os valores de espessura da casca variaram de 7,09 a 14,61mm. Para este caráter também houve acentuada variabilidade genética. Este é um caráter muito importante agronomicamente, pois quanto mais fina for a casca do fruto, mais interessante comercialmentee ele se torna. Através dos dados analisados, existe a possibilidade de se praticar algum tipo de seleção na população F_1 em estudo.

A figura 12 mostra a dispersão dos dados do caráter EC nos dois locais e nos dois anos de produção avaliados.

Tabela 9 – Espessura média da casca (mm) em Anhembi e Descalvado nos anos de produção 2009 e 2010

Espessura média da casca (EC)					Espessura média da casca (EC)				
Genótipo	**A2009**	**A2010**	**D2009**	**D2010**	**Genótipo**	**A2009**	**A2010**	**D2009**	**D2010**
8	9,39	9,42	8,63	7,09	87	10,05	9,99	9,05	8,74
9	10,41	11,40	10,93	9,74	88	10,10	10,35	9,65	9,91
10	10,05	10,02	9,78	10,19	89	10,10	10,24	9,41	.
11	9,80	10,97	8,65	7,93	91	10,63	10,43	9,69	.
12	11,13	11,42	10,51	10,32	92	9,61	9,11	8,66	7,85
13	11,43	10,67	9,42	9,59	93	10,05	10,11	10,38	.
14	10,12	9,92	9,68	9,70	94	10,83	11,71	10,51	10,74
15	10,14	10,88	8,56	10,51	95	10,68	10,73	11,77	9,33
16	8,79	9,93	8,41	7,60	96	9,36	9,18	9,84	9,01
17	10,34	10,56	9,50	11,06	97	10,60	10,27	10,35	9,60
18	10,17	9,27	10,06	8,99	98	9,57	9,27	9,72	7,85
20	8,88	8,99	9,35	8,49	99	8,37	8,81	8,35	9,86
21	11,07	11,64	11,25	10,76	100	9,32	9,51	9,35	9,10
37	9,86	9,61	9,24	8,16	102	11,96	12,39	10,72	.
43	11,42	11,34	10,60	.	103	11,33	11,39	10,56	11,79
44	10,03	10,18	8,50	8,64	106	10,35	10,46	9,63	11,00
45	10,82	10,58	8,96	.	107	11,35	11,66	10,77	9,69
47	10,81	11,65	9,60	8,49	109	12,05	12,10	10,45	.
48	9,81	11,81	9,53	9,61	110	9,33	9,94	9,23	8,31
49	10,49	10,40	10,62	11,80	111	10,17	10,98	4,96	.
50	11,78	11,89	10,50	11,20	113	10,64	12,80	10,35	.
52	10,49	10,27	8,79	9,22	114	10,25	10,44	9,65	.
53	10,03	11,44	9,58	.	115	8,90	10,39	8,64	9,95
54	10,13	10,79	9,93	10,60	122	9,71	10,29	9,09	9,33
55	11,47	10,82	10,91	10,30	123	10,87	15,32	10,85	10,06
56	9,76	9,79	9,73	7,79	124	10,83	11,28	9,26	.
58	9,97	10,04	9,34	10,23	125	10,36	10,33	10,73	10,59
59	10,98	11,10	10,93	13,10	126	9,77	11,38	9,22	12,04
60	10,02	14,61	9,73	9,93	127	9,91	10,91	10,26	.
61	11,68	11,95	10,54	10,84	129	10,42	12,17	9,86	.
62	8,96	10,30	8,54	6,51	130	10,91	11,00	9,63	.
63	11,81	11,73	11,78	11,30	132	10,02	9,95	9,19	.
64	10,80	10,77	9,24	9,28	134	11,24	12,76	11,37	9,22
65	10,49	11,46	4,35	8,49	135	11,82	11,47	11,30	.
66	9,12	10,60	9,76	9,72	136	10,49	11,78	9,94	.
67	10,82	9,86	10,50	8,42	137	11,12	11,00	10,48	12,02
68	10,51	8,69	9,33	8,60	138	11,19	11,84	10,07	.
69	9,66	9,82	9,88	.	139	10,20	10,08	9,11	.
71	10,49	11,41	8,89	8,68	140	10,32	10,49	9,53	8,54
73	10,62	11,00	9,97	9,79	143	8,91	9,20	8,80	.
74	9,67	10,35	9,71	8,92	144	8,80	9,86	8,67	9,89
76	10,71	10,74	9,70	8,24	145	10,62	10,34	8,99	8,76
77	10,28	10,53	8,98	9,30	147	9,82	8,46	9,61	8,99
78	11,52	11,38	10,71	.	148	10,06	10,35	5,06	.
79	10,37	9,69	9,65	11,06	149	9,82	11,89	9,77	8,86
82	8,70	9,70	8,49	8,48	150	10,18	9,83	8,64	9,29
83	10,80	11,06	10,31	.	151	8,93	9,87	8,85	7,91
84	11,13	13,77	9,41	9,46	152	9,16	9,63	4,76	8,97
85	12,09	12,04	11,36	12,00	153	9,83	9,57	8,90	.
86	10,21	8,43	10,22	9,77	154	9,39	11,12	4,57	7,37

Nota: A2009 = dados de Anhembi em 2009; A2010 = dados de Anhembi em 2010; D2009 = dados de Descalvado em 2009; D2010 = dados de Descalvado em 2010

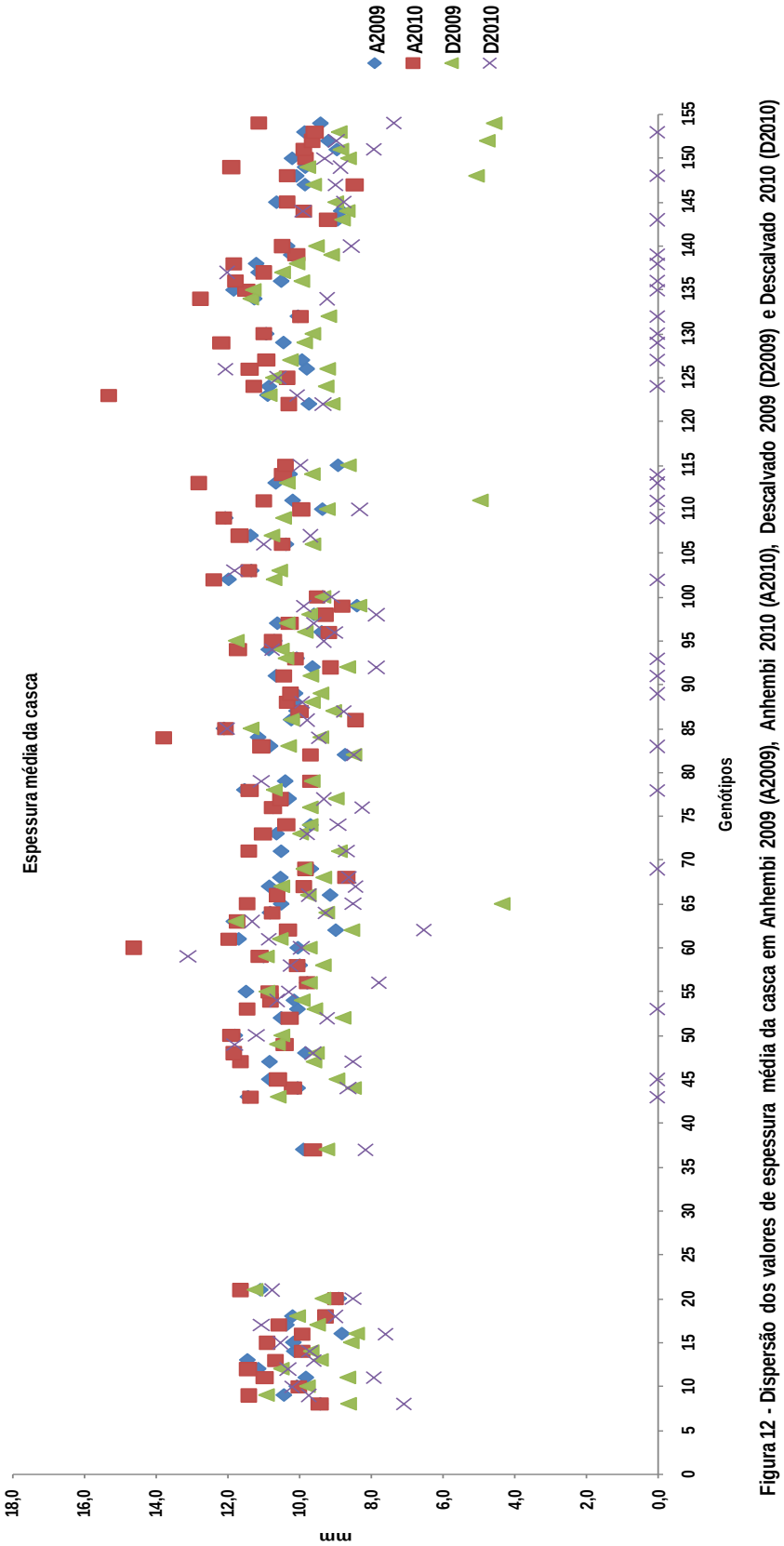

Figura 12 - Dispersão dos valores de espessura média da casca em Anhembi 2009 (A2009), Anhembi 2010 (A2010), Descalvado 2009 (D2009) e Descalvado 2010 (D2010)

4.1.1.5 Peso médio da casca (PC)

Na tabela 10 estão apresentadas as médias do caráter peso médio da casca. Essa medida foi realizada em gramas e tomada através da utilização de balança digital.

Os valores de peso médio da casca variaram de 77,80 a 290,02g. Esses dados mostraram uma amplitude de variação bem acentuada, chegando ao extremo de 290,02g para o genótipo 63 em Descalvado no ano de 2009. Comparando-se este valor de peso de casca com o valor de peso total do fruto (Tabela 8) pode-se concluir que 79,7% do peso desse genótipo é representado pela casca. Isso é um fator bastante desfavorável, pois mostra que o fruto tem muita casca e pouca polpa.

A figura 13 mostra a dispersão dos dados do caráter PC nos dois locais e nos dois anos de produção avaliados.

Tabela 10 – Peso médio da casca (g) em Anhembi e Descalvado nos anos de produção 2009 e 2010

Peso médio da casca (PC)					Peso médio da casca (PC)				
Genótipo	A2009	A2010	D2009	D2010	Genótipo	A2009	A2010	D2009	D2010
8	102,39	100,33	87,53	77,80	87	101,25	100,89	134,61	118,86
9	169,84	161,66	215,52	164,95	88	128,29	109,66	153,76	129,26
10	180,31	184,81	178,13	182,74	89	138,98	140,35	120,70	.
11	151,59	135,71	140,43	108,12	91	145,08	135,02	152,27	.
12	146,26	142,94	171,56	147,78	92	112,42	83,46	107,80	86,25
13	167,63	141,32	154,11	138,22	93	89,89	90,86	105,59	.
14	163,15	151,01	145,27	158,80	94	194,95	169,07	161,60	182,80
15	154,14	129,97	97,66	156,08	95	193,38	183,55	234,85	139,93
16	99,81	102,76	99,24	114,41	96	94,70	94,17	142,94	178,42
17	99,97	105,47	113,37	144,48	97	146,20	135,72	150,28	107,00
18	131,00	102,15	139,10	144,46	98	102,70	100,25	135,19	95,98
20	122,67	119,90	150,57	129,87	99	99,22	108,71	72,84	146,74
21	230,22	210,52	265,79	184,16	100	126,70	121,37	153,67	145,98
37	162,41	153,25	116,66	100,97	102	199,37	178,09	173,45	.
43	208,07	186,16	162,66	.	103	182,63	190,16	232,95	232,72
44	117,44	117,70	111,50	105,17	106	246,66	254,93	184,75	248,58
45	136,09	134,05	108,29	.	107	200,90	191,16	185,32	196,62
47	192,29	208,97	162,06	127,32	109	178,25	171,55	166,43	.
48	107,55	107,07	118,78	150,28	110	138,10	141,90	158,47	119,07
49	238,71	232,80	202,46	221,95	111	119,32	114,17	85,22	.
50	200,43	193,44	147,53	184,30	113	156,60	212,59	119,38	.
52	85,98	92,56	112,22	135,87	114	157,86	151,12	150,61	.
53	140,43	158,44	117,79	.	115	103,63	118,47	140,63	201,24
54	127,81	136,72	155,28	158,02	122	131,99	127,94	129,91	120,74
55	129,40	115,45	119,87	98,07	123	153,41	155,08	135,48	125,02
56	136,83	134,95	137,23	135,30	124	147,60	112,35	127,38	.
58	154,42	150,88	154,44	159,05	125	153,75	155,90	191,62	183,79
59	193,90	198,49	216,86	190,57	126	157,32	138,19	118,72	121,33
60	98,78	132,42	148,37	153,18	127	159,78	101,31	166,69	.
61	188,52	126,39	172,83	170,93	129	153,90	145,40	155,76	.
62	99,72	113,03	111,88	100,53	130	164,34	160,50	111,52	.
63	181,48	166,11	290,02	152,82	132	149,74	126,69	124,05	.
64	181,66	174,02	121,17	162,08	134	171,04	181,74	188,22	111,31
65	180,20	185,30	47,59	142,45	135	178,80	181,68	201,50	.
66	119,11	146,45	166,08	140,18	136	186,02	132,89	220,47	.
67	157,39	159,31	174,16	162,88	137	193,03	181,98	226,61	228,99
68	128,72	95,71	101,37	106,83	138	165,62	144,99	158,10	.
69	98,51	100,55	137,11	.	139	151,91	144,41	146,54	.
71	149,83	156,86	122,73	91,13	140	170,98	145,55	150,21	140,72
73	153,10	128,59	141,07	140,35	143	99,55	108,40	109,78	.
74	121,73	135,68	164,27	148,11	144	145,91	188,83	155,52	190,22
76	137,30	132,48	93,39	101,31	145	139,57	133,29	101,36	143,03
77	147,28	154,33	121,92	148,66	147	121,18	86,78	115,05	108,19
78	191,03	123,22	134,30	.	148	122,42	104,68	77,80	.
79	135,28	117,96	145,40	170,66	149	137,64	130,70	132,77	87,72
82	96,98	142,61	122,57	147,77	150	157,55	143,03	103,50	102,66
83	186,82	188,65	229,22	.	151	95,11	113,48	128,87	80,00
84	172,43	169,57	170,58	132,25	152	125,51	135,50	72,43	172,40
85	252,65	255,74	222,76	187,56	153	145,79	140,62	163,34	.
86	145,44	114,73	182,61	177,97	154	94,46	103,43	64,65	109,56

Nota: A2009 = dados de Anhembi em 2009; A2010 = dados de Anhembi em 2010; D2009 = dados de Descalvado em 2009; D2010 = dados de Descalvado em 2010

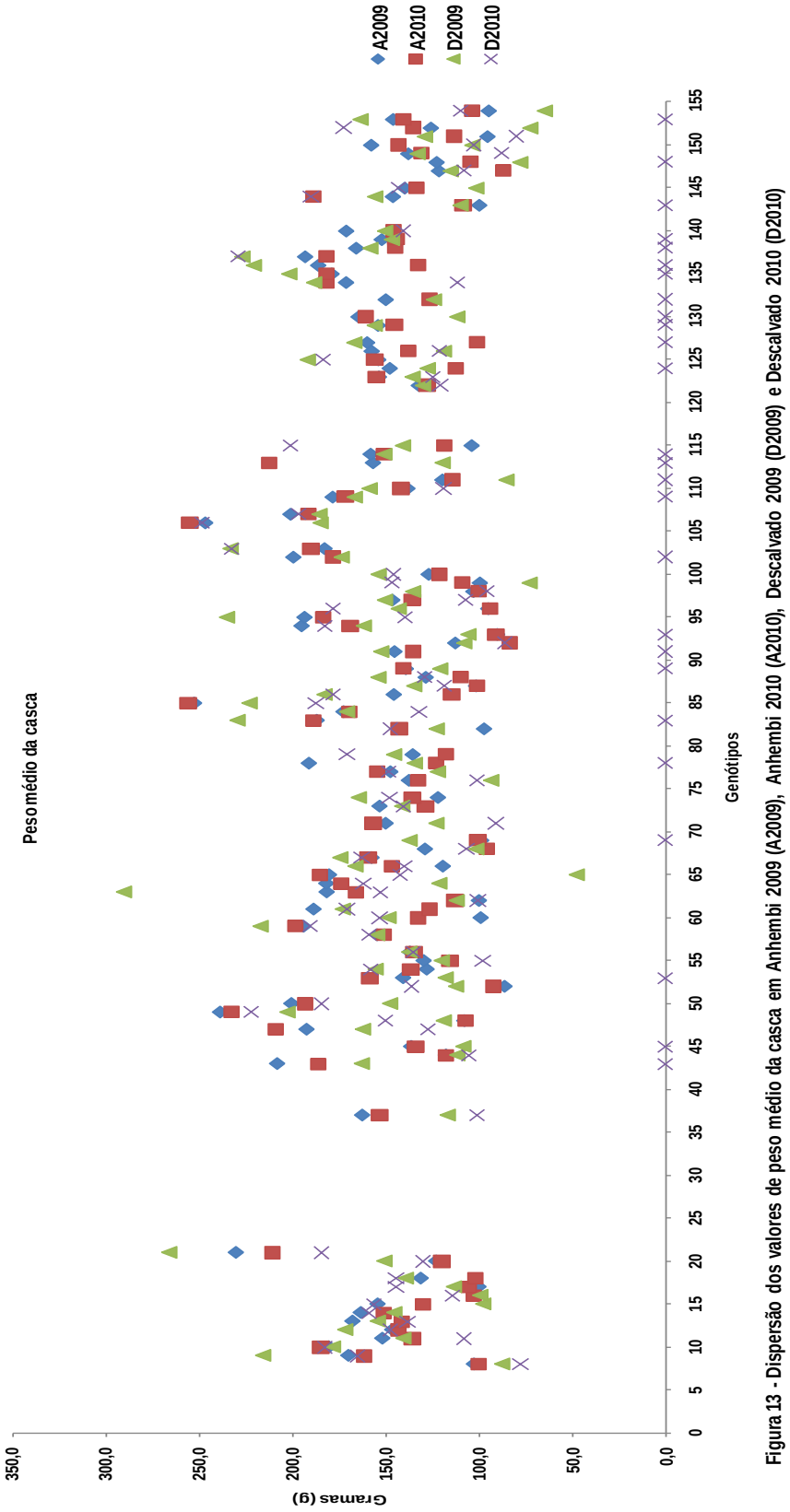

Figura 13 - Dispersão dos valores de peso médio da casca em Anhembi 2009 (A2009), Anhembi 2010 (A2010), Descalvado 2009 (D2009) e Descalvado 2010 (D2010)

4.1.1.6 Peso médio da polpa (PP)

Na tabela 11 estão apresentadas as médias do caráter peso médio da polpa. Essa medida foi realizada em gramas e tomada através da utilização de balança digital.

Esse caráter apresentou uma variação de valores de 7,17 a 73,94. Os genótipos 63 e 67 foram os que apresentaram menor porcentagem de polpa, correspondendo a 2,02% e 3,05%, respectivamente. Obviamente o genótipo 63 foi aquele que apresentou o maior valor de espessura de casca, indicando não ser um genótipo adequado para fins de seleção com vistas ao melhoramento genético da população.

A figura 14 mostra a dispersão dos dados do caráter PP nos dois locais e nos dois anos de produção avaliados.

Tabela 11 – Peso médio da polpa (g) em Anhembi e Descalvado nos anos de produção 2009 e 2010

Peso médio da polpa (PP)						Peso médio da polpa (PP)				
Genótipo	**A2009**	**A2010**	**D2009**	**D2010**		**Genótipo**	**A2009**	**A2010**	**D2009**	**D2010**
8	30,80	30,00	39,51	32,19		87	36,83	38,79	44,19	53,90
9	41,15	37,61	42,36	73,70		88	38,33	29,51	55,36	60,61
10	50,94	52,46	42,77	38,42		89	50,09	47,63	36,41	.
11	41,00	49,12	37,48	46,65		91	49,26	44,51	57,95	.
12	34,49	29,84	49,22	27,52		92	36,45	28,24	63,64	44,64
13	46,11	34,03	42,07	50,66		93	27,65	30,03	38,96	.
14	50,05	45,34	44,95	44,55		94	49,48	34,66	26,69	48,42
15	48,22	27,96	26,38	41,60		95	41,98	38,16	41,62	26,42
16	39,97	53,51	37,02	26,38		96	33,91	34,16	54,10	19,33
17	29,57	32,14	29,08	31,89		97	35,18	31,77	31,54	43,61
18	35,85	24,88	49,74	58,50		98	45,89	44,97	41,66	52,58
20	54,18	52,74	53,36	47,94		99	25,16	26,97	21,58	33,09
21	56,69	45,99	11,79	26,67		100	47,32	45,72	61,90	33,46
37	54,91	52,50	36,32	19,71		102	39,22	32,07	42,60	.
43	50,14	51,34	51,83	.		103	37,32	36,38	51,37	22,30
44	42,17	40,95	36,79	26,76		106	60,42	62,96	37,30	56,48
45	41,64	41,57	33,71	.		107	67,48	62,92	43,38	29,83
47	47,84	50,90	56,67	44,12		109	54,15	51,79	39,42	.
48	32,99	27,56	37,54	31,89		110	48,38	37,44	55,72	50,93
49	72,44	73,94	54,03	32,17		111	37,82	35,31	22,96	.
50	48,81	50,12	32,62	7,32		113	30,82	35,14	27,74	.
52	38,66	41,28	55,04	56,86		114	38,40	36,50	43,18	.
53	48,66	47,87	35,61	.		115	43,65	44,12	45,97	16,85
54	32,17	28,02	43,91	37,70		122	56,70	40,33	64,39	61,18
55	35,21	29,65	29,15	20,64		123	44,08	26,49	45,92	48,88
56	43,91	46,70	40,20	46,83		124	36,91	26,59	29,99	.
58	42,33	24,83	30,58	18,38		125	51,52	52,41	51,44	61,32
59	34,00	36,40	59,97	22,32		126	29,94	27,97	30,01	14,32
60	24,37	18,95	44,89	64,05		127	26,52	22,99	51,38	.
61	56,17	33,13	23,68	4,85		129	50,90	38,25	46,59	.
62	33,95	25,89	36,94	20,82		130	42,01	40,42	30,50	.
63	36,64	37,25	7,38	14,89		132	45,33	27,37	37,88	.
64	35,23	31,10	22,61	43,44		134	41,32	38,46	37,14	19,92
65	44,78	41,15	12,80	9,21		135	35,85	35,19	53,24	.
66	45,64	50,11	49,10	22,26		136	53,46	35,71	61,70	.
67	33,30	34,35	45,45	7,17		137	43,30	47,05	50,36	48,28
68	46,73	34,89	51,48	43,99		138	47,08	33,21	64,31	.
69	32,33	31,17	43,66	.		139	49,94	37,02	38,37	.
71	49,65	50,92	45,82	18,24		140	58,40	48,22	63,87	58,38
73	39,23	27,64	33,41	20,28		143	31,63	37,64	36,29	.
74	47,12	48,19	53,41	21,42		144	37,68	40,12	44,64	38,52
76	36,90	34,21	15,38	18,92		145	32,52	31,46	37,61	23,33
77	28,41	30,95	33,86	38,93		147	34,46	32,29	33,71	29,58
78	46,29	28,24	33,29	.		148	42,95	22,52	24,36	.
79	48,82	31,01	24,46	39,36		149	30,25	30,06	39,78	6,27
82	28,48	32,22	23,39	63,68		150	53,63	48,16	38,08	16,29
83	58,76	57,73	60,42	.		151	27,32	36,80	34,10	4,88
84	38,71	23,90	48,28	44,02		152	32,08	33,51	13,47	33,21
85	51,50	54,96	55,56	27,35		153	41,50	42,12	43,59	.
86	32,10	40,26	58,84	46,30		154	35,84	25,76	30,93	34,10

Nota: A2009 = dados de Anhembi em 2009; A2010 = dados de Anhembi em 2010; D2009 = dados de Descalvado em 2009; D2010 = dados de Descalvado em 2010

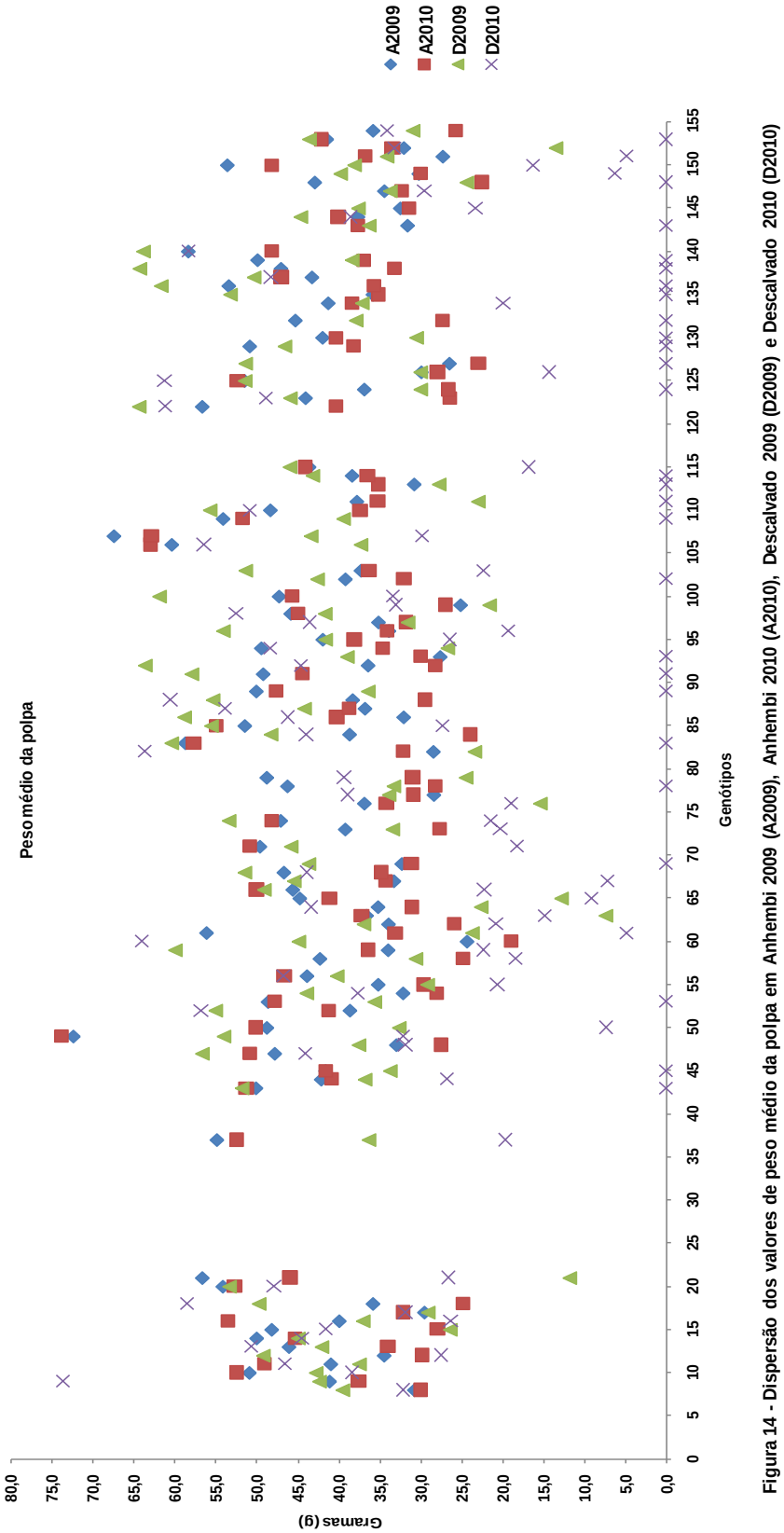

Figura 14 - Dispersão dos valores de peso médio da polpa em Anhembi 2009 (A2009), Anhembi 2010 (A2010), Descalvado 2009 (D2009) e Descalvado 2010 (D2010)

4.1.1.7 Teor de sólidos solúveis totais (SST)

Na tabela 12 estão apresentadas as médias do caráter teor de sólidos solúveis totais. Essa medida foi realizada em ° Brix através de refratômetro.

O caráter SST está relacionado com a acidez e a quantidade de açúcar presente na polpa. A população segregante apresentou uma variação de valores de 8,52 a 22,28 ° Brix. Como discutido para os caracteres anteriores, a população do presente estudo também pode ser selecionada para o caráter SST.

A figura 15 mostra a dispersão dos dados do caráter SST nos dois locais e nos dois anos de produção avaliados.

Tabela 12 – Teor de sólidos solúveis totais (° Brix) em Anhembi e Descalvado nos anos de produção 2009 e 2010

Teor de sólidos solúveis totais (SST)					Teor de sólidos solúveis totais (SST)				
Genótipo	**A2009**	**A2010**	**D2009**	**D2010**	**Genótipo**	**A2009**	**A2010**	**D2009**	**D2010**
8	18,95	17,75	18,71	17,63	87	19,17	18,55	18,84	18,00
9	19,90	18,50	19,31	18,00	88	18,16	17,60	15,75	16,70
10	17,78	18,38	17,67	17,80	89	17,74	18,75	17,16	.
11	19,22	17,78	18,60	17,90	91	19,31	18,00	17,86	.
12	22,28	19,00	20,10	18,74	92	19,56	20,65	19,93	18,88
13	17,55	17,60	17,55	16,89	93	20,07	19,50	18,56	.
14	19,21	19,10	19,78	19,15	94	20,04	20,45	17,83	17,71
15	20,03	19,50	20,33	19,20	95	19,29	19,35	20,34	18,38
16	18,94	18,23	18,05	16,00	96	19,02	18,95	18,40	17,00
17	20,34	18,60	19,53	18,14	97	19,77	18,00	19,12	17,85
18	17,73	17,92	17,74	16,90	98	19,43	18,45	18,89	16,90
20	18,35	19,25	18,74	16,67	99	21,23	20,34	21,23	19,78
21	21,14	19,84	20,53	17,80	100	18,59	19,18	17,37	17,17
37	18,68	17,80	18,06	16,75	102	18,06	19,40	16,70	.
43	19,50	18,20	18,17	.	103	19,15	19,85	18,97	18,29
44	18,02	17,92	16,81	16,50	106	19,07	19,25	18,54	18,88
45	18,75	18,08	18,98	.	107	18,25	18,45	18,87	16,95
47	19,35	19,00	17,97	17,63	109	20,67	19,05	18,77	.
48	19,46	18,67	18,85	18,33	110	20,01	19,90	19,61	19,30
49	18,09	17,13	18,07	16,00	111	18,87	19,30	8,52	.
50	18,61	18,32	20,12	16,00	113	20,87	18,60	17,20	.
52	19,14	19,45	18,78	17,23	114	17,83	15,50	16,64	.
53	17,93	17,65	16,91	.	115	20,19	17,62	17,73	17,00
54	20,13	19,20	20,26	18,75	122	19,64	19,15	19,43	18,30
55	20,32	18,09	19,34	18,60	123	19,43	18,60	17,57	18,90
56	19,54	17,02	19,92	17,63	124	21,21	18,88	19,42	.
58	18,81	16,30	17,54	15,20	125	19,40	19,02	18,41	18,20
59	19,09	18,55	18,51	16,00	126	20,51	18,35	19,53	18,17
60	17,72	17,50	17,79	16,30	127	18,89	17,40	18,13	.
61	21,25	20,00	20,27	15,00	129	19,40	19,45	18,61	.
62	19,37	18,65	18,60	17,80	130	19,71	20,10	18,71	.
63	19,22	18,50	20,60	18,00	132	17,79	18,15	16,62	.
64	19,92	18,00	20,09	16,80	134	18,98	19,15	18,57	17,00
65	18,01	17,52	9,94	16,75	135	18,08	18,84	16,99	.
66	20,76	19,95	18,49	13,00	136	18,50	17,75	18,19	.
67	17,48	17,75	16,87	17,00	137	18,56	17,80	16,65	17,22
68	18,22	17,80	17,66	17,50	138	19,32	17,70	18,53	.
69	21,99	18,95	20,56	.	139	19,02	19,08	17,30	.
71	17,76	18,80	17,60	16,50	140	17,87	18,30	18,27	16,90
73	19,68	19,60	19,38	17,75	143	18,19	18,23	18,31	.
74	18,95	19,16	17,17	16,00	144	18,94	18,87	18,10	17,28
76	18,80	19,18	17,31	17,25	145	20,12	18,45	18,66	17,00
77	18,46	19,50	19,30	18,06	147	19,79	17,33	19,71	17,86
78	19,67	18,90	19,08	.	148	18,64	17,05	8,78	.
79	18,19	17,90	17,43	16,57	149	18,29	18,47	18,00	17,50
82	18,39	17,15	18,14	17,15	150	17,24	18,30	18,04	15,67
83	18,48	18,95	18,60	.	151	18,55	17,88	17,94	17,00
84	18,77	19,65	19,02	17,30	152	21,28	20,75	11,26	20,2
85	17,75	19,90	17,42	17,00	153	18,34	18,54	16,32	.
86	18,66	20,42	18,15	16,55	154	20,26	19,57	9,35	17,70

Nota: A2009 = dados de Anhembi em 2009; A2010 = dados de Anhembi em 2010; D2009 = dados de Descalvado em 2009; D2010 = dados de Descalvado em 2010

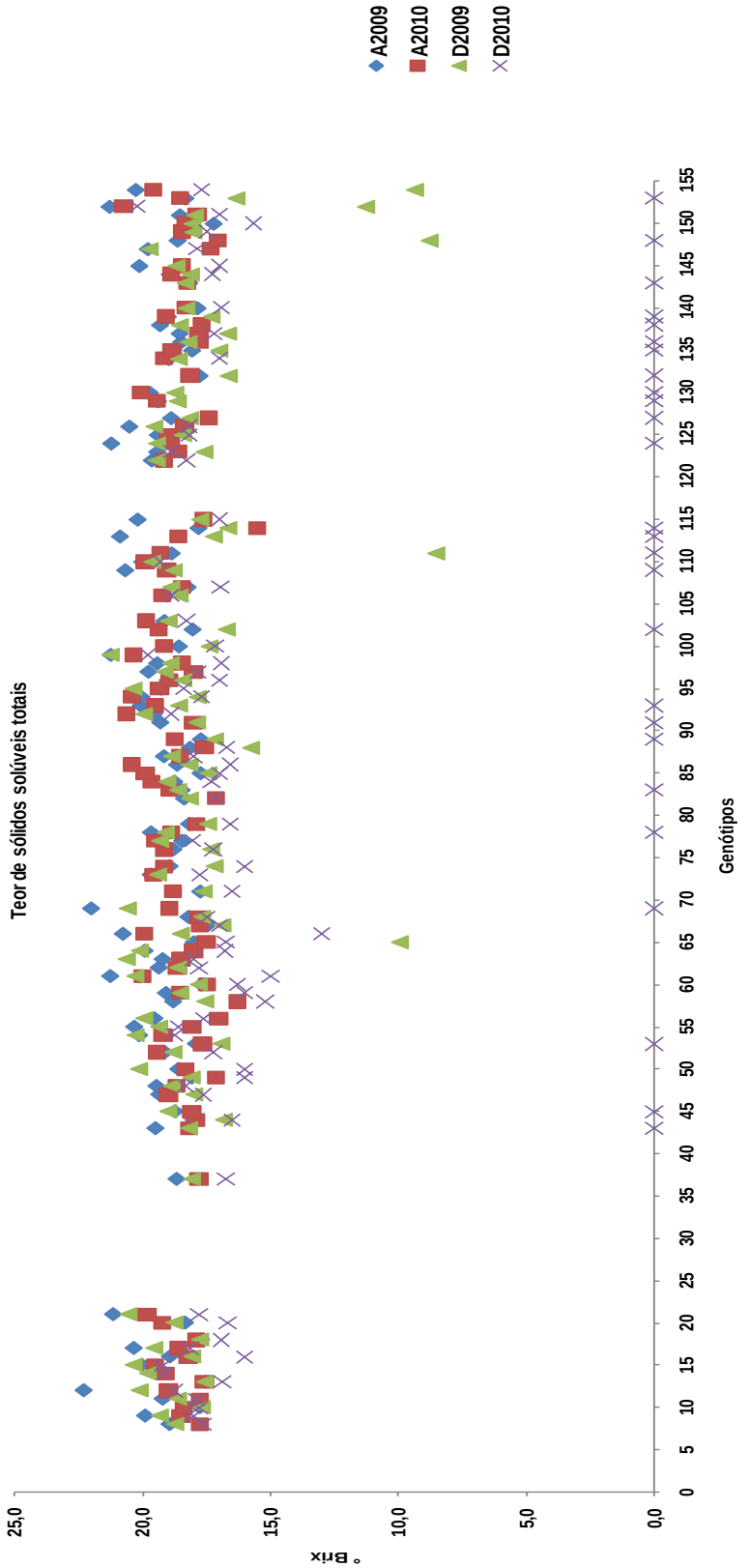

Figura 15 - Dispersão dos valores de teor de sólidos solúveis totais em Anhembi 2009 (A2009), Anhembi 2010 (A2010), Descalvado 2009 (D2009) e Descalvado 2010 (D2010)

4.1.1.8 Número médio de frutos (NF)

Na tabela 13 estão apresentadas as médias do caráter número médio de frutos. Essa medida foi realizada pela contagem total dos frutos de cada parcela avaliada.

Os valores variaram de 3 a 545,5 frutos por parcela. Aqui, através dos dados deste caráter pode-se concluir que existem genótipos bastante produtivos, como é o caso do genótipo 152 em Anhembi no ano de 2009 , e genótipos bem pouco produtivos, como é o caso do genótipo 114 em Descalvado no ano de 2009. Também para este caráter pode-se observar forte interação com o ambiente, uma vez que o mesmo genótipo (152) produziu 545,5 frutos em Anhembi e 18 frutos em Descalvado no mesmo ano de produção. O caráter NF é um dos principais caracteres que se considera quando se pensa em realizar qualquer tipo de seleção em uma população de maracujá-doce.

A figura 16 mostra a dispersão dos dados do caráter NF nos dois locais e nos dois anos de produção avaliados.

Tabela 13 – Número médio de frutos em Anhembi e Descalvado nos anos de produção 2009 e 2010

Número médio de frutos (NF)					Número médio de frutos (NF)				
Genótipo	**A2009**	**A2010**	**D2009**	**D2010**	**Genótipo**	**A2009**	**A2010**	**D2009**	**D2010**
8	106,50	15,00	152,50	83,00	87	44,00	9,50	65,00	30,50
9	332,50	278,50	116,50	182,00	88	242,00	27,00	93,00	64,50
10	238,00	157,00	93,50	252,00	89	79,50	20,50	83,00	166,50
11	295,50	71,00	80,50	135,00	91	289,00	55,50	14,50	68,00
12	192,50	134,00	117,00	143,00	92	52,50	269,00	99,50	119,50
13	381,00	105,00	83,50	220,50	93	60,00	3,50	49,00	29,00
14	312,50	194,00	99,50	305,00	94	510,00	121,50	51,50	215,00
15	179,50	229,00	94,00	210,50	95	44,00	83,00	48,00	143,50
16	513,50	47,00	231,00	181,50	96	22,00	54,00	72,50	230,50
17	234,00	27,00	113,50	73,00	97	170,00	50,50	93,00	112,00
18	306,52	164,00	140,00	159,5	98	78,50	15,50	124,00	135,50
20	217,50	218,50	59,00	212,50	99	212,50	281,00	102,50	268,00
21	112,00	128,50	100,50	195,50	100	93,50	26,50	35,00	221,5
37	403,50	37,00	72,00	36,50	102	125,00	197,50	47,00	110,00
43	274,50	264,50	141,00	123,00	103	77,50	104,50	90,00	338,50
44	349,00	106,50	91,50	111,50	106	277,00	150,50	96,00	318,00
45	356,50	72,50	101,50	45,00	107	82,50	110,00	71,00	279,50
47	323,50	320,00	63,00	206,00	109	268,00	28,00	48,50	63,50
48	354,00	13,00	124,00	121,00	110	327,50	323,00	28,00	160,00
49	163,50	278,00	123,00	232,50	111	197,50	92,00	205,50	22,00
50	86,00	55,00	95,00	282,50	113	91,00	33,50	59,00	27,00
52	135,50	13,00	59,50	119,00	114	116,00	96,50	3,00	20,00
53	282,50	128,00	68,50	115,50	115	329,50	79,00	59,00	214,00
54	74,00	46,00	53,50	138,00	122	371,50	330,00	93,50	176,00
55	522,50	227,50	104,00	58,00	123	246,00	71,50	66,00	169,00
56	152,50	219,00	26,00	258,50	124	232,50	246,50	100,00	167,50
58	198,00	55,00	76,50	82,50	125	91,00	132,00	85,00	193,00
59	274,50	81,00	69,00	119,00	126	378,50	74,00	33,50	87,00
60	131,00	50,00	61,50	184,00	127	484,00	143,00	91,50	104,50
61	448,50	202,50	109,00	131,50	129	353,00	99,00	61,00	237,00
62	244,50	161,00	48,50	41,00	130	139,00	66,50	30,50	9,00
63	53,00	39,00	25,00	187,50	132	327,50	114,00	132,50	80,00
64	316,00	80,00	124,00	74,00	134	143,00	48,50	50,00	28,50
65	208,50	173,00	48,00	155,50	135	83,50	13,00	83,50	52,00
66	251,00	232,00	70,00	199,00	136	539,50	150,50	113,50	143,00
67	99,50	60,00	70,00	155,50	137	300,50	307,50	80,00	248,00
68	327,00	103,50	58,00	31,00	138	336,00	67,00	41,00	121,50
69	44,00	10,00	32,00	8,50	139	401,50	136,00	35,00	33,00
71	368,50	16,00	86,00	71,50	140	261,50	188,50	140,50	202,50
73	92,00	24,00	81,00	99,50	143	202,50	71,50	85,00	66,50
74	98,00	91,00	37,50	54,50	144	503,50	138,00	58,50	244,00
76	406,00	29,50	129,00	45,00	145	212,00	41,00	86,00	55,50
77	161,00	90,00	98,00	191,50	147	137,00	92,00	80,50	138,00
78	134,00	161,50	91,00	230,50	148	185,50	45,50	42,00	113,50
79	213,50	71,00	38,50	76,50	149	383,50	29,00	115,00	177,50
82	43,00	11,00	43,00	84,50	150	331,00	192,50	124,00	172,50
83	61,00	86,50	22,50	311,50	151	221,50	66,00	59,50	94,50
84	327,50	81,00	102,50	73,00	152	545,50	156,00	18,00	119,50
85	85,50	172,50	57,50	341,00	153	189,00	17,00	83,50	78,00
86	93,00	51,00	93,50	28,00	154	90,00	14,00	42,00	162,5

Nota: A2009 = dados de Anhembi em 2009; A2010 = dados de Anhembi em 2010; D2009 = dados de Descalvado em 2009; D2010 = dados de Descalvado em 2010

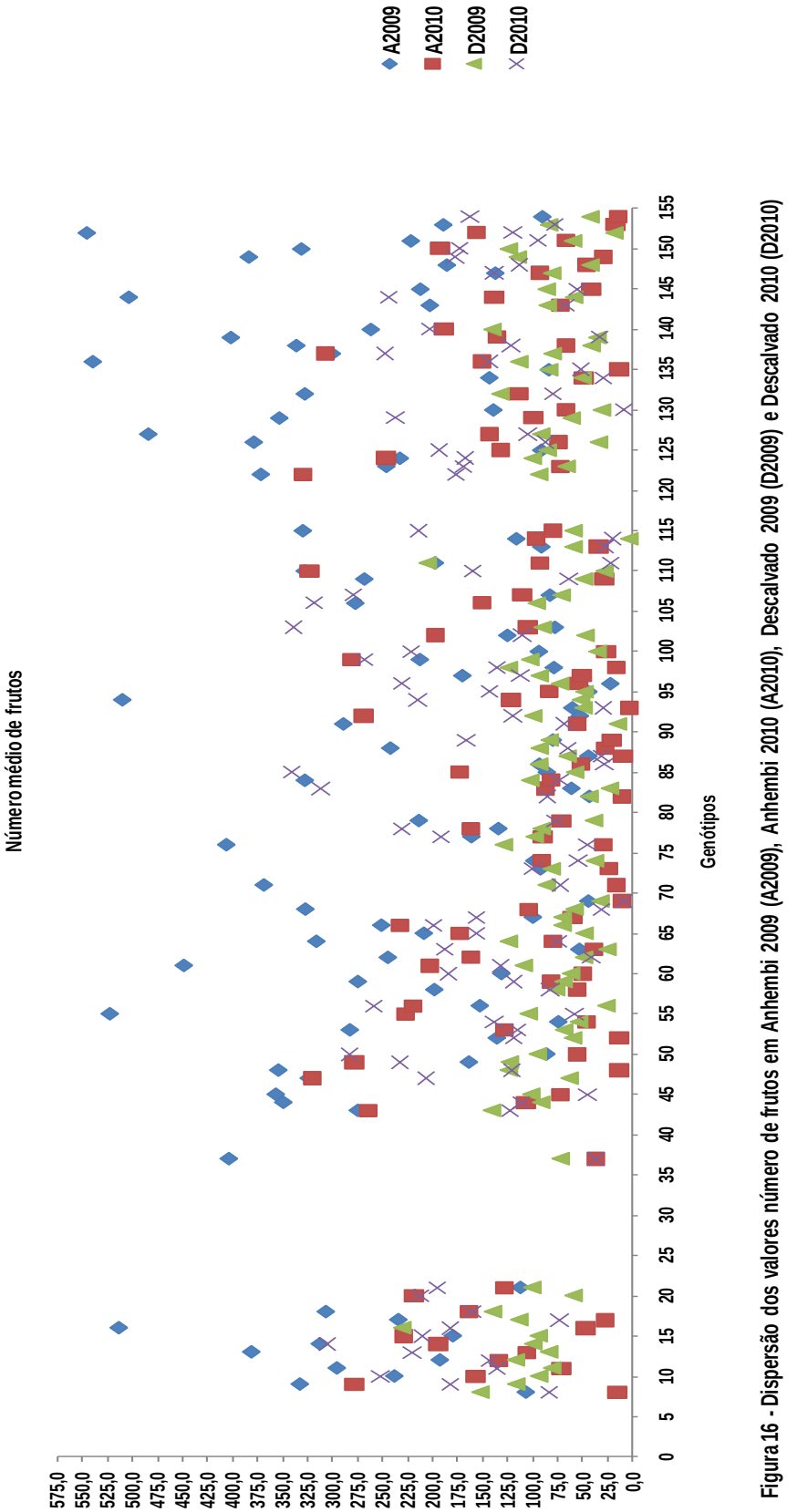

Figura 16 - Dispersão dos valores número de frutos em Anhembi 2009 (A2009), Anhembi 2010 (A2010), Descalvado 2009 (D2009) e Descalvado 2010 (D2010)

4.1.1.9 Produção (PR)

Na tabela 14 estão apresentadas as médias do caráter produção. Calculou-se a produção em função do número de frutos multiplicado pelo peso médio dos frutos e dividido por 1000 para que se obtivesse a medida em Kg por parcela.

Os valores de produção variaram desde 0,58 até 129,05Kg por parcela. O caráter PR é um dos caracteres considerados mais importantes no que diz respeito à comercialização dos frutos. Pelos dados aqui apresentados pode-se observar que existem genótipos que apresentam uma produção bastante elevada, como é o caso do genótipo 136 em Anhembi no ano de 2009, e genótipos que apresentam produção bastante reduzida, como é o caso do genótipo 114.

A figura 17 mostra a dispersão dos dados do caráter PR nos dois locais e nos dois anos de produção avaliados.

Tabela 14 – Produção (Kg) em Anhembi e Descalvado nos anos de produção 2009 e 2010

Produção (PR)						Produção (PR)				
Genótipo	**A2009**	**A2010**	**D2009**	**D2010**		**Genótipo**	**A2009**	**A2010**	**D2009**	**D2010**
8	14,21	1,96	19,34	13,34		87	6,12	1,32	11,66	8,29
9	70,05	55,36	30,03	54,39		88	40,50	3,80	19,44	14,23
10	54,93	37,30	20,80	55,03		89	15,12	3,90	13,02	.
11	59,27	12,97	14,36	20,35		91	56,22	9,96	3,08	.
12	35,19	23,18	25,74	28,66		92	7,90	30,10	17,05	13,21
13	81,31	18,46	16,37	25,87		93	7,06	0,42	7,08	.
14	66,00	38,03	19,01	66,01		94	124,75	24,80	9,66	50,26
15	36,28	36,13	11,61	44,17		95	9,32	18,05	13,27	25,40
16	72,82	7,14	31,47	13,53		96	2,83	.	14,25	51,00
17	30,31	3,72	16,10	13,87		97	31,93	8,35	16,87	16,87
18	51,37	20,80	26,49	38,56		98	11,67	2,26	21,89	30,90
20	38,40	37,73	12,07	31,68		99	26,14	38,07	9,68	52,16
21	32,12	33,03	32,87	7,52		100	15,94	4,39	7,46	46,65
37	87,61	7,65	11,03	0,90		102	29,69	41,52	10,15	.
43	71,24	62,36	30,23	.		103	16,94	23,63	25,57	95,85
44	55,69	16,89	13,58	14,98		106	84,90	47,83	21,32	102,14
45	63,02	12,71	14,39	.		107	22,20	27,87	16,25	80,92
47	77,97	83,04	13,87	47,44		109	62,37	6,24	10,50	.
48	50,79	1,80	19,35	27,67		110	61,05	57,93	5,97	34,68
49	50,85	85,27	31,47	60,98		111	31,03	13,70	17,85	.
50	21,37	13,59	17,18	55,35		113	16,95	8,13	8,68	.
52	16,63	1,70	10,00	27,78		114	22,37	18,04	0,58	.
53	53,47	26,41	10,51	.		115	49,36	12,85	11,04	34,17
54	11,81	7,60	10,71	32,00		122	70,12	55,52	18,14	34,93
55	86,60	33,03	15,53	10,59		123	48,52	12,98	11,91	11,13
56	27,56	39,79	4,58	54,86		124	42,85	34,05	15,74	.
58	39,05	11,29	14,29	16,63		125	17,90	27,33	18,91	75,00
59	62,52	19,04	18,92	43,22		126	70,87	12,50	4,98	14,23
60	14,84	.	11,84	40,93		127	90,31	17,78	19,94	.
61	109,48	32,31	24,10	28,31		129	72,27	18,57	12,31	.
62	32,66	22,38	7,18	9,67		130	28,61	13,42	4,35	.
63	11,56	2,03	9,09	40,49		132	63,89	17,58	21,50	.
64	68,88	16,63	17,74	19,11		134	30,26	10,84	10,18	5,32
65	46,86	39,37	5,80	31,79		135	17,01	2,93	21,26	.
66	41,21	45,65	17,05	37,31		136	129,05	25,18	31,98	.
67	18,93	11,58	15,37	48,08		137	70,98	70,52	22,15	72,92
68	56,55	13,50	8,93	7,84		138	71,53	11,97	9,11	.
69	5,78	1,32	5,78	.		139	81,05	24,66	6,46	.
71	73,58	3,32	14,46	13,67		140	59,85	36,54	30,01	41,81
73	17,76	.	14,12	13,18		143	26,65	10,43	12,37	.
74	16,50	16,75	8,16	11,70		144	92,40	31,53	11,74	60,38
76	70,95	4,93	14,01	5,20		145	36,68	6,72	11,94	12,06
77	28,29	16,68	14,93	45,15		147	21,61	10,96	12,02	18,50
78	28,33	24,43	15,24	.		148	30,72	5,75	8,58	.
79	39,38	10,57	7,31	7,94		149	64,24	4,68	19,81	35,49
82	5,15	2,00	6,27	18,26		150	69,90	36,73	17,72	31,24
83	15,91	21,04	6,56	.		151	27,07	10,00	9,65	3,35
84	71,40	15,63	22,37	13,40		152	85,86	26,31	3,09	20,30
85	25,97	53,54	15,99	62,51		153	35,92	3,23	17,25	.
86	16,60	.	22,59	6,97		154	11,69	1,88	8,03	27,33

Nota: A2009 = dados de Anhembi em 2009; A2010 = dados de Anhembi em 2010; D2009 = dados de Descalvado em 2009; D2010 = dados de Descalvado em 2010

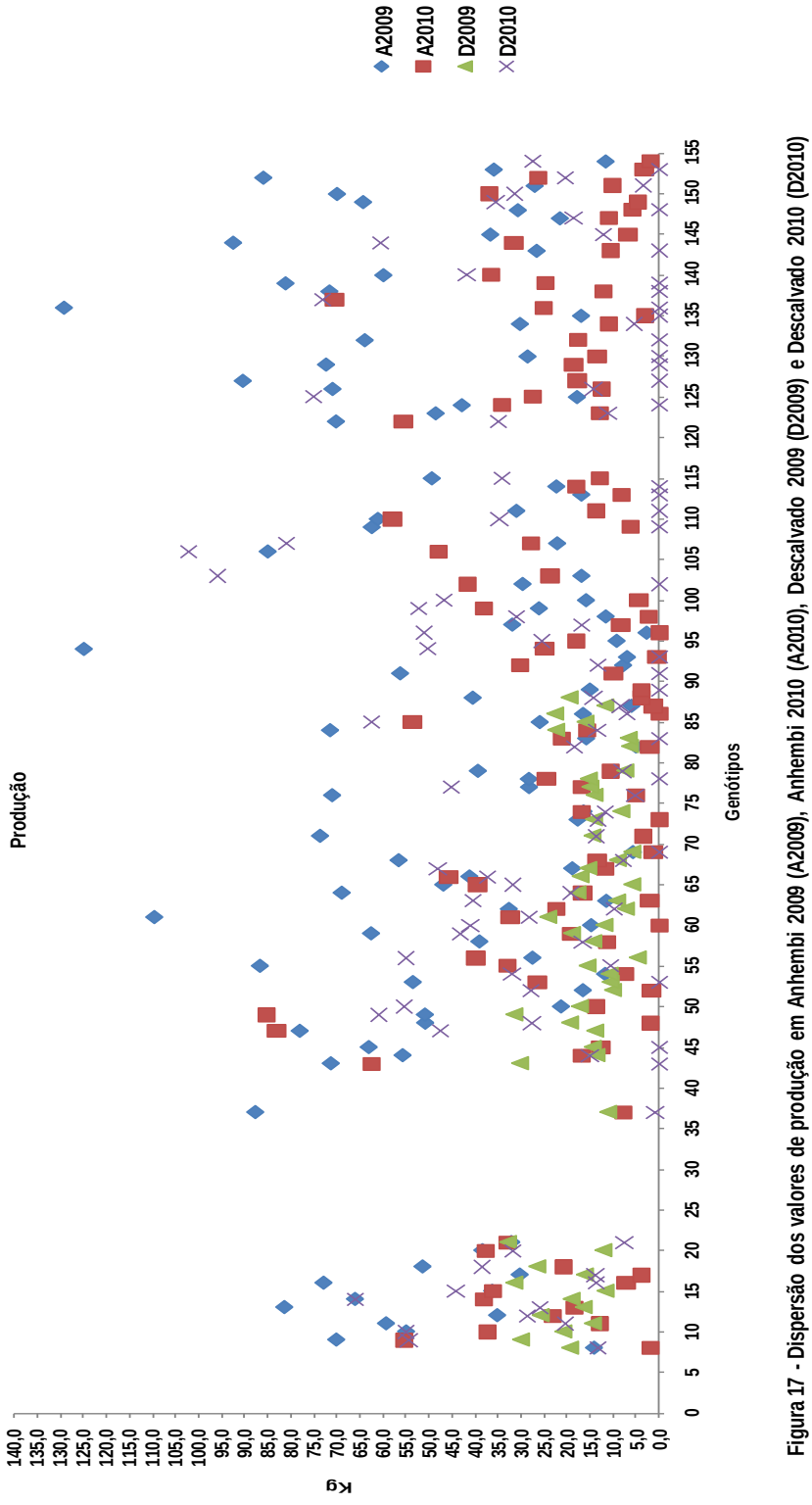

Figura 17 - Dispersão dos valores de produção em Anhembi 2009 (A2009), Anhembi 2010 (A2010), Descalvado 2009 (D2009) e Descalvado 2010 (D2010)

A população aqui estudada apresentou uma notável variação fenotípica para todos os caracteres avaliados. Foi encontrada uma correspondência de dados com o maracujá amarelo (Moraes, 2005). Futuramente, com a estimativa dos parâmetros genéticos e estatísticos, essa população poderá ser selecionada visando os primeiros passos para fins de melhoramento genético do maracujá-doce.

A figura 18 ilustra a ampla variação fenotípica encontrada na população F_1 de maracujá-doce.

Figura 18 – Variação fenotípica encontrada na população F_1

4.2 Análises moleculares: genotipagem da população de mapeamento (F_1) e segregação das marcas RGA e TRAP

4.2.1 Marcas RGA

No total, foram testadas 56 combinações de quatro enzimas de restrição com 14 primers RGA visando à detecção de polimorfismos na população em estudo. Os padrões de amplificação variaram de 32 a 61 locos dependendo do primer utilizado. Só foram observadas amplificações positivas quando a restrição foi realizada com a enzima *Ssp*I, ou seja, das 56 combinações, apenas 5 delas apresentaram um bom padrão de amplificação. As combinações dessa enzima com os *primers* NBSa-F, Kdc-R, Kde-R, RGP-F e PR5 foram então utilizadas para a genotipagem da população de mapeamento F_1, constituída de 180 indivíduos. Os indivíduos da população e mais os dois genitores foram caracterizados com base em 23 locos RGA. Na figura 19 é apresentada parte de um gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata.

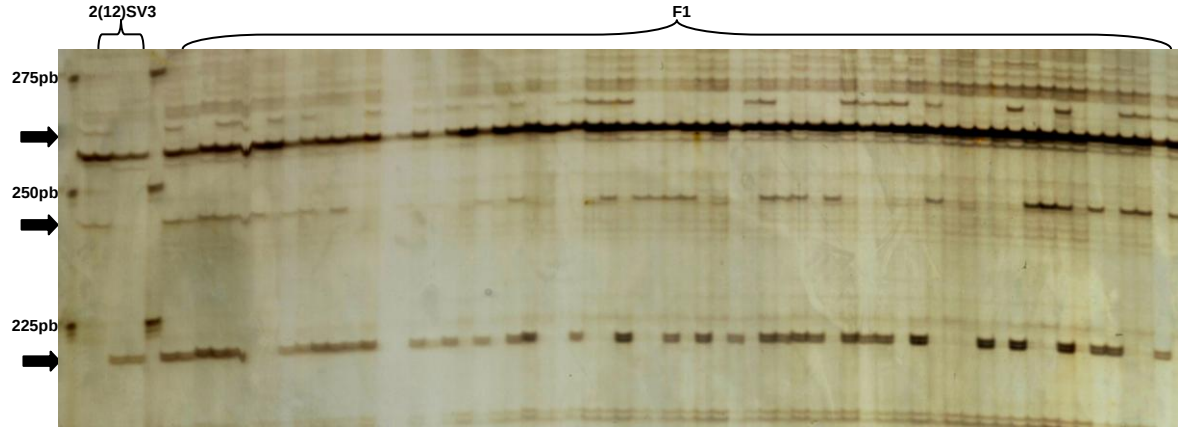

Figura 19 – Padrão de segregação dos locos RGA: DNA dos genitores 2(12) e SV3 aplicados em duplicata e n de parte da população F1 após eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. As setas indicam locos polimórficos

Um total de 223 locos de RGA foi amplificado, dos quais 23 (10,31%) apresentaram segregação em F_1. Desses 23 locos polimórficos, 11 (47,8%) foram informativos (presença de banda) para o genitor SV3 e 12 (52,2%) para o genitor 2(12). Todas as marcas segregaram na proporção 1:1. A tabela 15 mostra o número total de

locos amplificados para as diferentes combinações enzima/*primer* e a porcentagem de polimorfismo observada.

Tabela 15 – Número total de locos RGA amplificados, locos polimórficos e porcentagem de polimorfismo observada

Combinação Enzima +*Primer*	N° total de locos	N° de locos polimórficos*
SspI+PR5	32	10 (31,25%)
SspI+Kde-R	33	6 (18,18%)
SspI+NBSAF	54	4 (7,4%)
SspI+Kdc-R	61	2 (3,27%)
SspI+RGP-F	43	1 (2,32%)
Total	223	23 (10,31%)

* Entre parênteses está a porcentagem dos locos polimórficos

A taxa total de polimorfismo apresentada pelos marcadores RGA foi de 10,31%. Observa-se que a taxa de polimorfismo observada para os marcadores RGA é relativamente baixa, porém isto também pode ser observado em outras fruteiras. Em estudos com populações provenientes de cruzamento em maçã (*Malus domestica),* Naik *et al.,* (2006), partindo de 24 *primers* RGA, conseguiram um bom padrão de amplificação para apenas 5 deles e uma taxa de polimorfismo também baixa.

Utilizando outros marcadores em *P. alata,* as taxas de polimorfismo foram de 18,0% e 15,2% utilizando AFLP (NUNES, 2010) e SSR (PENHA, 2008), respectivamente, e para *P. edulis* f. *flavicarpa* foram de 26,4%, 13,0% e 24,7% com base em RAPD (CARNEIRO et al., 2002), AFLP (LOPES et al., 2006) e SSR (OLIVEIRA et al., 2008), respectivamente. Taxas de polimorfismo mais elevadas são encontradas em outras espécies de cruzamento como 52% em cacau (PUGH et al., 2004) e 46% em seringueira (LESPINASSE et al., 2000).

Um outro fator que pode ter contribuído para o polimorfismo relativamente baixo na espécie se refere à origem dos genitores da população de mapeamento aqui utilizada. O genitor feminino 2(12) faz parte da coleção de germoplasma da Embrapa Cerrados e pertence à progênie de um indivíduo coletado na região do Vale do Guaporé, Rondônia (FERREIRA et al., 2010), podendo ser classificado como silvestre (JUNQUEIRA, comunicação pessoal). Tal progênie foi avaliada por Ferreira et al. (2010) por meio de marcadores RAPD e SSR revelando elevadíssimas taxas de cruzamento e

reforçando a idéia de auto-incompatibilidade na espécie. Por outro lado, o genitor masculino, SV3, foi coletado em propriedade particular que já produzia o maracujá-doce em pequena escala comercial. Possivelmente, a variabilidade alélica foi mantida apenas para alguns locos, dentre os quais os de auto-incompatibilidade (caso contrário, os frutos não estariam sendo produzidos), mas perdida para outros, por seleção artificial, mesmo que artesanalmente.

4.2.2 Marcas TRAP

Para os marcadores TRAP, dos 14 *primers* testados, apenas 3 apresentaram um bom padrão de amplificação, Kdc-F, P3-F e PR5. Esses *primers* foram então utilizados para a genotipagem da população de mapeamento F_1. Os indivíduos da população e mais os dois genitores foram caracterizados com base em 12 locos TRAP. Na figura 20 é apresentada parte de um gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata.

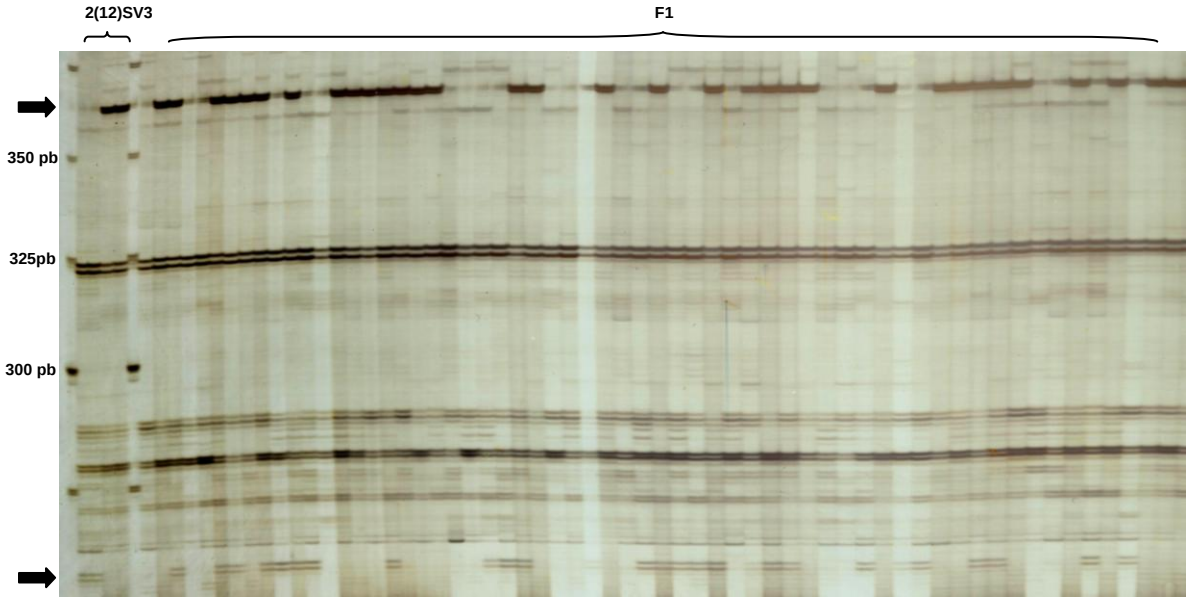

Figura 20 – Padrão de segregação dos locos TRAP: DNA dos genitores 2(12) e SV3 aplicados em duplicata e de parte da população F_1 após eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. As setas indicam locos polimórficos

Para os marcadores TRAP um total de 193 locos foram amplificados, dos quais 12 (6,22%) apresentaram polimorfismo. Os locos segregantes apresentaram padrão de segregação 1:1, sendo seis (50%) informativos (presença da banda) para o genitor SV3 e seis (50%) para o genitor 2(12). A tabela 16 mostra o número total de locos amplificados para os diferentes *primers* utilizados e a porcentagem de polimorfismo observada.

Tabela 16 – Número total de locos RGA amplificados, locos polimórficos e porcentagem de polimorfismo observada

Primer	N° total de locos	N° de locos polimórficos*
PR5	68	6 (8,82%)
P3-F	70	3 (4,28%)
Kdc-F	55	3 (5,45%)
Total	193	12 (6,22%)

* Entre parênteses está a porcentagem dos locos polimórficos

A taxa total de polimorfismo apresentada pelos marcadores TRAP foi 6,22%.

4.3 Sequenciamento das marcas RGA

Após o sequenciamento das marcas RGA foi observado, através de BLASTx, que duas marcas amplificadas a partir de maracujá-doce apresentaram similaridade a proteínas de resistência em *Populus trichocarpa* (D2-RGPF-S190) e *Malus domestica* (D1-NBSAF-S260) quando alinhadas com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI (Tabela 17).

Tabela 17 – RGAs alinhados com sequências putativas de resistência em *Malus e Populus*

Marcador RGA	Descrição	Domínio	Organismo	E-value	Identidade (%)
D2-RGPF-S190	Proteína de resistência	TIR-NBS-LRR	*Populus trichocarpa*	9,00 E-04	80
D1-NBSAF-S260	Proteína de resistência	NBS-LRR	*Malus domestica*	8,00 E-04	41

Paula et al. (2010) obtiveram resultados semelhantes em seu estudo de caracterização genética de espécies de *Passiflora.* Embora os gêneros *Passiflora* e *Populus* sejam filogeneticamente distintos, o nível de identidade da sequência de maracujá-doce foi alto (80%) quando comparado a uma sequência de *P. trichocarpa.* Isso indica que a utilização de dados gerados a partir de marcadores do tipo RGA pode ser interessante para estudos mais detalhados de caracterização genética do maracujazeiro.

Nas duas marcas que apresentaram similaridade a genes de resistência há um domínio NBS-LRR. Também há um domínio TIR na marca D2-RGPF-S190. Segundo Dodds *et al.,* (2001), as regiões NBS e TIR são responsáveis pela sinalização da presença do patógeno e a região LRR está envolvida no reconhecimento deste patógeno. Os mesmos autores dizem que a região LRR pode interagir com a proteína de avirulência ou com um complexo de proteínas formado pela proteína de avirulência do patógeno e outras proteínas do hospedeiro.

Essas duas marcas RGA foram alocadas no mapa de ligação integrado do maracujá-doce. A marca D2-RGPF-S190 foi alocada no grupo de ligação II e a marca D1-NBSAF-S260 foi alocada no grupo de ligação IV como será visto adiante.

4.4 Alocação das marcas no mapa de ligação integrado

O mapa integrado de maracujá-doce, construído por Nunes (2010) é composto de 315 marcas entre AFLP (296) e SSR (19). Pereira (2010) acrescentou a este mapa 147 marcas entre SSR (40), M-AFLP (106) e SNP (1). A partir das metodologias desenvolvidas neste trabalho, 23 marcadores RGA e 12 marcadores TRAP foram genotipados na mesma população de mapeamento. Destas 35 marcas, cinco RGA foram alocadas no mapa integrado. Todos esses marcadores foram selecionados para os critérios desvio de segregação e porcentagem de dados perdidos. A partir desta seleção, o mapa final aqui apresentado possui 429 marcas no total, sendo 248 AFLP, 69 SSR, 1 SNP, 106 M-AFLP e 5 RGA (Tabela 18).

Cabe lembrar, para as análises no software OneMap (MARGARIDO; SOUZA; GARCIA, 2007), o arquivo de entrada constou da totalidade das marcas genotipadas na

população, seguindo o tipo de cruzamento de cada loco, ou seja, com mistura de segregação.

Tabela 18 – Conjunto total de marcadores utilizados na construção do mapa genético de *Passiflora alata*

Marcadores	Biparentais			Uniparentais		Total
	A	B	C	D1	D2	
AFLP	3	-	16	103	126	248
SSR	6	3	12	9	39	69
SNP	-	1	-	-	-	1
M-AFLP	3	3	13	39	48	106
RGA	-	-	-	3	2	5
Total	12	7	41	154	215	429

Alguns grupos de ligação, I, II, IV e V, apresentaram uma mistura de marcas D1 e D2, enquanto nos outros grupos, houve uma predominância de um desses marcadores. Essa mistura é interessante, pois mostra que o grupo de ligação foi formado a partir da integração de marcas tanto do genitor masculino SV3 (marcas D1) quanto do genitor feminino 2(12) (marcas D2). Já alguns grupos apresentaram somente marcas do tipo D1 ou D2 (grupos VII e IX, respectivamente), indicando que são necessários mais marcadores biparentais para a integração dessas marcas (Tabela 19).

Em relação ao mapa integrado apresentado por Nunes (2010), sua extensão foi de 1725,3 para 1786,1 cM, o que corresponde a um acréscimo de 3,4% no comprimento total do mapa. Porém, quando se compara o mapa atual com o mapa apresentado por Pereira (2010), observa-se que houve uma diminuição em 30,6% do comprimento total, uma vez que o mapa de Pereira (2010) apresenta 2574,7 cM. Isso ocorreu porque para a confecção do mapa aqui apresentado foram adotados critérios um pouco mais rígidos na etapa de seleção de marcas utilizadas para a formação dos grupos de ligação. O número de marcas por grupo de ligação variou de 16 a 74 marcas (Tabela 20). O novo mapa neste estudo possui uma distância média entre marcas de 4,16 cM, indicando estar mais saturado do que os outros dois mapas construídos para *P. alata.*

Tabela 19 – Distribuição do número e tipos de marcas alocadas no mapa de ligação integrado de *Passiflora alata*

Grupo de Ligação	Biparentais			Uniparentais		Total
	A	B	C	D1	D2	
I	2	-	-	31	35	68
II	1	4	6	28	35	74
III	2	2	4	22	2	32
IV	1	-	13	21	20	55
V	4	-	10	28	28	70
VI	1	1	4	12	42	60
VII	-	-	1	-	31	32
VIII	-	-	1	1	20	22
IX	-	-	-	16	-	16
Total	11	7	39	159	213	429

Tabela 20 – Correspondência entre o número de marcas e o comprimento dos grupos de ligação do mapa integrado de *Passiflora alata*

Grupo de Ligação	Nº de marcas	Comprimento (cM)
I	68	270,80
II	74	254,86
III	32	202,32
IV	55	207,38
V	70	219,97
VI	60	238,78
VII	32	201,48
VIII	22	85,85
IX	16	104,67
Total	429	1786,11

Na Tabela 21 está um resumo da caracterização do mapa integrado aqui construído.

Tabela 21 – Caracterização do mapa integrado de *Passiflora alata* construído pelo *software* OneMap

Característica	Mapa Integrado
Grupos de ligação	9
Marcas ordenadas no *framework*	429
Comprimento total do mapa*	1786,11
Comprimento do maior grupo*	270,80
Comprimento do menor grupo*	85,85
Comprimento médio dos grupos*	198,45
Distância média entre marcas*	4,16

*Para a função de Kosambi (1944), em cM

As cinco marcas RGA foram alocadas nos grupos de ligação I (D1-PR5-S135), II (D2-RGPF-S190 e D1-PR5-S260) e VI (D1-NBSAF-S260 e D2-PR5-S220). Nas figuras 21 a 29 são mostrados os grupos de ligação formados com as respectivas marcas e posições.

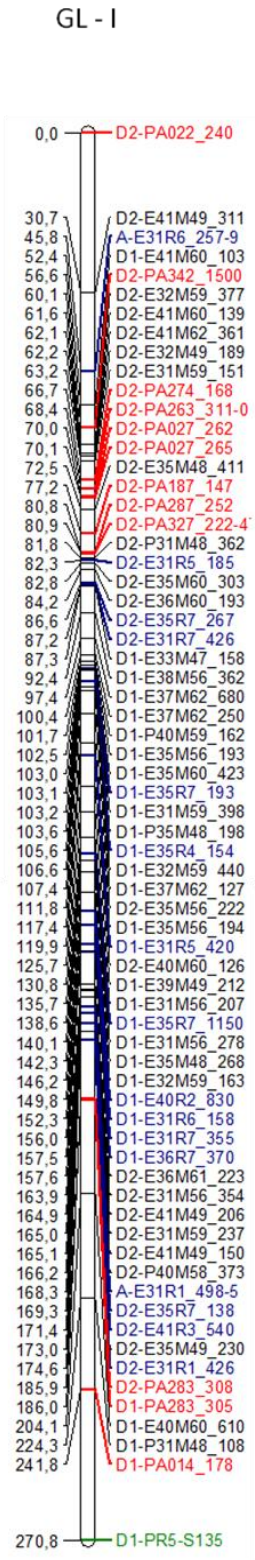

Figura 21 - Grupo de ligação I do mapa integrado de *Passiflora alata* construído para uma população F_1 segregante. Marcas em preto são AFLP, em vermelho são SSR, em azul são M-AFLP, em rosa é o SNP e em verde são RGA

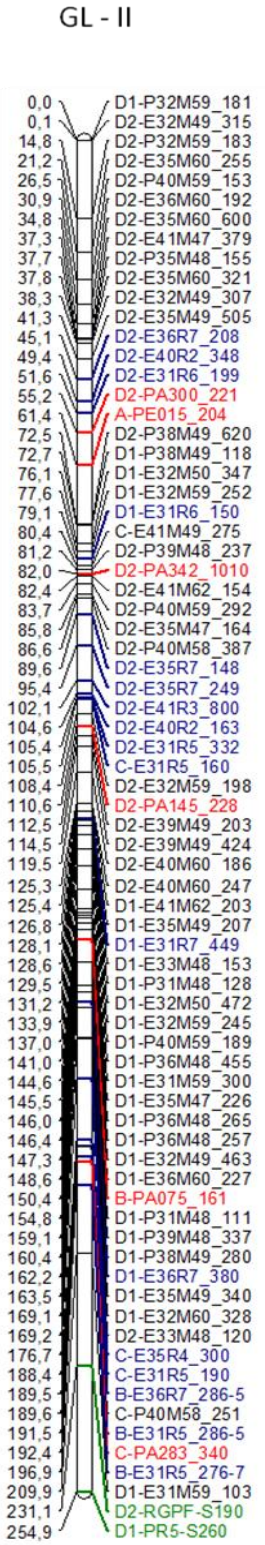

Figura 22 - Grupo de ligação II do mapa integrado de *Passiflora alata* construído para uma população F_1 segregante. Marcas em preto são AFLP, em vermelho são SSR, em azul são M-AFLP, em rosa é o SNP e em verde são RGA

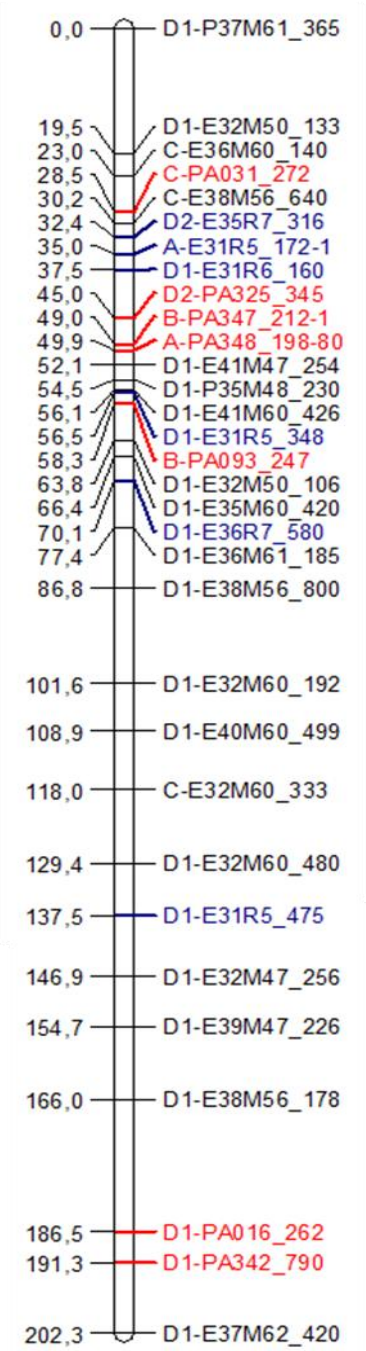

Figura 23 - Grupo de ligação III do mapa integrado de *Passiflora alata* construído para uma população F_1 segregante. Marcas em preto são AFLP, em vermelho são SSR, em azul são M-AFLP, em rosa é o SNP e em verde são RGA

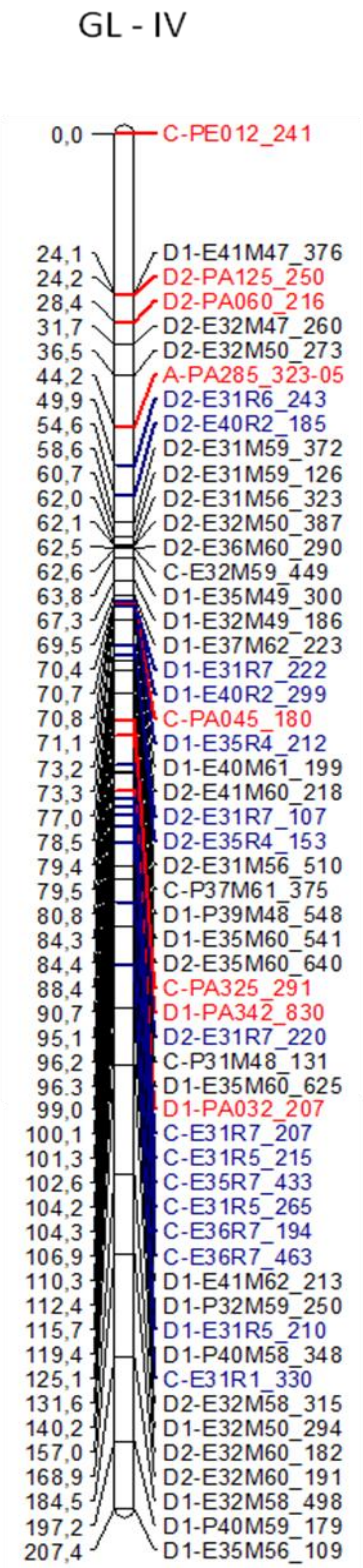

Figura 24 - Grupo de ligação IV do mapa integrado de *Passiflora alata* construído para uma população F_1 segregante. Marcas em preto são AFLP, em vermelho são SSR, em azul são M-AFLP, em rosa é o SNP e em verde são RGA

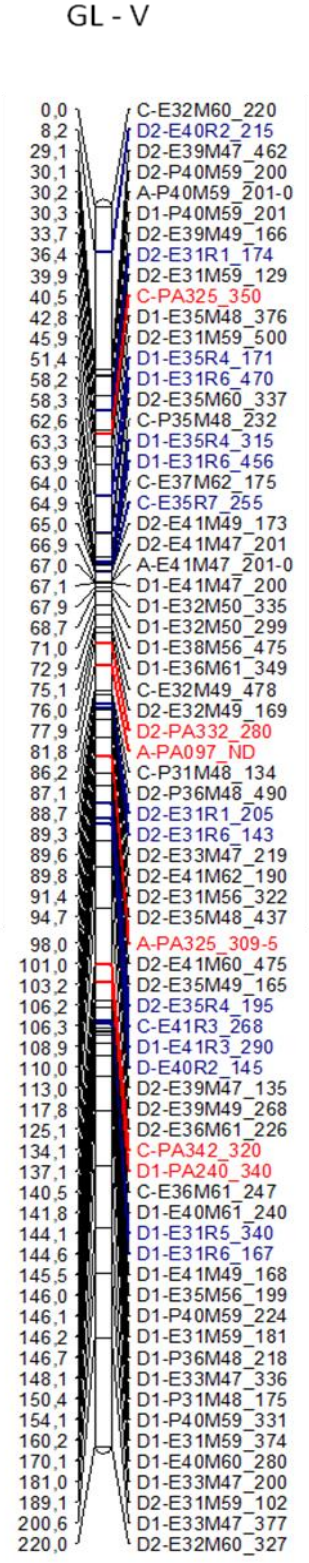

Figura 25 - Grupo de ligação V do mapa integrado de *Passiflora alata* construído para uma população F_1 segregante. Marcas em preto são AFLP, em vermelho são SSR, em azul são M-AFLP, em rosa é o SNP e em verde são RGA

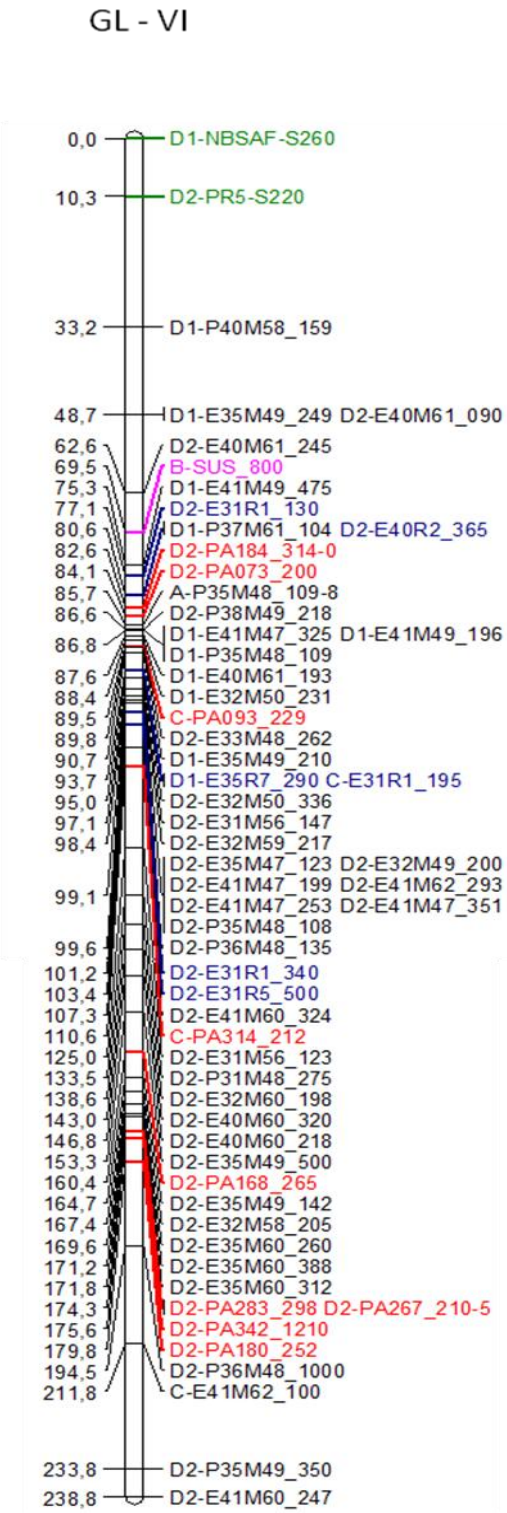

Figura 26 - Grupo de ligação VI do mapa integrado de *Passiflora alata* construído para uma população F_1 segregante. Marcas em preto são AFLP, em vermelho são SSR, em azul são M-AFLP, em rosa é o SNP e em verde são RGA

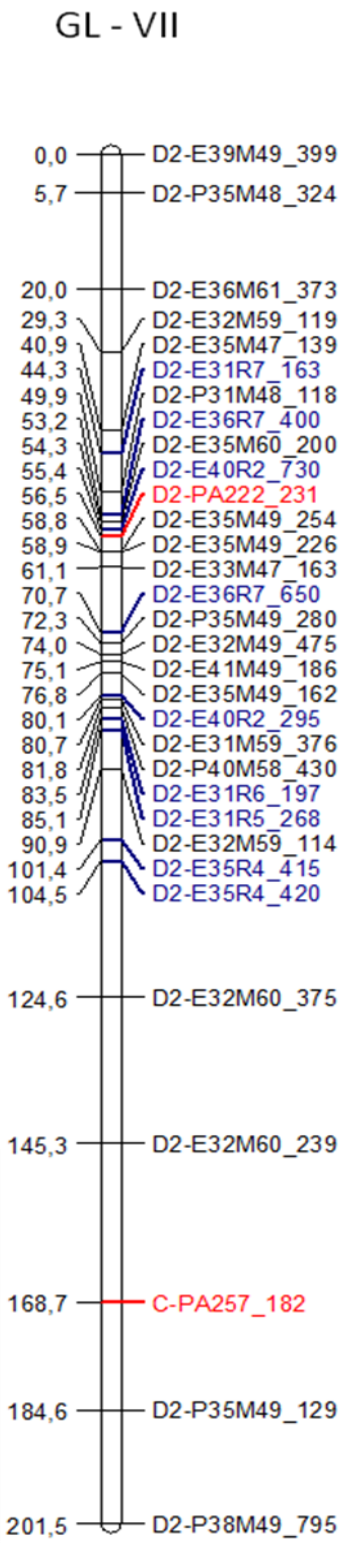

Figura 27 - Grupo de ligação VII do mapa integrado de *Passiflora alata* construído para uma população F_1 segregante. Marcas em preto são AFLP, em vermelho são SSR, em azul são M-AFLP, em rosa é o SNP e em verde são RGA

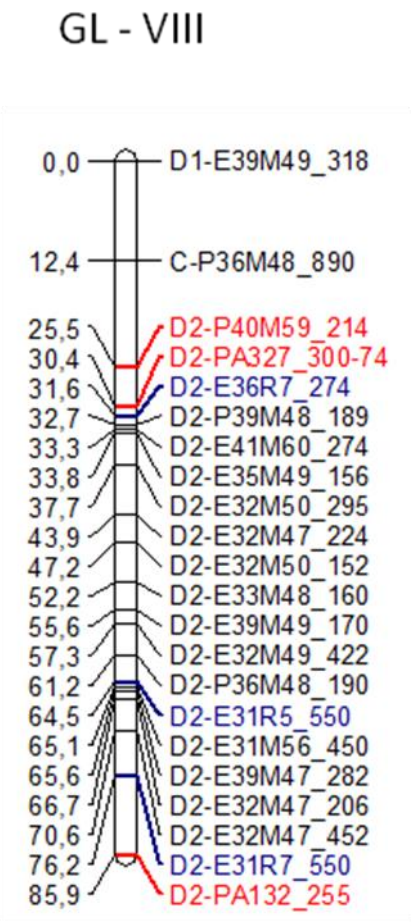

Figura 28 - Grupo de ligação VIII do mapa integrado de *Passiflora alata* construído para uma população F_1 segregante. Marcas em preto são AFLP, em vermelho são SSR, em azul são M-AFLP, em rosa é o SNP e em verde são RGA

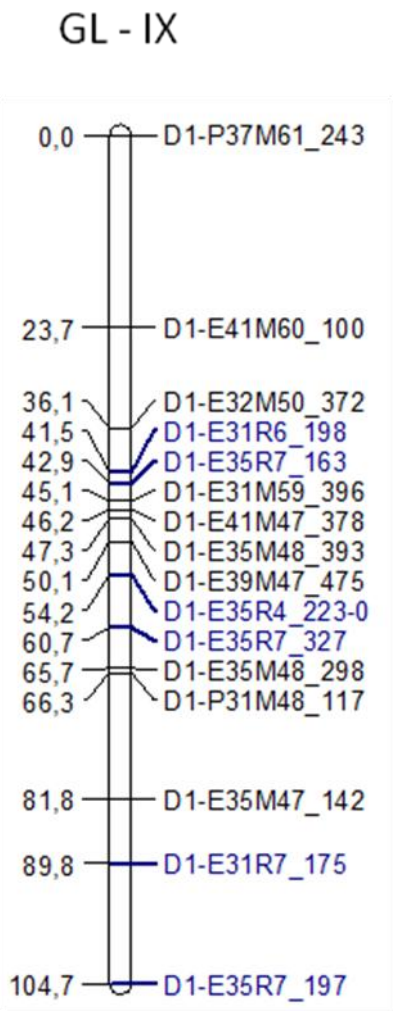

Figura 29 - Grupo de ligação IX do mapa integrado de *Passiflora alata* construído para uma população F_1 segregante. Marcas em preto são AFLP, em vermelho são SSR, em azul são M-AFLP, em rosa é o SNP e em verde são RGA

Observou-se uma baixa frequência de alocação das marcas RGA (5/23) no mapa integrado. Tal fato pode ter ocorrido em virtude da composição do mapa existente. O mapa de maracujá-doce foi construído com base em um arcabouço de marcas anônimas, tais como AFLP e SSR. Os RGA são marcas que indicam genes putativos, ou seja, sequências expressas, que, provavelmente estão localizadas em regiões genômicas distintas das outras marcas, dificilmente se ligando em posições próximas às marcas existentes. Tal fato também foi observado em maçã, onde, além de terem sido alocadas apenas oito marcas RGA no mapa da espécie, localizaram-se as marcas desse tipo somente nas extremidades dos grupos de ligação formados (NAIK et al.,

2006). Este fato foi observado igualmente no presente estudo, nos grupos de ligação I, II e VI. Isto significa que para se alocar marcadores derivados de sequências expressas, se faz necessário trabalhar com maior número destas sequências.

4.5 Mapeamento de QTL

Para o mapeamento de QTL foram utilizados os dados apenas do local Anhembi, uma vez que em Descalvado foram perdidos muitos tratamentos, em função da doença ocorrida, o que prejudicaria o desenvolvimento da análise.

O mapeamento realizado identificou QTL para todos os caracteres, utilizando *LOD Score* 2 como limiar. No total, foram detectadas 39 associações entre fenótipos e marcadores. Dos 39 QTL mapeados, 6 foram para diâmetro médios de frutos, 4 para comprimento médio de frutos, 5 para peso médio de frutos, 5 para espessura média da casca, 5 para peso médio da casca, 4 para peso médio da polpa, 5 para teor de sólidos solúveis totais, 3 para número médio de frutos e 2 para produção (Tabela 22).

Os valores de *LOD Score* variaram de 2,47 a 21,6, evidenciando QTL bem nítidos. A porcentagem fenotípica explicada pelos QTL (R^2) variou de 0,84% a 7,85%, sendo o maior valor de R^2 encontrado para peso médio da casca (Tabela 22).

Observou-se predominância de segregação 1:1 dos QTL. Porém, outros tipos de segregação, 1:2:1, 3:1 e 1:1:1:1 também foram encontrados.

Tabela 22 - QTL mapeados no mapa genético de maracujá-doce, segundo o modelo CIM, em Anhembi, SP, durante o ano de 2010

Caráter	GL	cM	Marcas Flanqueadoras	LOD	αp	LOD	αq	LOD	δpq	LOD	Fase	Segregação	R^2 (%)
DF	1	30,68	D2-E41M49_311	3,67	-0,14	0,04	1,01	3,46	0,20	0,17	Q^1Q^2	1-1	4,88
DF	1	185,97	D1-PA283_305	3,57	-0,74	1,89	-0,54	1,09	0,58	0,77	P^2P^1 x Q^2Q^1	1-2-1	3,39
DF	2	64,00	A-PE015_204 - D2-P38M49_620	3,92	0,60	1,56	-0,68	1,44	-0,50	1,01	P^1P^2 x Q^2Q^1	3-1	4,12
DF	2	231,13	D2-RGPF-S190	4,05	-0,08	0,03	1,16	3,74	0,29	0,25	Q^1Q^2	1-1	4,92
DF	5	70,96	D1-E38M56_475	3,57	-0,25	0,10	0,32	0,38	1,04	3,09	nd	1-1	2,76
DF	6	85,65	A-P35M48_109-8	4,04	-1,18	3,88	0,03	0,01	-0,25	0,07	P^2P^1	1-1	2,89
													22,96
CF	1	165,14	D2-E41M49_150	6,02	0,39	0,30	2,50	5,60	0,52	0,41	Q^1Q^2	1-1	3,5
CF	2	61,38	A-PE015_204	2,89	1,35	1,62	-0,98	0,51	-0,63	0,61	P^1P^2	1-1	3,21
CF	5	170,06	D1-E40M60_280	4,01	-0,92	0,71	0,72	0,36	1,61	2,65	nd	1-1	3,73
CF	6	124,97	D2-E31M56_123	2,72	-0,74	0,57	-0,89	0,89	0,97	0,99	Q^2Q^1	1-2-1	5,54
													15,98
PF	1	30,68	D2-E41M49_311	5,53	-4,62	0,73	12,50	4,48	1,49	0,08	Q^1Q^2	1-1	4,53
PF	2	61,38	A-PE015_204	3,66	8,95	2,90	-2,55	0,13	-3,87	0,68	P^1P^2	1-1	3,15
PF	4	131,58	D2-E32M58_315	2,89	1,23	0,15	-9,33	2,60	-3,01	0,07	Q^2Q^1	1-1	3,38
PF	5	70,96	D1-E38M56_475	4,15	-7,19	1,49	-1,56	0,04	9,42	2,26	P^2P^1	1-2-1	2,81
PF	6	110,60	C-PA314_212	2,47	-8,35	2,36	1,75	0,11	-0,06	0,01	P^2P^1	1-1	3,85
													17,72
EC	1	56,62	D2-PA342_1500	12,08	-0,21	2,74	0,24	4,01	-0,27	4,58	P^2P^1 x Q^1Q^2	3-1	3,24
EC	2	61,38	A-PE015_204	4,43	0,09	0,78	-0,07	0,44	-0,17	3,35	nd	1-1	3,01
EC	4	54,58	D2-E40R2_185	3,17	-0,08	0,26	-0,18	2,12	-0,09	0,40	Q^2Q^1	1-1	3,34
EC	5	89,26	D2-E31R6_143	3,70	-0,12	1,25	-0,08	0,76	0,13	1,47	P^2P^1	1-1	3,26
EC	6	93,71	D1-E35R7_290	21,60	-0,46	14,71	0,19	1,95	-0,24	3,19	P^2P^1 x Q^1Q^2	1-1-1-1	3,01
													15,86
PC	1	30,68	D2-E41M49_311	5,47	-3,26	0,41	11,38	4,77	1,11	0,09	Q^1Q^2	1-1	4,21
PC	2	26,52	D2-P40M59_153	2,57	5,33	1,54	0,49	0,01	-4,41	1,02	P^1P^2	1-2-1	4,32
PC	3	202,32	D1-E37M62_420	2,84	6,08	1,84					P^1P^2	1-1	0,96
PC	6	110,60	C-PA314_212	5,59	-11,56	4,85	4,25	0,71	0,58	-0,05	P^2P^1	1-1	3,5
PC	8	37,74	D2-E32M50_295	3,89	3,19	0,68	-8,50	3,20	-0,30	0,01	Q^2Q^1	1-1	7,85
													20,84
PP	1	146,23	D1-E32M59_163	2,54	1,41	1,72	0,48	0,12	-1,11	0,79	P^1P^2	1-1	6,43
PP	1	185,97	D1-PA283_305	2,94	-1,12	1,28	-0,25	0,03	1,41	1,55	P^2P^1	1-2-1	5,86
PP	5	58,34	D2-E35M60_337	2,88	0,48	0,25	0,19	0,05	1,87	2,65	nd	1-1	2,75
PP	9	41,51	D1-E31R6_198	4,56	3,14	4,56					P^1P^2	1-1	0,95
													15,99
SST	1	66,68	D2-PA274_168	3,06	0,03	0,04	-0,06	0,43	-0,17	2,60	nd	1-1	6,78
SST	1	135,66	D1-E31M56_207	3,50	-0,04	0,09	0,08	0,66	0,17	2,61	nd	1-1	6,18
SST	3	44,96	D2-PA325_345	3,67	0,05	0,25	-0,22	3,36	0,04	0,00	Q^2Q^1	1-1	3,03
SST	6	180,00	D2-PA180_252 - D2-P36M48_1000	4,68	0,01	0,01	0,22	4,67			Q^1Q^2	1-1	6,69
SST	9	54,16	D1-E35R4_223-0	2,58	-0,16	1,58					P^2P^1	1-1	0,84
													23,52
NF	1	30,68	D2-E41M49_311	4,37	-2,71	0,09	13,62	4,20	0,39	0,01	Q^1Q^2	1-1	5,47
NF	1	142,27	D1-E35M48_268	2,59	-5,20	0,87	6,07	1,14	-4,26	0,48	P^2P^1 x Q^1Q^2	1-2-1	4,05
NF	6	0,00	D1-NBSAF-S260	2,90	11,77	2,80	1,04	0,00	1,93	0,11	P^1P^2	1-1	3,88
													13,4
PR	1	30,68	D2-E41M49_311	3,76	-1,22	0,43	2,82	3,19	-0,02	0,00	Q^1Q^2	1-1	4,7
PR	7	5,71	D2-P35M48_324	3,23			-3,06	3,23			Q^2Q^1	1-1	0,97
													5,67

GL: grupo de ligação; cM: posição do marcador que flanqueia o QTL; $\alpha_{p:}$ efeito marginal do genitor *P* (SV3); $\alpha_{q:}$ efeito marginal do genitor *Q* (2(12)); $\delta_{pq:}$ efeito devido à interação; R^2: porcentagem da variação fenotípica explicada pelo QTL

4.5.1 QTL para diâmetro médio do fruto (DF)

No total, foram mapeados seis QTL para DF. A porcentagem da variação fenotípica total explicada por estes QTL foi de 22,96%. Para serem considerados significativos, os valores de LOD dos parâmetros relacionados ao genitor SV3 (αp), ao genitor 2(12) (αq) e a interação entre eles (δpq) devem ser superiores a 0,8.

Os QTL para DF distribuíram-se entre os grupos de ligação I, II, V e VI. O loco quantitativo localizado no grupo de ligação I na posição 30,67 cM apresentou efeito marginal significativo apenas para o genitor feminino 2(12) (LOD de αq = 3,45), indicando ação gênica aditiva e ser este o genitor responsável pelos alelos que conferem aumento no fenótipo do caráter. Uma vez que o valor de αq apresentou valor com sinal positivo, pode-se concluir que esses alelos estão em fase de associação. Este QTL é responsável por 4,88% da variação fenotípica do caráter DF. Já o segundo loco quantitativo, alocado no grupo de ligação I, na posição 185,96 cM, apresentou afeitos marginais significativos (αp e αq) para ambos os genitores, o que indica que tanto o genitor masculino quanto o genitor feminino são responsáveis por transmitir alelos que conferem aumento no DF. Este QTL explicou 3,39% da variação fenotípica apresentada e os alelos responsáveis pelo aumento no fenótipo estavam em fase de repulsão (sinais negativos de αp e αq) em ambos os genitores.

No grupo de ligação II foram mapeados dois QTL. O primeiro deles, na posição 64,00 cM, apresentou efeitos marginais significativos para os dois genitores e também para a interação entre eles. Isso significa que além dos alelos presentes em cada genitor, a combinação desses alelos também contribui para o aumento do fenótipo. De acordo com os sinais apresentados, conclui-se que os alelos no genitor masculino estão em associação e os alelos do genitor feminino estão em repulsão nesse caso. Este loco quantitativo explicou 4,12% da variação fenotípica total. O segundo loco quantitativo presente nesse grupo de ligação, na posição 231,13 cM, explicou 4,92% da variação fenotípica total. Os efeitos marginais foram significativos apenas para o genitor 2(12) e indicaram que os alelos estão em fase de associação nesse genitor.

O único loco quantitativo mapeado no grupo de ligação V, na posição 70,96 cM, foi responsável pelo valor mais baixo de R^2 (2,76%) para DF. Interessante observar que

o efeito marginal significativo foi o da interação, indicando que a combinação de alelos dos genitores é mais favorável para o aumento do DF do que os efeitos específicos dos alelos de cada genitor. Neste caso, como não houve efeito significativo nem de αp nem αq, as fases dos alelos nos genitores não puderam ser inferidas (nd).

No grupo de ligação VI foi observado um loco quantitativo na posição 85,65 cM. Este loco é responsável por 2,89% da variação fenotípica e apresentou efeito significativo apenas para o genitor SV3, indicando ser este o genitor que contem os alelos, em fase de repulsão, que aumentam o fenótipo.

Os dados aqui apresentados são condizentes com outros trabalhos, mesmo utilizando outras técnicas para mapeamento de QTL. Moraes (2005) identificou quatro QTL para DF em maracujá-amarelo, coletando dados no mesmo local do presente estudo, ou seja, em Anhembi, sendo que o loco quantitativo de menor efeito explicou 6,4% e o de maior efeito 14,3% da variação fenotípica total para o caráter. Zhang et al. (2010) analisando uma população originária do cruzamento de dois acessos de cereja, identificou três QTL para diâmetro de fruto que explicaram de 4,2 a 39,4 % da variação fenotípica do caráter.

A seguir são apresentados os gráficos que ilustram a presença dos QTL para DF em cada grupo de ligação (Figura 30). Os gráficos estão apresentados em -log10(pvalor) e não em LOD, porém, os limiares e a interpretação para que se considere a presença do QTL se mantêm os mesmos.

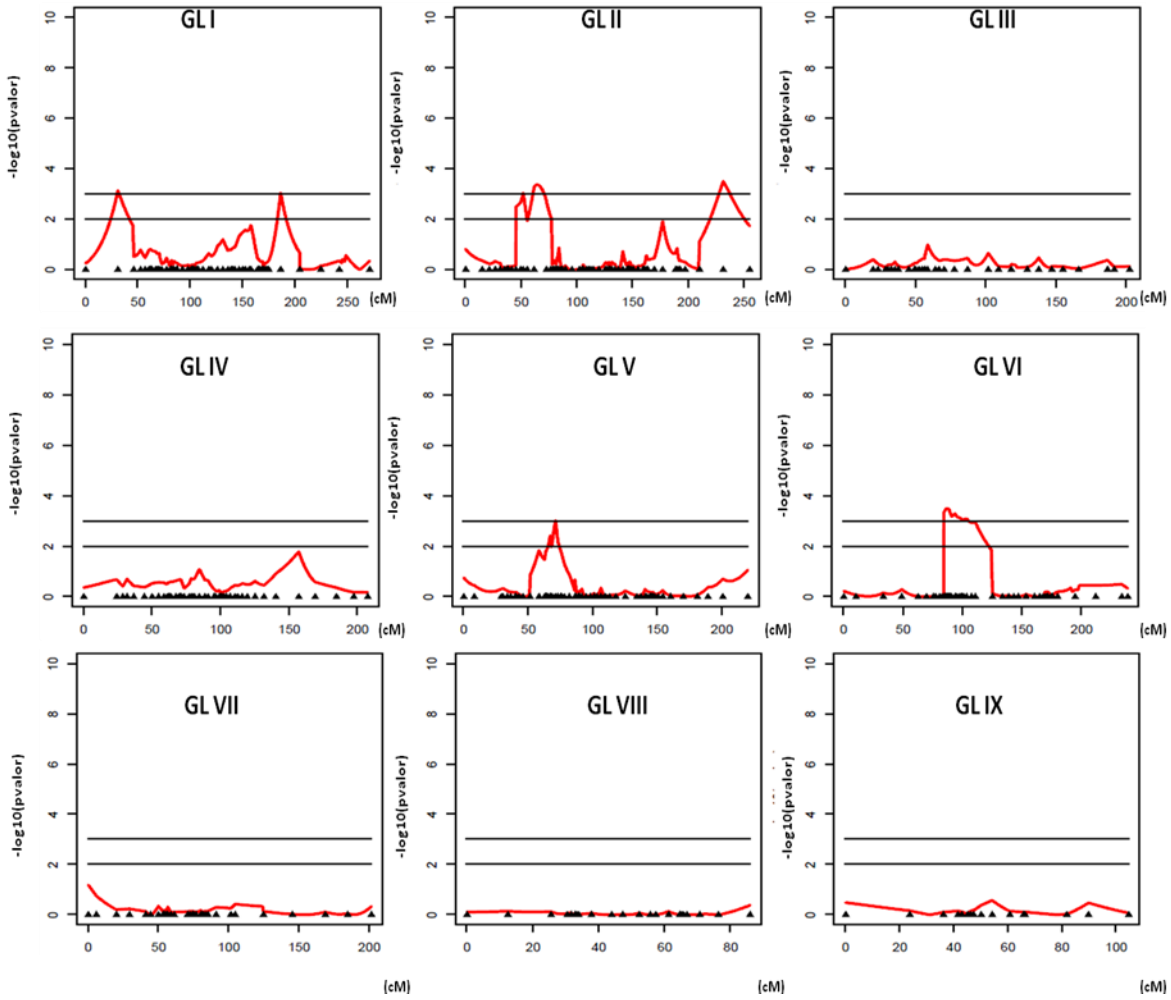

Figura 30 – Gráficos que ilustram a presença de QTL (-log10(pvalor)>2) nos nove grupos de ligação de maracujá-doce

4.5.2 QTL para comprimento médio do fruto (CF)

Foram mapeados quatro QTL para CF, um em cada grupo de ligação. A proporção da variação fenotípica total explicada por estes QTL foi de 15,98%.

O loco quantitativo identificado no grupo de ligação I foi mapeado na posição 165,14 cM e explicou 3,5% da variação fenotípica para o caráter. Esse QTL apresentou efeito significativo e positivo apenas para o genitor 2(12), indicando que os alelos responsáveis pelo aumento do fenótipo estão em associação.

No grupo de ligação II foi mapeado um loco quantitativo, na posição 61,38 cM que se comporta da mesma maneira que o loco anterior (GL I), porém para o genitor masculino SV3. Esse QTL representa 3,21% da variação fenotípica total do caráter.

O QTL mapeado no grupo de ligação V, na posição 170,06 cM, foi mais um caso em que não se conseguiu inferir a fase de ligação dos alelos nos genitores em função dos efeitos marginais serem significativos apenas para a interação entre os alelos dos genitores. De qualquer forma, este loco quantitativo resulta de uma boa combinação alélica e explicou 3,73% da variação fenotípica total para CF.

O último loco quantitativo mapeado foi o que mais explicou a porcentagem da variação fenotípica para CF (5,54%) e foi atribuído ao grupo de ligação VI. Esse loco apresentou efeitos marginais significativos para o genitor 2(12) e para a interação dos alelos dos genitores, indicando que SV3, nesse caso, não contribui individualmente com alelos favoráveis, porém a combinação deles com os do genitor 2(12) produz ganhos para o caráter. Como os efeitos apresentaram sinal negativo, a fase inferida dos alelos nos genitores é a de repulsão.

Também estes resultados estão de acordo com a literatura. Moraes (2005) mapeou cinco QTL para CF em maracujá-amarelo coletando dados no mesmo local do presentes estudo, ou seja, em Anhembi, sendo que o loco quantitativo de menor efeito explicou 6,1% e o de maior efeito 13,6% da variação fenotípica. Zhang et al. (2010) encontraram três QTL controlando o comprimento do fruto em cereja que, em média, explicaram conjuntamente 24,91% da variação fenotípica.

Um fato bastante interessante aqui observado foram as localizações dos QTL para DF e CF. Por serem caracteres correlacionados geneticamente (MORAES, 2005), os QTL para ambos foram atribuídos aos mesmo grupos de ligação (I, II, V e VI). Isso reforça a idéia de que quando praticada a seleção para um caráter, automaticamente, estará se fazendo seleção para o caráter correlacionado.

A seguir, são apresentados os gráficos que ilustram a presença dos QTL para CF em cada grupo de ligação (Figura 31). Os gráficos estão apresentados em –log10(pvalor) e não em LOD, porém, os limiares e a interpretação para que se considere a presença do QTL se mantêm os mesmos.

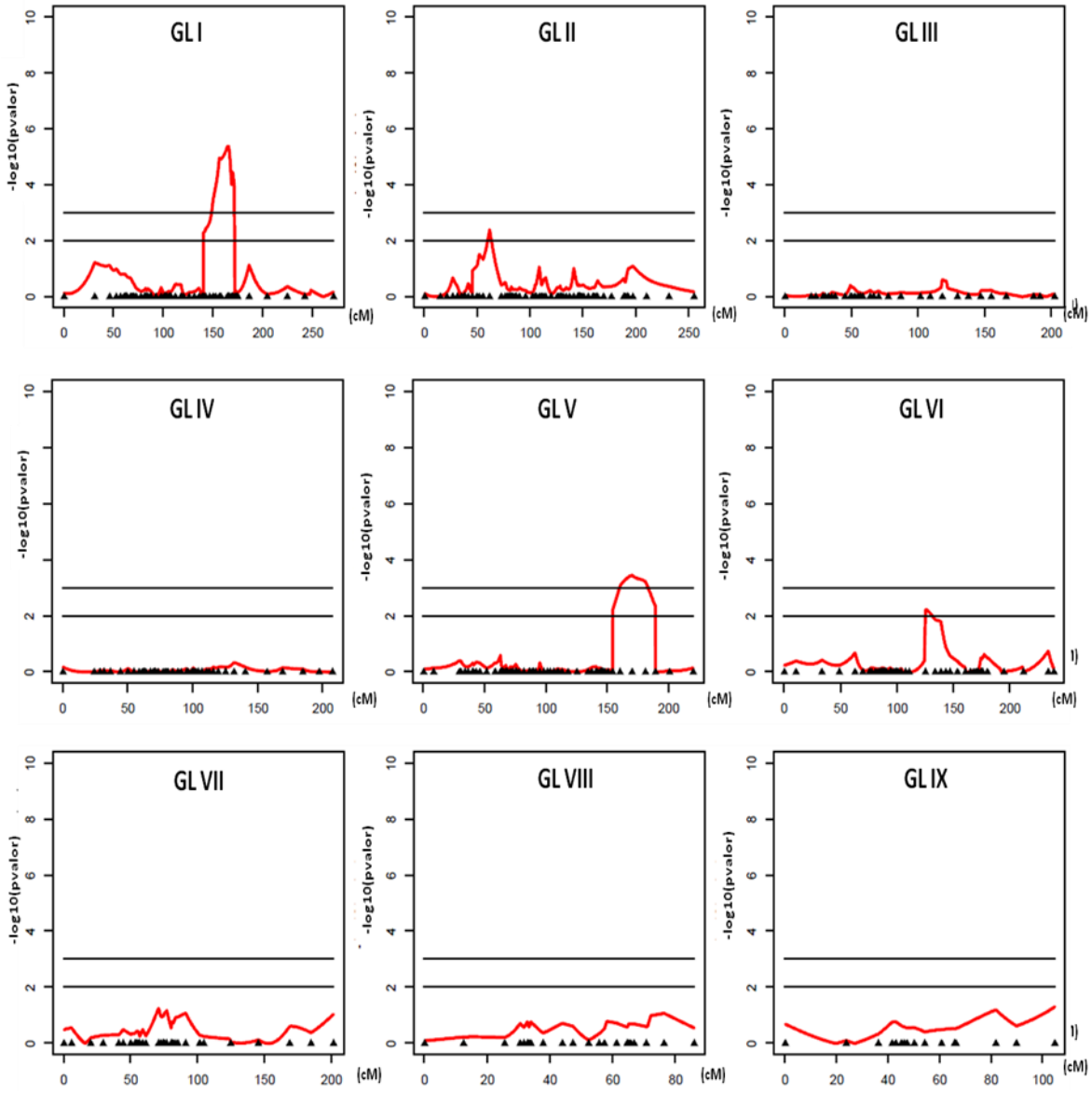

Figura 31 – Gráficos que ilustram a presença de QTL (-log10(pvalor)>2) nos nove grupos de ligação de maracujá-doce

4.5.3 QTL para peso médio do fruto (PF)

Foram mapeados no total cinco QTL para peso médio do fruto. Esses QTL se localizaram em cinco grupos de ligação diferentes e explicam 18,59% da variação fenotípica detectada para o caráter.

O primero loco quantitativo foi mapeado no grupo de ligação I na posição 30,67 cM. Foi detectado efeito marginal significativo apenas para o genitor 2(12) e este loco foi responsável por 4,53% da variação fenotípica apresentada pelo caráter. A fase de segregação dos alelos observada foi a de associação. O loco quantitativo mapeado no grupo de ligação II apresentou comportamento semelhante, porém para o outro genitor. Os alelos responsáveis pelo aumento no fenótipo estão em associação e são provenientes do genitor masculino SV3. Esse QTL é responsável por 3,15% da variação fenotípica observada.

Um terceiro loco quantitativo para PF foi mapeado. Esse loco localizou-se no grupo de ligação IV, na posição 131,58 cM e foi responsável por 3,38% da variação fenotípica encontrada. Os alelos responsáveis pelo aumento do fenótipo são provenientes do genitor 2(12), porém se encontram em repulsão.

No grupo de ligação V foi mapeado um QTL na posição 70,96 cM. Esse QTL apresentou efeitos marginais significativos tanto para o genitor SV3 quanto para a interação dos alelos dos genitores, indicando que, apesar de o genitor 2(12) não possuir alelos que individualmente contribuem para o aumento do caráter, a combinação alélica é favorável. O QTL foi responsável por 2,81% da variação fenotípica e os alelos estavam em repulsão.

Também foi encontrado um loco quantitativo no grupo de ligação VI na posição 110,60 cM. Esse loco explica 3,85% da variação fenotípica do caráter. O único efeito marginal significativo foi para o genitor SV3 e os alelos do genitor estavam em repulsão. Da mesma forma, Moraes (2005) mapeou quatro QTL para PF em maracujá-amarelo em Anhembi, sendo que o QTL de menor efeito explicou 8,43% e o de maior efeito 10,38% da variação fenotípica. Zhang et al. (2010) encontraram três QTL controlando o peso do fruto em cereja que, em média, explicaram conjuntamente ao longo de três anos 17,73% , 25,20% e 43% da variação fenotípica do caráter.

A seguir são apresentados os gráficos que ilustram a presença dos QTL para PF em cada grupo de ligação (Figura 32). Os gráficos estão apresentados em –log10(pvalor) e não em LOD, porém, os limiares e a interpretação para que se considere a presença do QTL se mantêm os mesmos.

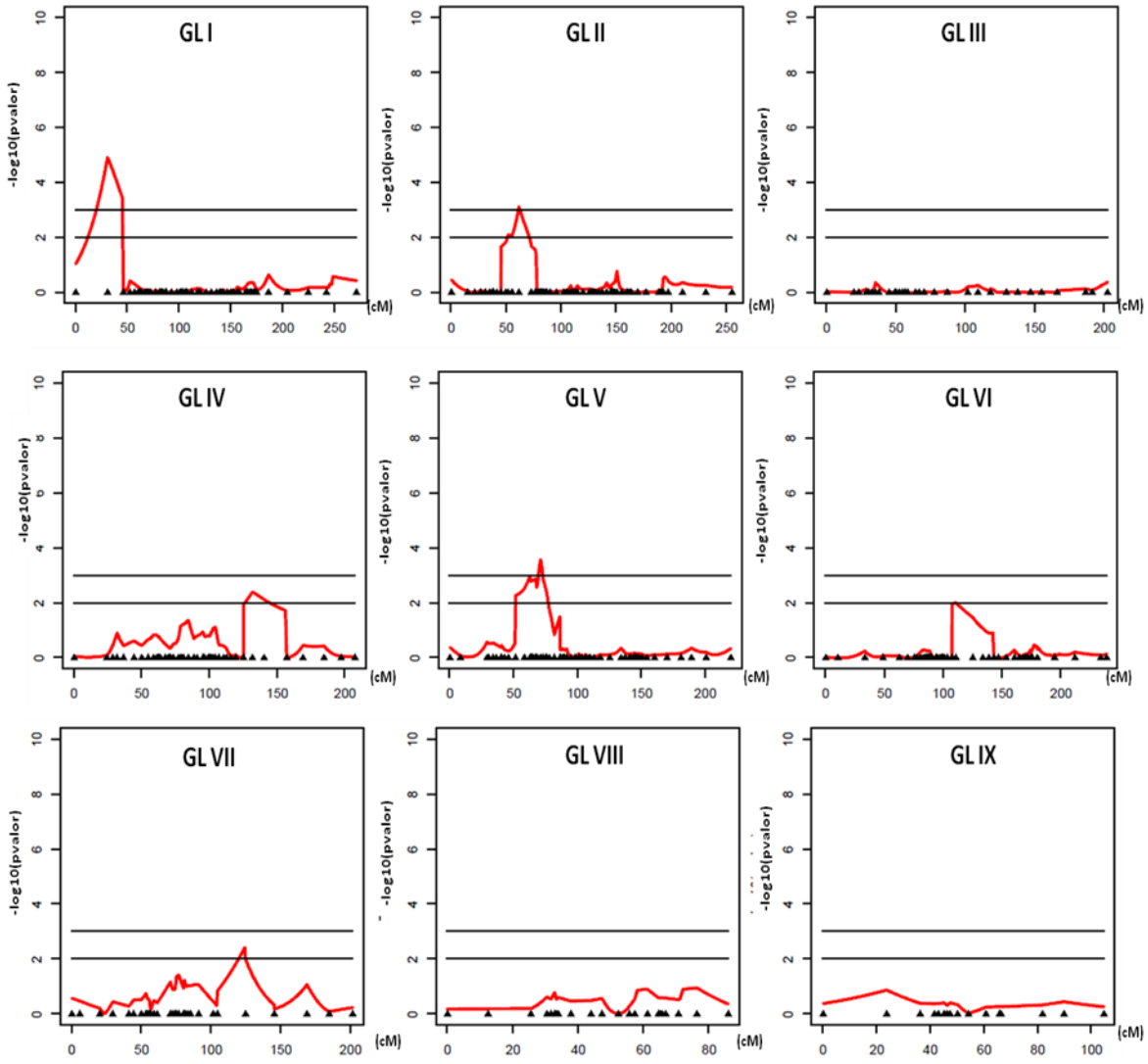

Figura 32 – Gráficos que ilustram a presença de QTL (-log10(pvalor)>2) nos nove grupos de ligação de maracujá-doce

4.5.4 QTL para espessura da casca (EC)

Um total de cinco QTL foram mapeados para EC. O R^2 total explicado por estes QTL foi de 15,86%. Esses QTL se distribuíram em cinco grupos de ligação diferentes.

O primeiro loco quantitativo mapeado foi localizado no grupo de ligação I na posição 56,62 cM e explicou 3,24% da variação fenotípica apresentada pelo caráter EC. Os três efeitos marginais foram significativos, indicando que existem alelos responsáveis pelo aumento do caráter em ambos os genitores, além da interação entre

eles ser favorável. Neste caso os alelos encontraram-se em repulsão para o genitor SV3 e em associação para o genitor 2(12), ou seja, o genitor SV3 contribui para a redução do fenótipo, enquanto o genitor feminino contribui para o aumento do fenótipo.

No grupo de ligação II foi mapeado um loco quantitativo que explica 3,01% da variação fenotípica na posição 61,38 cM. Esse loco apresentou efeitos marginais significativos somente para a interação, ou seja, a combinação dos alelos dos genitores contribui para o aumento no fenótipo. Neste caso não foi possível estimar a fase de ligação desse loco.

Um terceiro loco quantitativo foi mapeado no grupo de ligação IV na posição 54,58 cM. Esse loco explicou 3,34% da variação fenotípica existente e apresentou efeito marginal significativo apenas para o genitor 2(12), sendo este o responsável pela redução no fenótipo, uma vez que os alelos encontraram-se em fase de repulsão.

Efeitos marginais significativos para o genitor SV3 e para a interação foram observados no loco quantitativo mapeado no grupo de ligação V na posição 89,26 cM. Esse loco explicou 3,26% da variação fenotípica observada e estava em fase de repulsão, indicando que os alelos presentes nesse genitor são responsáveis pela diminuição no fenótipo.

O último loco quantitativo mapeado para EC foi localizado no grupo de ligação VI na posição 93,71 cM. Esse loco explicou 3,01% da variação fenotípica total para o caráter EC. Foram observados efeitos marginais significativos para os dois genitores e também para a interação. Os sinais das estimativas indicaram que o genitor SV3 é responsável pela diminuição no fenótipo e o genitor 2(12), ao contrário, é responsável pelo aumento no fenótipo. O sinal negativo da interação indicou que a combinação dos alelos resultou em redução no fenótipo observado.

Para espessura de casca, a seleção é realizada na direção contrária a dos demais caracteres. O melhoramento visa à diminuição da espessura da casca, em função do aumento da porcentagem de polpa. Dessa forma, os QTL que interessam para a seleção, neste caso, são aqueles que se encontram em repulsão, ou seja, cujos alelos reduzem o valor fenotípico. Constatou-se que o genitor SV3 relativamente à espessura de casca possui alelos mais favoráveis que o genitor 2(12), ou seja, possui alelos que são responsáveis pela diminuição do caráter estudado.

A seguir, são apresentados os gráficos que ilustram a presença dos QTL para EC em cada grupo de ligação (Figura 33). Os gráficos estão apresentados em –log10(pvalor) e não em LOD, porém, os limiares e a interpretação para que se considere a presença do QTL se mantêm os mesmos.

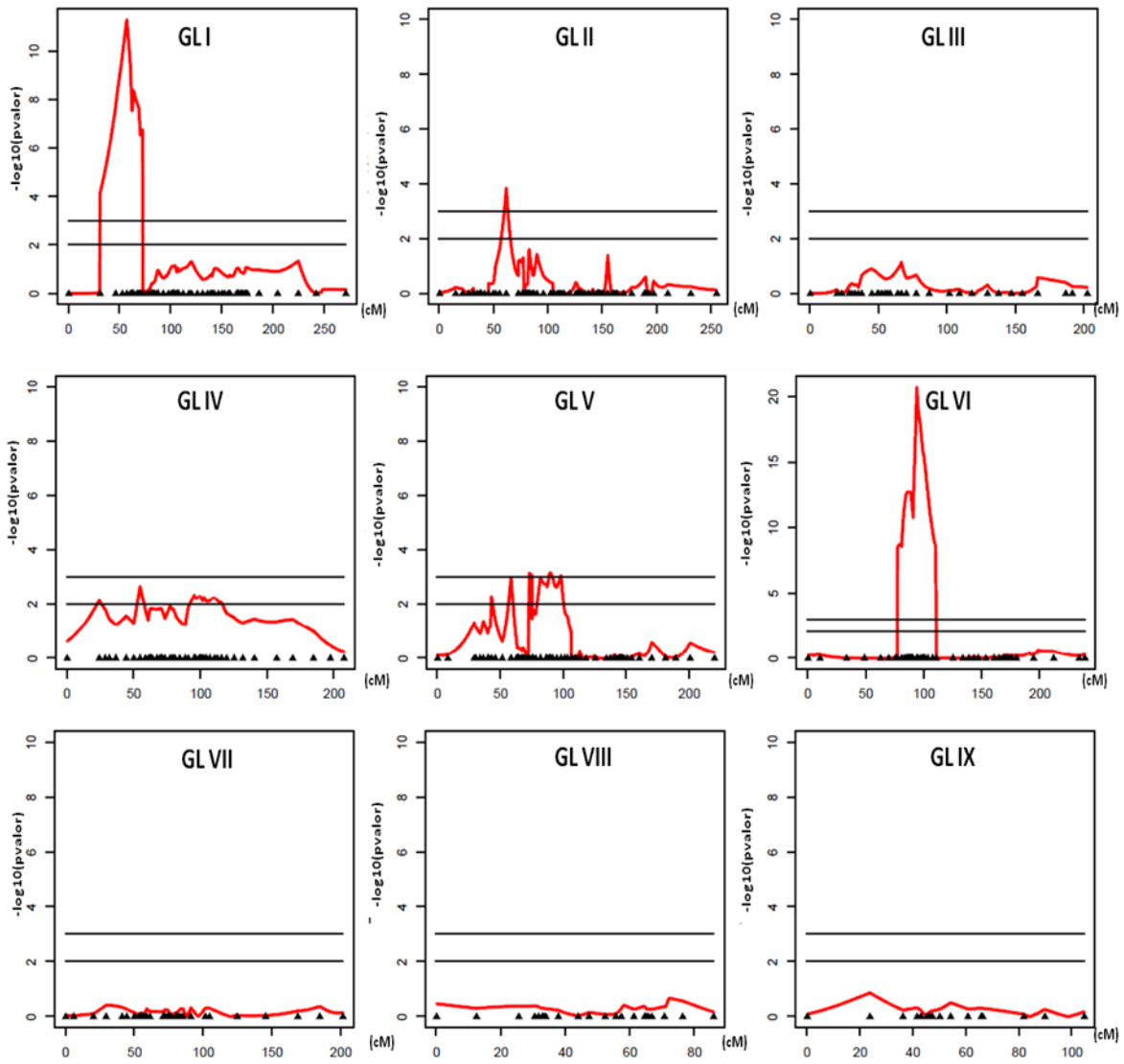

Figura 33 – Gráficos que ilustram a presença de QTL (-log10(pvalor)>2) nos nove grupos de ligação de maracujá-doce

4.5.5 QTL para peso da casca (PC)

Para o caráter PC foram encontrados cinco QTL em grupos de ligação distintos e que explicaram 20,84% da variação fenotípica total observada para o caráter.

O primeiro loco quantitativo foi mapeado no grupo de ligação I na posição 30,67 cM. Esse loco foi responsável por 4,21% da variação fenotípica do caráter e apresentou efeito marginal significativo apenas para o genitor 2(12). Pelo sinal da estimativa do parâmetro constatou-se que o genitor feminino possui alelos responsávei pelo aumento no fenótipo, ou seja, em fase de associação.

No grupo de ligação II foi mapeado um loco quantitativo na posição 26,52 cM. Os efeitos marginais do genitor SV3 e da interação foram significativos, porém, apesar dos alelos do genitor masculino estarem em associação, o sinal negativo da interação indicou que a combinação dos alelos parentais resultou em diminuição no fenótipo.

O loco quantitativo que apresentou o menor valor de R^2 (0,96%) entre todos os carcateres foi mapeado no grupo de ligação III na posição 202,32 cM. Para esse QTL só foi possível inferir parâmetros para o genitor masculino SV3. Observou-se que este genitor apresenta alelos em associação, aumentando o valor de PC.

Foi encontrado um loco quantitativo para PC no grupo de ligação VI na posição 110,59 cM. Este loco apresentou efeito marginal significativo e negativo apenas para o genitor SV3, indicando que este genitor possui alelos responsáveis pela diminuição no fenótipo observado na população. Este loco foi responsável por 3,5% da variação fenotípica observada para PC.

O último loco quantitativo para o caráter PC e que apresentou maior valor de R^2 (7,85%) foi mapeado no grupo de ligação VIII na posição 37,74 cM. Este QTL apresentou efeito marginal signifcativo apenas para o genitor 2(12), sendo este genitor responsável por alelos que conferem redução no fenótipo observado, ou seja, os alelos apresentaram-se em repulsão.

Também para este caráter, a seleção é realizada no sentido de reduzir-se o peso da casca, em consequência da redução da espessura da mesma. Nesse sentido, como discutido para o caráter anterior (EC), deve-se considerar como alelos favoráveis aqueles que reduzem o valor fenotípico observado na população.

A seguir são apresentados os gráficos que ilustram a presença dos QTL para PC em cada grupo de ligação (Figura 34). Os gráficos estão apresentados em –log10(pvalor) e não em LOD, porém, os limiares e a interpretação para que se considere a presença do QTL se mantêm os mesmos.

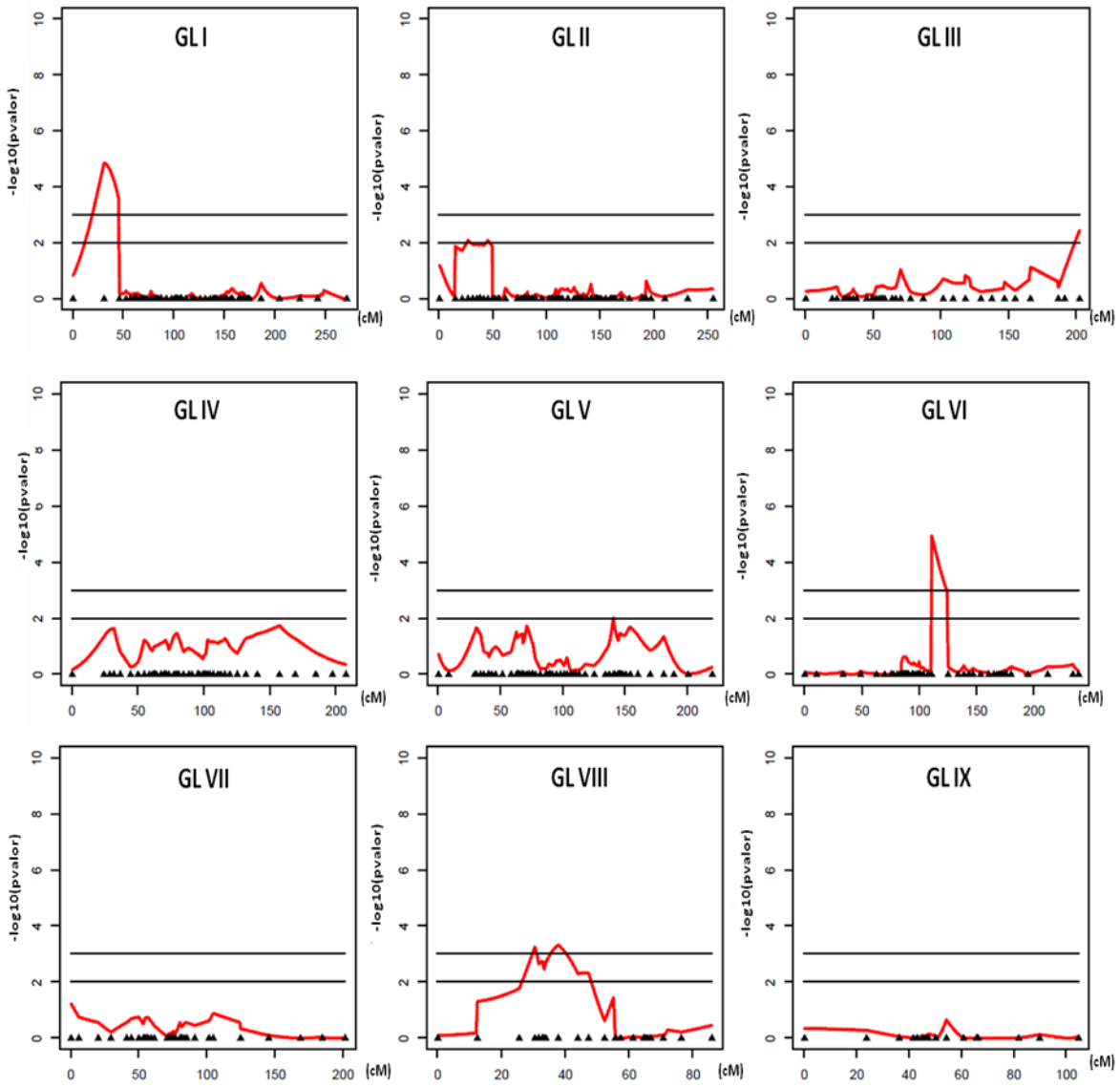

Figura 34 – Gráficos que ilustram a presença de QTL (-log10(pvalor)>2) nos nove grupos de ligação de maracujá-doce

4.5.6 QTL para peso de polpa (PP)

Para peso de polpa foram mapeados quatro QTL que explicaram no total 15,99% da variação fenotípica observada. Esses QTL se distribuíram em três grupos de ligação distintos.

No grupo de ligação I foram mapeados dois QTL. O primeiro deles, na posição 146,23 cM, explicou 6,43% da variação fenotípica do caráter. Esse loco quantitativo apresentou efeito marginal significativo e positivo apenas para o genitor SV3, indicando que os alelos deste parental estão em fase de associação, contribuindo para o aumento do fenótipo. Já o segundo loco quantitativo mapeado nesse mesmo grupo de ligação, na posição 185,96 cM, explicou 5,86% da variação fenotípica observada. Esse loco teve efeitos marginais significativos para o genitor SV3 e para a interação. Observou-se que os alelos do genitor masculino estão em repulsão, ou seja, atuam no sentido de reduzir o caráter PP. Já a interação apresentou sinal positivo, o que significa que a combinação dos alelos resulta em aumento no fenótipo observado na população.

Um terceiro loco quantitativo foi encontrado no grupo de ligação V na posição 58,33 cM. Esse loco foi responsável por 2,75% da variação fenotípica observada. O único efeito marginal significativo encontrado foi o da interação, o que significa que os parentais, individualmente, não possuem alelos favoráveis ao caráter, porém a combinação desses alelos resultam em uma resposta para aumento do peso da polpa.

O último loco quantitativo mapeado para PP foi localizado no grupo de ligação IX na posição 41,51 cM. Esse loco foi responsável por apenas 0,95% da variação fenotípica observada para o caráter. Só foi possível estimar parâmetros para o genitor SV3. Observou-se que esse genitor possui alelos em associação que são responsáveis pelo aumento do fenótipo observado.

O mesmo número de QTL foi encontrado por Moraes (2005) em maracujá-amarelo em Anhembi, sendo que o loco quantitativo de menor efeito explicou 6,56% e o de maior efeito 11,55% da variação fenotípica.

O caráter peso de polpa é um dos caracteres de maior importância para o maracujá-doce. Por ser um fruto exclusivamente de mesa, ou seja, para consumo *in*

natura, o melhoramento no sentido de incrementar PP é o que interessa para os produtores.

A seguir são apresentados os gráficos que ilustram a presença dos QTL para PP em cada grupo de ligação (Figura 35). Os gráficos estão apresentados em –log10(pvalor) e não em LOD, porém, os limiares e a interpretação para que se considere a presença do QTL se mantêm os mesmos.

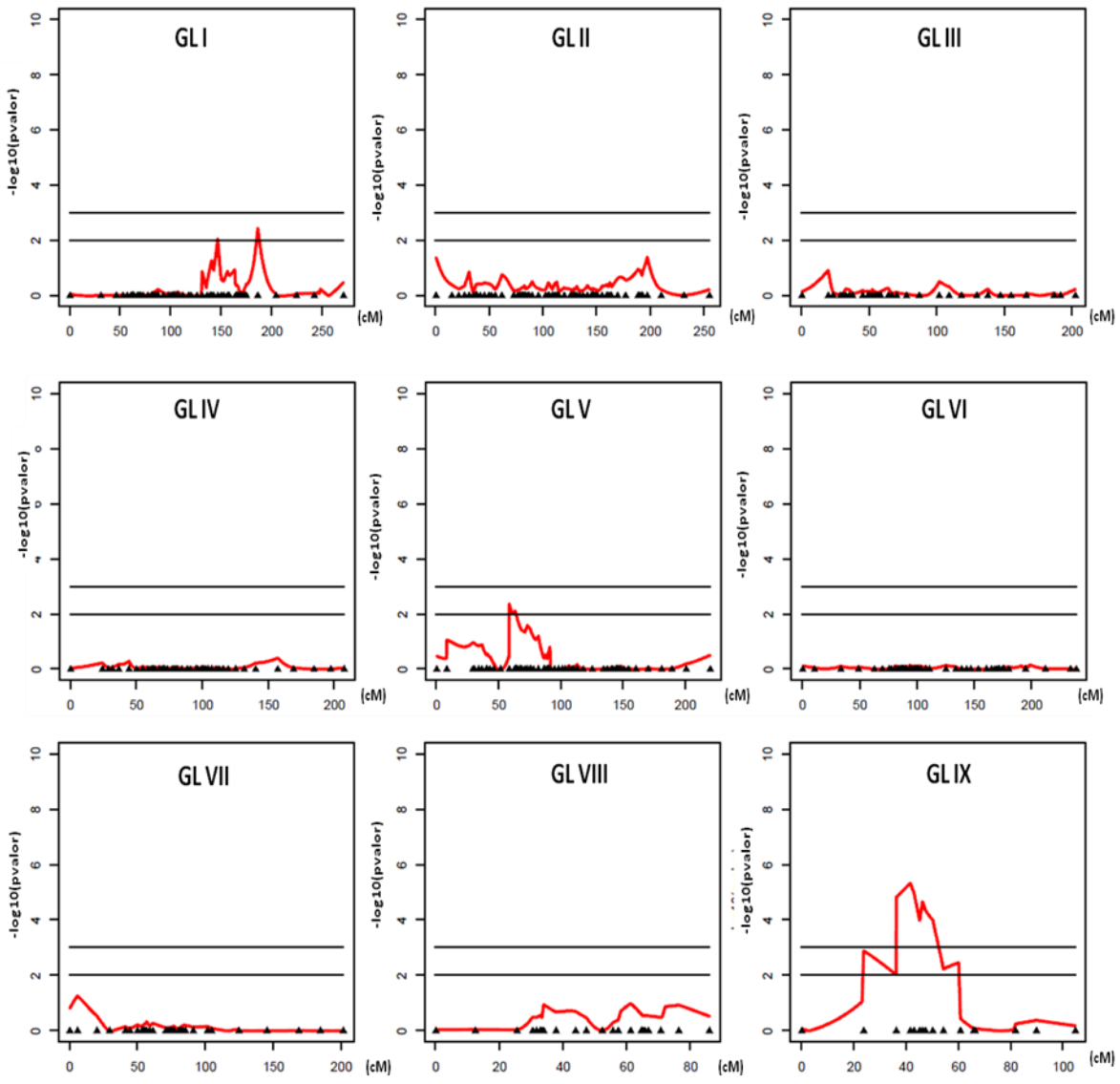

Figura 35 – Gráficos que ilustram a presença de QTL (-log10(pvalor)>2) nos nove grupos de ligação de maracujá-doce

4.5.7 QTL para sólidos solúveis totais (SST)

No total, cinco QTL foram mapeados para o caráter SST. Esses QTL foram responsáveis por 23,52% da variação fenotípica observada para o caráter e se distribuíram em quatro grupos de ligação distintos.

No grupo de ligação I foram mapeados dois QTL. O primeiro na posição 66, 68 cM explicou 6,78% da variação fenotípica total do caráter e apresentou efeito marginal significativo apenas para a interação entre os genitores. Essa combinação de alelos foi responsável pela diminuição do fenótipo observado. O segundo loco quantitativo observado nesse grupo de ligação explicou 6,18% da variação fenotípica e também apresentou efeito marginal significativo apenas para a interação dos alelos dos genitores. Porém neste caso a interação resultou em aumento do fenótipo SST.

O terceiro loco quantitativo encontrado foi localizado no grupo de ligação III na posição 44,96 cM. Esse loco apresentou efeito marginal significativo e negativo apenas para o genitor 2(12), indicando que esse parental possui alelos responsáveis pela diminuição do fenótipo do caráter.

O grupo de ligação VI apresentou um loco quantitativo que explicou 6,69% da variação fenotípica do caráter mapeado na posição 180 cM. Esse loco também apresentou efeito marginal significativo apenas para o genitor feminino 2(12). Nesse caso o efeito foi positivo, indicando que esse parental possui alelos que são responsáveis pelo aumento no SST. Não foi possível estimar os parâmetros para a interação entre os genitores.

Um último loco quantitativo para SST foi mapeado no grupo de ligação IX na posição 54,16 cM. Esse loco explicou apenas 0,84% da variação fenotípica e apresentou efeito marginal significativo apenas para SV3. O sinal negativo indicou que esse genitor possui alelos que diminuem o fenótipo. Não puderam ser estimados parâmetros nem para o genitor feminino e, consequentemente, nem para a interação entre os genitores.

Em relação a esse caráter, Causse et al. (2007), estudando a qualidade de frutos em tomate, mapearam três QTL associados a SST com o QTL de maior efeito explicando 31,9 % e o de menor 7,3 % da variação fenotípica. Já Ritter et al. (2008)

mapearam três QTL para teor de sólidos solúveis totais em dois ambientes de produção em sorgo.

A seguir são apresentados os gráficos que ilustram a presença dos QTL para SST em cada grupo de ligação (Figura 36). Os gráficos estão apresentados em –log10(pvalor) e não em LOD, porém, os limiares e a interpretação para que se considere a presença do QTL se mantêm os mesmos.

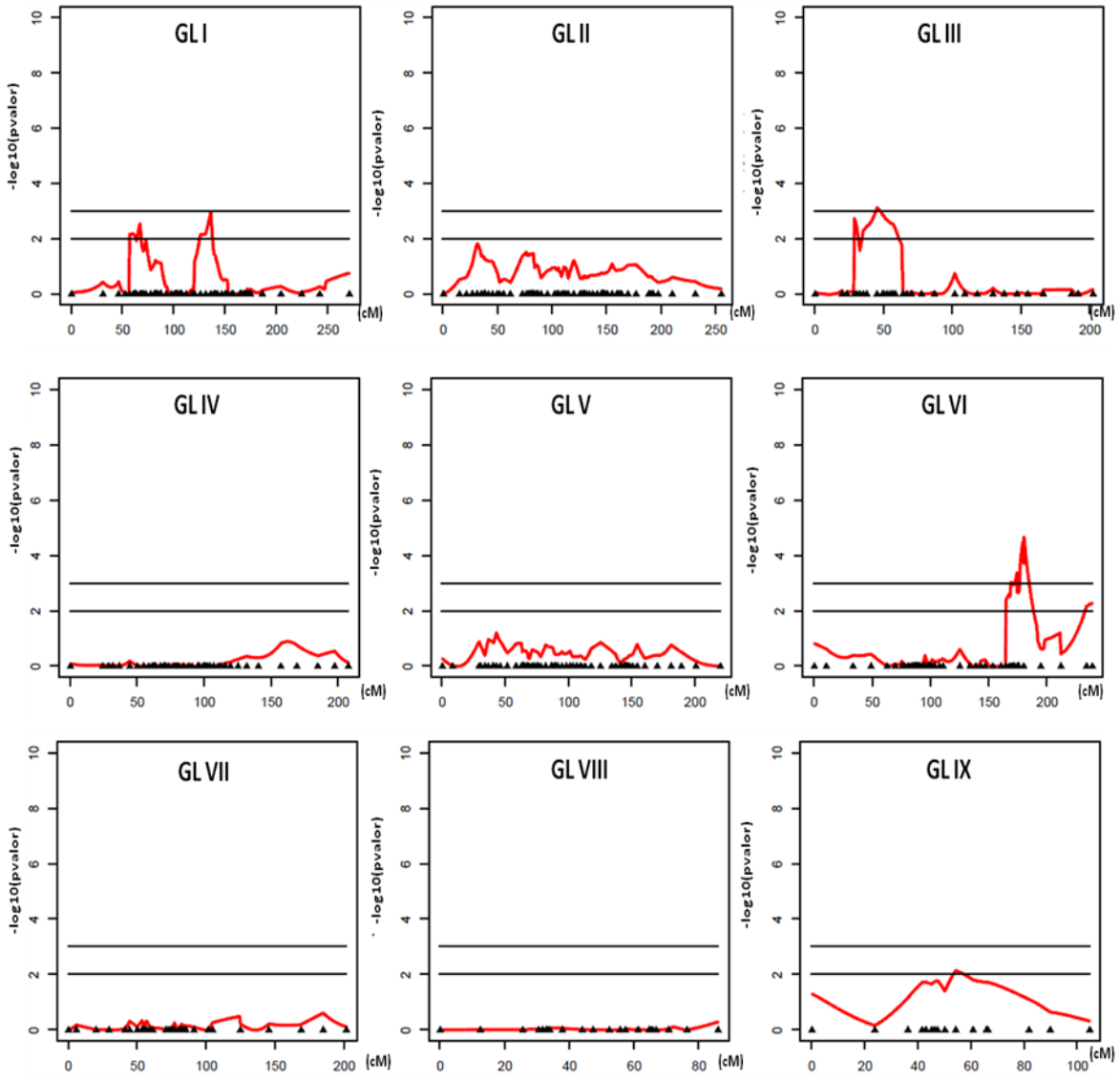

Figura 36 – Gráficos que ilustram a presença de QTL (-log10(pvalor)>2) nos nove grupos de ligação de maracujá-doce

4.5.8 QTL para número de frutos (NF)

Foram mapeados três QTL em dois grupos de ligação distintos para o caráter NF. Esses QTL explicaram, no total, 13,4% da variação fenotípica observada para o caráter.

No grupo de ligação I foram encontrados dois QTL. O primeiro deles, na posição 30,67 cM foi responsável por 5,47% da variação fenotípica total do caráter. Esse loco quantitativo apresentou efeito marginal significativo apenas para o genitor 2(12), indicando ser este o genitor detentor dos alelos que conferem aumento do fenótipo. O outro loco quantitativo mapeado nesse mesmo grupo de ligação localizou-se na posição 142,27 cM e explicou 4,05% da variação fenotípica do caráter. Esse loco apresentou efeitos marginais significativos para ambos os genitores. Foi possível observar que o genitor masculino possui alelos em repulsão que diminuem o fenótipo, enquanto o genitor feminino possui alelos em associação que aumentam os valores do fenótipo.

Moraes (2005) mapeou uma quantidade maior de QTL (sete no total) para NF em maracujá-amarelo em Anhembi. O loco quantitativo de menor efeito explicou 4,55% e o de maior efeito 16,49% da variação fenotípica total do caráter. Garcia et al. (2000) encontraram 19 QTL controlando o número de frutos em uma população oriunda do cruzamento de duas plantas heterozigóticas em *Citrus*. Liebhard et al. (2003) encontraram três QTL para número de frutos segregando em uma população F1 de macieira explicando de 3,2 a 10% da variância fenotípica.

A seguir são apresentados os gráficos que ilustram a presença dos QTL para NF em cada grupo de ligação (Figura 37). Os gráficos estão apresentados em –log10(pvalor) e não em LOD, porém, os limiares e a interpretação para que se considere a presença do QTL se mantêm os mesmos.

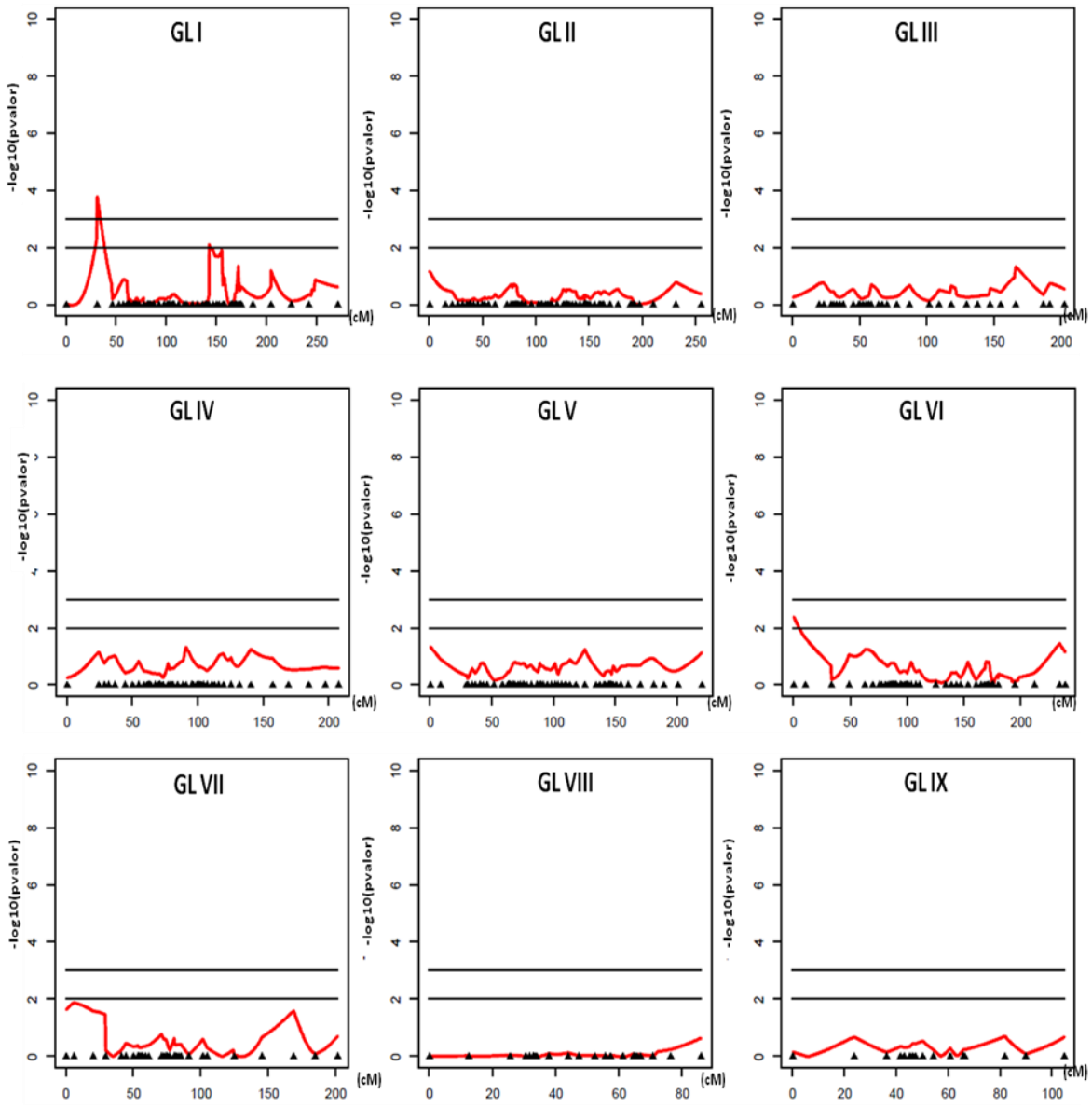

Figura 37 – Gráficos que ilustram a presença de QTL (-log10(pvalor)>2) nos nove grupos de ligação de maracujá-doce

4.5.9 QTL para produção (PR)

Foram mapeados um total de dois QTL para o caráter PR. Esses QTL explicaram 5,67% da variação fenotípica total para produção. O primeiro loco quantitativo foi localizado no grupo de ligação I na posição 30,67 cM e explicou 4,7% da variação fenotípica do caráter. Esse loco apresentou efeito marginal significativo e positivo

apenas para o genitor 2(12), indicando ser o genitor feminino o responsável pela transmissão de alelos favoráveis que aumentam a produção.

Já o segundo loco quantitativo foi mapeado no grupo de ligação VII e não explicou muito da variação fenotípica para o caráter (0,97%). Esse loco apresentou efeito marginal significativo e negativo apenas para o genitor 2(12), indicando que esse genitor também é responsável pela presença de alelos desfavoráveis ao caráter observado.

Moraes (2005) mapeou seis QTL para PR em maracujá-amarelo em Anhembi, sendo que o loco quantitativo de menor efeito explicou 6,60% e o de maior efeito 15,02% da variação fenotípica observada. 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.

A seguir são apresentados os gráficos que ilustram a presença dos QTL para PR em cada grupo de ligação (Figura 38). Os gráficos estão apresentados em –log10(pvalor) e não em LOD, porém, os limiares e a interpretação para que se considere a presença do QTL se mantêm os mesmos.

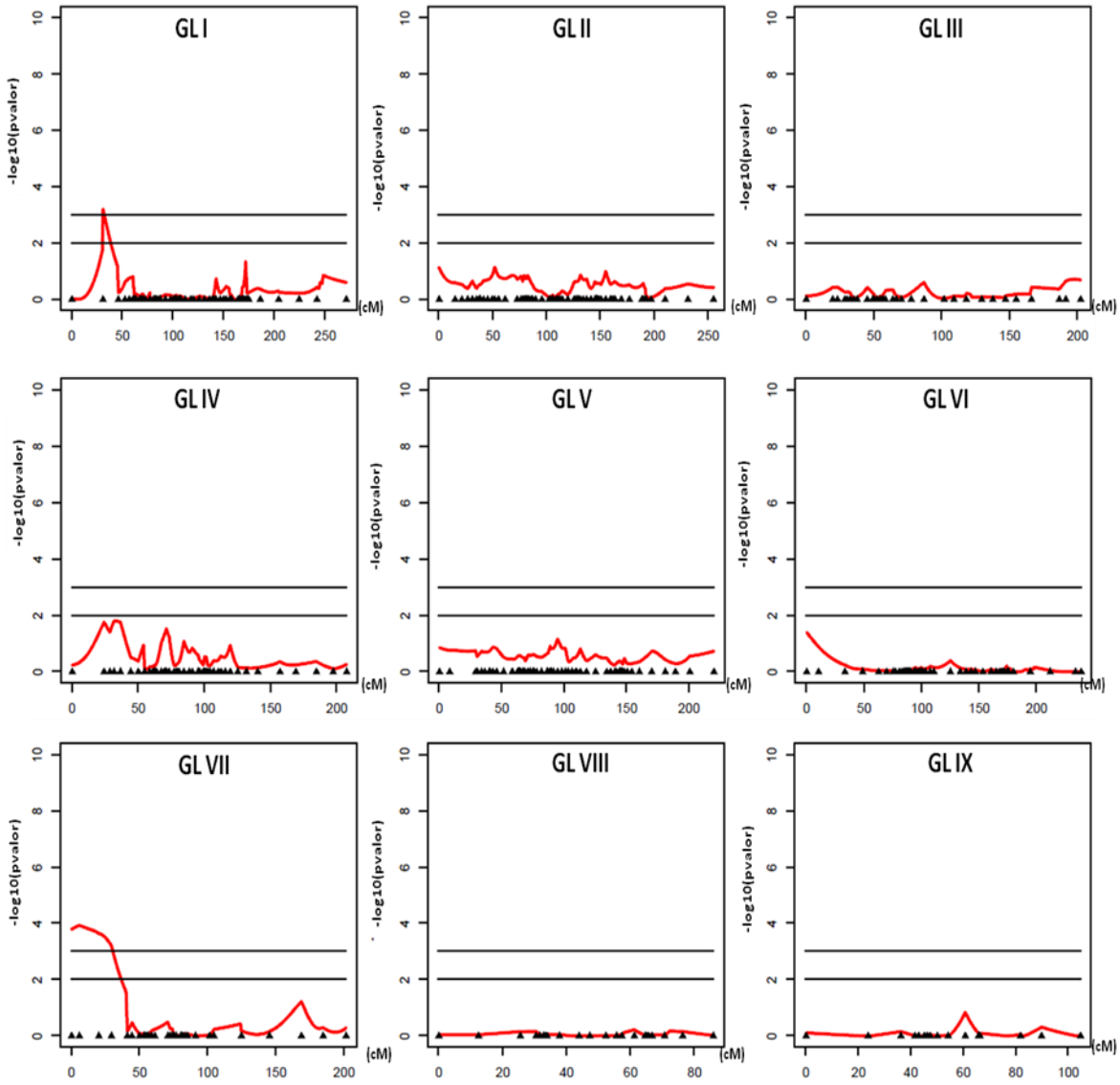

Figura 38 – Gráficos que ilustram a presença de QTL (-log10(pvalor)>2) nos nove grupos de ligação de maracujá-doce

4.6 Considerações sobre os QTL mapeados em maracujá-doce

Convém lembrar que o método aqui usado para o mapeamento de QTL foi o CIM, segundo a proposta de Gazaffi (2009), utilizando um mapa integrado contendo marcadores com diferentes padrões de segregação (1:1, 3:1, 1:2:1 e 1:1:1:1).

A distribuição dos QTL foi desuniforme, havendo um grupo de ligação com apenas um loco quantitativo (GL-VIII) e um grupo com 13 QTL (GL-I). Observou-se, de

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

As análises dos QTL revelaram 18 efeitos marginais significativos para o genitor SV3, 19 efeitos marginais significativos referentes ao genitor 2(12) e 13 efeitos marginais significativos para a interação alélica. Os QTL que apresentaram efeitos significativos para o genitor SV3 foram localizados em regiões do mapa de ligação onde ocorre a predominância de marcas do tipo D1 (Tabela 13). O mesmo ocorreu para os QTL que apresentaram efeitos significativos para o genitor 2(12). Esses QTL foram localizados em regiões do mapa de ligação onde houve predominância de marcas do tipo D2 (Tabela 13). Fato semelhante foi observado por Gazaffi (2009) que utilizou o mesmo método de mapeamento em cana-de-açúcar. Entre os 41 efeitos marginais significativos encontrados por esse autor, 11 estavam associados ao genitor 'SP80-180' e os demais ao genitor 'SP80-4966'. Nesse mesmo trabalho, Gazaffi (2009) observou que, nas regiões que continham QTL cujos efeitos significativos estavam relacionados a um ou a outro genitor, havia apenas um tipo de marcador.

Dentre os QTL mapeados para os nove caracteres avaliados observou-se predominância de ação gênica aditiva, pois, de forma geral, os maiores valores de *LOD* estavam associados aos efeitos marginais αp e αq (Tabela 22).

Foi observada a presença de QTL no grupo de ligação I para todos os caracteres avaliados. Tal fato indica que nesse grupo de ligação estão posicionados blocos gênicos relacionados a diferentes caracteres quantitativos. Embora a população de mapeamento (F_1) seja constituída de 100 indivíduos, as estimativas de R^2 evidenciaram uma porcentagem bastante significativa do fenótipo explicada pelos QTL. Isso pode ser bastante útil em futuros processos de seleção assistida.

Alwala et al. (2009) afirmam que o sucesso em detectar QTL depende, em parte, da magnitude dos efeitos dos QTL, da estrutura e do tamanho da população de mapeamento. Para se fazer bom uso da informação gerada, deve-se atentar para a direção e a magnitude dos efeitos, pois o ganho desejado pode ser com a redução e não com o aumento de determinado fenótipo, como é o caso dos caracteres EC e PC.

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

Observou-se que os QTL, em geral, foram mapeados nas mesmas regiões genômicas de cada grupo de ligação. Para os caracteres DF, PF, PC, NF e PR, os QTL foram todos mapeados no grupo de ligação I aproximadamente na posição de 30 cM (Tabela 22). Para DF, CF e PP os QTL foram mapeados também no grupo de ligação I, porém na posição aproximada de 170 cM. No grupo de ligação II foram mapeados QTL para DF, CF, PF e EC na posição aproximada de 61 cM. Convém lembrar que Moraes (2005) também identificou vários QTL em regiões coincidentes nos mesmos grupos de ligação para produção total, número total de frutos, comprimento médio de frutos e formato de frutos em maracujá-amarelo.

A coincidência aqui detectada, provavelmente, tem uma relação direta com o coeficiente de correlação genética dos caracteres, ou seja, os locos que se sobrepõem no mapa explicam variações em caracteres que apresentam correlações genéticas altas e positivas (MORAES, 2005). Aitken et al. (2006) mapearam QTL para o teor de sólidos solúveis totais (SST) e porcentagem de sacarose (Pol), associados à mesma região genômica em cana-de-açúcar. Estes dois caracteres foram avaliados durante dois anos e a correlação genética foi superior a 0,90. Zhang et al. (2010) mapearam, em cerejeira, QTL para o peso de fruto, formato e diâmetro de fruto em regiões genômicas coincidentes e estas apresentaram também correlações altas e positivas. Isso sugere

que a mesma região genômica é responsável pelo controle da expressão de vários caracteres, sendo um indício de pleiotropia. Interessante dizer que a técnica de mapeamento vem corroborar o que os estudos clássicos de genética quantitativa têm mostrado, tanto do ponto de vista da herança dos caracteres quanto da existência de correlação entre eles, informações estas importantes aos melhoristas.

Apesar do enorme potencial da tecnologia de marcadores moleculares para assistir programas de melhoramento, a sua aplicação, na prática, tem sido limitada pela falta de informações sobre a estabilidade dos QTL em diferentes ambientes, épocas distintas, colheitas ou anos, dependendo da cultura. Segundo Mesmmer et al. (2009) para um melhor entendimento sobre o mapeamento de locos quantitativos, é necessário estudá-los em diferentes ambientes e épocas, de modo a estimar o quanto da expressão do QTL é devida à interação com o ambiente e a sua estabilidade. Kenis et al. (2008) mapearam QTL para qualidade de frutos em macieira e sugerem como sendo de extrema importância a necessidade de se confirmar a estabilidade dos QTL mapeados em diferentes locais, anos e populações de mapeamento.

Os dados apresentados neste estudo são dados preliminares e inéditos. São necessárias outras avaliações em diferentes épocas e em um maior número de locais para que se avalie a estabilidade dos QTL mapeados e a possibilidade de se utilizar essas informações em processos de seleção de progênies para fins de melhoramento.

O número de QTL mapeado neste trabalho pode ser considerado bastante condizente com o esperado para caracteres quantitativos. Porém, é necessário o desenvolvimento de marcadores moleculares mais informativos para uma melhor saturação do mapa genético existente. Marcadores funcionais também são desejáveis. Com isso, as estimativas de máxima verossimilhança para a construção do mapa e para o mapeamento dos QTL podem ser mais bem inferidas e os resultados mais precisos.

5 CONCLUSÕES

A população segregante (F_1) de maracujá-doce proveniente do cruzamento entre os acessos SV3 e 2(12) apresenta ampla variabilidade genética que pode ser explorada visando à seleção dos melhores clones.

O novo mapa de ligação integrado de maracujá-doce permitiu o mapeamento de diversos QTL relacionados à produção e qualidade de frutos. Este mapa é mais saturado, possui marcas funcionais (5) do tipo RGA, e pode subsidiar programas de melhoramento, envolvendo a seleção assistida.

Os RGA aqui mapeados se distribuem nas pontas dos grupos de ligação, o que está de acordo com os dados genômicos de plantas, indicando serem as regiões subteloméricas as mais ricas em genes.

As marcas RGA aqui sequenciadas apresentam similaridade a genes de resistência de outras espécies, portanto, agregam informação para o mapeamento de locos envolvidos na resposta a patógenos, podendo orientar estratégias para a obtenção de genótipos resistentes a doenças.

Existe a necessidade de se desenvolver um maior número de marcadores funcionais e codominantes visando à melhoria das estimativas para o estabelecimento dos grupos de ligação e o ordenamento das marcas. Consequentemente, o mapeamento de QTL será mais preciso. Isso permitirá o entendimento da arquitetura genética dos caracteres de importância agronômica, bem como a comparação dos mapas de maracujá-doce e amarelo.

REFERÊNCIAS

AITKEN, K.S.; HERMANN,S.; KARNO, K.; BONNETT, G.D.; MCINTYRE, L.C.; JACKSON, P.A. Genetic control of yield related stalk traits in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics,** Berlin, v. 117, n. 7, p. 1191-1203, 2008.

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

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

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

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

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

CEASA MINAS. Disponível em: < http://www.ceasaminas.com.br/>. Acesso em: 27 nov., 2010.

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

COLLARD, B.C.Y.; MACKILL, D.J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 363, p. 557-572, 2008.

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

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.

DAMATO JR, E.R.; LEONEL, S.; PEDROSO, C.J. Adubação orgânica na produção e qualidade de frutos de maracujá-doce. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, p. 188-190, 2005.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; KICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter,** Athens, v. 1, p. 19 – 20, 1983.

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

EDWARD, K.J.; POOLE, R.L.; BARKER, G.L. SNP discovery in plants. In: HENRY, R.J. (Ed.). **Plant genotyping II**: SNP technology. Wallingford: CABI Publ., 2008. chap. 1, p. 1-29.

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

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Maracujá. In: _____. **Agrianual 2007**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo: Argos Comunicação, 2007. p. 387-394.

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

FUKUOKA, S.; INOUE, T.; MIYAO, A.; MONNA, L. ZHONG, H.S.; SASAKI, T.; MINOBE, Y. Mapping of sequence-tagged sites in rice by single strand conformation polymorphism. **DNA Research**, Oxford, v. 1, p. 271-277, 1994.

GALEANO, C.H.; FERNÁNDEZ, A.C.; GÓMEZ, M.; BLAIR, M.W. Single strand conformation polymorphism based SNP and Indel markers for genetic mapping and synteny analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genomics**, London, v. 10, n. 629, p. 1- 14, 2009.

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.

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

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

GEFFROY, V.; SICARD, D.; DE OLIVEIRA, J.C.; SEVIGNAC, M.; COHEN, S.; GEPTS, P.; NEEMA, C.; LANGIN, T.; DRON, M. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum.* **Molecular Plant-Microbe Interaction,** Saint Paul, v. 12, p. 774 – 784, 1999.

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

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

HANAI, L.R.; SANTINI, L.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; GEPTS, P.; TSAI, S.M.; VIEIRA, M.L.C. Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 25, p. 25-45, 2010.

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

HU, J.; VICK, B.A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, Canada, v. 21, p. 289 – 294, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal.** Disponível em: <http://sidra.ibge.gov.br/2010>. Acesso em: 12 jan. 2011.

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

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

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

JONES, N.; OUGHAM, H.; THOMAS, H.; PAŠAKINSKIEN_, I. Markers and mapping revisited: finding your gene. **New Phytologist**, Lancaster, v. 183, p. 935-966, 2009.

JUNQUEIRA, N.T.V.; ANSELMO, R.M.; PINTO, A.C.Q.; RAMOS, V.H.V.; PEREIRA, A.V.; NASCIMENTO, A.C. Severidade da antracnose e perda de matéria fresca de frutos de dez procedências de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Dryander) em dois ambientes de armazenamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n.1; p.71-73, 2003.

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

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

KAVATI, R.; PIZA Jr., C.T. **Cultura do maracujá-doce**. Campinas: CATI, 2002. (CATI. Boletim Técnico, 244).

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

KILLIP, E.P. **The American species of Passifloraceae**. Botanical Series. n. 19. 1938. 720 p.

KOMAR, A.A. (Ed.). **Single nucleotide polymorphisms**: methods and protocols. 2nd ed. New York: Humana Press, 2009.

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

LANAUD, C.; RISTERUCCI, A.M.; PIERETTI, I.; N'GORAN, J.A.K.; FARGEAS, D. Characterisation and genetic mapping of resistance and defense gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Molecular Breeding,** Dordrecht, v. 13, p. 211 – 227, 2004.

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

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

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

LEISTER, D.; BALLVORA, A.; SALAMINI, F.; GEBHARDT, C. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. **Nature Genetics,** New York, v. 14, p. 421 – 429, 1996.

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**, Berlin, v. 100, p. 127-138, 2000.

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.

LIMA, A.A.; CUNHA, M.A.P. (Org.). **Maracujá**: produção e qualidade na passicultura. Cruz das Almas: Empraba Mandioca e Fruticultura, 2004.

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

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

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

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

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

MacDOUGAL, J.M.; FEUILLET, C. Systematics. In: ULMER, T.; MacDOUGAL, J.M. (Ed.). **Passiflora:** passionflowers of the world. Oregon: Timber Press, 2004. chap. 2, p. 27-31.

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

MANICA, I.; OLIVEIRA Jr., M.E. de. Maracujá no Brasil. In: MANICA, I.; BRANCHER, A.; SANZONOWICZ, C.; ICUMA, I.M.; AGUIAR, J.L.P.; AZEVEDO, J.A.; VASCONCELLOS, M.A. S.; JUNQUEIRA, N.T.V. **Maracujá-doce:** tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2005. cap. 1, p. 11-26.

MARGARIDO, G.R.A.; SOUZA, A.P.; GARCIA, A.A.F. One Map: software for genetic mapping in outcrossing species. **Hereditas,** Lund v. 144, p. 78-79, 2007.

MELETTI, L.M.M. Comportamento de híbridos e seleções de maracujazeiro (*Passifloraceae*) In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6. 2003, Campos dos Goytacazes, **Palestras…** Campos do Goytacazes: Cluster Informática, 2003. 1 CD-ROM.

MELETTI, L.M.M.; MAIA, M.L. **Maracujá:** produção e Comercialização**.** Campinas: Instituto Agronômico, 1999. 62 p. (Boletim Técnico, 181).

MESSMER, R.; FRACHEBOUD, Y.; BANZIGER, M.; VARGAS, M.; STAMP, P.; RIBAUT, J-M. Drought stress and tropical maize: QTL-by-environment interactions and stability of QTL across environments for yield components and secondary traits. **Theoretical and Applied Genetics,** Berlin, v. 119, p. 913-930, 2009.

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

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

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

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

NAIK S.; HAMPSON C.; GASIC K.; BAKKEREN G.; KORBAN S.S. Development and linkage mapping of E-STS and RGA markers for functional gene homologues in apple. **Genome**, Ottawa, v. 49, p. 959–968, 2006.

NASU, S.; SUZUKI, J.; OHTA, R.; HASEGAWA, K.; YUI, R.; KITAZAWA, N.; MONNA, L.; MINOBE, Y. Search for and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in rice (Oryza sativa, Oryza rufipogon) and establishment of SNP markers. **DNA Research**, Oxford, v. 9, p. 163–171, 2002.

NOGUEIRA FILHO, G.C.; RONCATTO, G.; RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J.C. Avanços em propagação vegetativa do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., Campos dos Goytacazes, 2003. **Palestras**... Campos dos Goytacazes: Cluster Informática, 2003. 1 CD-ROM.

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

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

OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, F.R. Variações observadas em frutos de *Passiflora alata* Ait. **Proceedings of the Tropical Region American Society for Horticultural Science**, Campinas, v. 25, p. 343-345, 1982.

PAULA, M.S.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S.; PEIXOTO, J.R. Caracterização genética de espécies de *Passiflora* por marcadores moleculares análogos a genes de resistência. **Revista Brasileira de Fruticultura,** Jaboticabal, v. 32, p. 222 – 229, 2010.

PENHA, H.A. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites em *Passiflora alata* Curtis**. 2008. 93 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

PEREIRA, G.S. **Desenvolvimento de marcadores SSR, M-AFLP e SNP visando à integração de mapas genético-moleculares de *Passiflora alata* Curtis.** 2010. 154 p. Dissertação (Mestrado em enética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PFLIEGER, S.; PALLOIX, A.; CARANTA, C.; BLATTES, A.; LEFEBVRE, V. Defense response genes co-localize with quantitative disease resistance *loci* in pepper. **Theoretical and Applied Genetics,** Berlin, v. 103, p. 920 – 929, 2001.

PHILIPP, U.; WEHLING, P.; WRICKE, G. A linkage map of rye. **Theoretical and Applied Genetics,** Berlin, v. 88, p. 243-238. 1994.

PIPERIDIS, N.; JACKSON, P.A.; D‟HONT, A.; BESSE, P.; HOARAU, J-Y ; COURTOIS, B.; AITKEN, K.S.; MCINTYRE, C.N. Comparative genetics in sugarcane enables structured map enhancement and validation of marker-trait associations. **Molecular Breeding,** Dordrecht, v. 21, n. 2, p. 233-247, 2008.

PUGH, T.; FOUET, O.; RISTERUCCI, A.M.; BROTTIER, P.; ABOULADZE, M.; DELETREZ, C.; COURTOIS, B.; CLEMENT, D.; LARMANDE, P.; N'GORAN, J.A.K.; LANAUD, C. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108, p. 1151-1161, 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2010. Disponível em: http://www.rproject.org>. Acesso em: 12 jan. 2011.

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

RITTER, K.B.; JORDAN, D.R.; CHAPMAN, S.C.; GODWIN, I.D.; MACE, E.S.; McINTYRE, C.L. Identification of QTL for sugar-related traits in a sweet x grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) recombinant inbred population. **Molecular Breeding**, Dordrecht v. 22, p. 367-384, 2008.

ROJAS-BARROS, P.; JAN, C.C; HU, J. Mapping of a recessive branching gene in RHA 271 using molecular markers. **Sunflower Research Forum**, January 2005, Fargo, ND. Disponível em: www.sunflowernsa.com/research/researchworkshop/documents/Rojas_MappingGene_05.pdf; Acesso em: 11 nov., 2010.

SAKAMOTO, Y.; ISHIGURO, M.; KITAGAWA, G. **Akaike information criterion statistics**. Tokyo: KTK Scientific Publishers, 1986, 290 p.

SALOMÃO, T. A.; ANDRADE, V. M. M. Botânica. In: RUGGIERO, C. **Maracujá**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p.20-39

SAVAZAKI, E.T. A cultura do maracujá-doce *(Passiflora alata* Dryand) no Estado de São Paulo (compact disc) In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., 2003, Campos dos Goytacazes. **Resumos...** Campos do Goytacazes: Cluster Informática, 2003. Palestra. 1 CD-ROM.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromossoma**, Berlin, v. 109, p. 365-371, 2000.

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

SEMAGN, K.; BJØRNSTAD, Å.; NDJIONDJOP, M.N. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 25, p. 2569 - 2587, 2006.

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

STRAND, M.; PROLLA, T.A.; LISKAY, R.M.; PETES, T.D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, London, v. 365, p. 274-276, 1993.

SUASSUNA, T.M.F.; BRUCKNER, C.H.; CARVALHO, C.R.; BORÉM, A. Selfincompatibility in passionfruit: evidence of gametophytic-sporophytic control. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, p. 298-30, 2003.

SUGANUMA, E.; CIAMPI, A.Y. **Análise genética populacional de jatobá (*Hymenaea* ssp Leguminosaea) utilizando microsatélites.** Disponível em: www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters;03/03pdf/03-007.pdf. Acesso em: 18 dez. 2010.

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

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

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

ULMER, T.; MaCDOUGAL, J.M. **Passiflora:** passionflowers of the world. Cambridge: Timber Press, 2004. 430p.

VALLAD, G.; RIVKIN, M.; VALLEJOS, C.; MCCLEAN, P. Cloning and homology modelling of a Pto-like protein kinase family of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 103, p. 1046 – 1058, 2001.

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

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

VAN DER LINDEN, C.G.; WOUTERS, D.C.A.E.; MIHALKA, V.; KOCHIEVA, E.Z.; SMULDERS, M.J.M.; VOSMAN, B.; Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. **Theoretical and Applied Genetics,** Berlin, v. 109, p. 384 – 393, 2004.

VOORRIPS, R.E. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **Journal of Heredity**, Washington, v. 93, p. 77-78, 2002.

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

WANG, S.; BASTEN, C.J.; ZENG, Z.B. **Windows QTL Cartographer**: Version 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, North Caroline: Raleigh, 2007.
WELLER, J.L. Maximum likehood techniques for the mapping and analysis of quantitative trait loci with the aid of genetic markers. **Biometrics**, Washington, v. 42, p. 627-640, 1986.

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

WU, R. L.; CHANG-XING, M. Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species . **Theoretical Population Biology,** New York, v. 61, p. 349-363. 2002.

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

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

ZHANG, G.; SEBOLT, A.M.; SOORIYAPATHIRANA, S.S.; WANG, D.; BINK, M. CAM.; OLMESTEAD, J.W.; IEZZONI, A.F. Fruit size QTL analysis of an F1 population derived from a cross between a domesticated sweet cherry cultivar and a wild forest sweet cherry. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 6, p. 25-36, 2010.