

MAPAS DE LIGAÇÃO DE AFLP EM MARACUJÁ AMARELO E MAPEAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA A *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*

Ricardo Lopes¹, Maria Teresa G. Lopes², Frederico P. Matta³, Michel C. Moraes³, Luiz Eduardo A. Camargo⁴, Maria Lucia Carneiro Vieira⁵

Palavras chave: mapas genéticos, marcadores moleculares, *Passiflora*, resistência genética.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá-amarelo, *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., sendo esta espécie uma das principais fruteiras cultivadas no país. O melhoramento genético da espécie é incipiente e observa-se baixa produtividade dos pomares. A falta de variedades que associem alta produtividade, qualidade e homogeneidade dos frutos e tolerância ou resistência genética às principais doenças da cultura tem sido limitante para elevar a qualidade e a produtividade dos pomares brasileiros (Meletti et al., 2000). Entre as principais doenças da parte aérea destacam-se: virose causada pelo vírus do endurecimento do fruto (PWV) e a bacteriose causada por *X. campestris* pv. *passiflorae*. As variedades comerciais são suscetíveis e o desenvolvimento de variedades resistentes é a alternativa mais promissora para seu controle.

Marcadores AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) têm sido usados para construir mapas genéticos de alta cobertura genômica para diversas espécies. Estes mapas são úteis, principalmente, para o mapeamento de locos que controlam características quantitativas (QTLs), e têm contribuído nos estudos de herança desses caracteres, criando novas perspectivas para aperfeiçoar as estratégias de melhoramento, através da seleção assistida por marcadores (MAS).

O objetivo desse trabalho foi construir mapas de ligação usando marcadores AFLP para os acessos de maracujá-amarelo oriundos da coleção de germplasma de *Passiflora* do Instituto Agrônomo do Paraná, i.é, IAPAR-06 e IAPAR-123, e identificar genes de resistência (QRLs) à bacteriose do maracujazeiro na população filial obtida do cruzamento destes acessos.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma população de 117 indivíduos F₁, obtidos do cruzamento entre os acessos IAPAR-06 (suscetível à bacteriose) e IAPAR-123 (resistente à bacteriose), foi usada para construir mapas individuais destes acessos de acordo com a estratégia “duplo pseudocruzamento teste” (Grattapaglia & Sederoff, 1994).

¹ Pesquisador Embrapa Amazônia Ocidental. Doutorando em Genética e Melhoramento de Plantas – ESALQ/USP

² Prof.(a) UFAM/FCA. Doutoranda em Genética e Melhoramento de Plantas – ESALQ/USP.

³ Doutorando em Genética e Melhoramento de Plantas EALQ/USP.

⁴ Prof. Departamento de Fitopatologia, Entomologia e Zoologia Agrícola – ESALQ/USP.

⁵ Prof.(a) Departamento de Genética – ESALQ/USP. (Correspondência: mlcvieir@esalq.usp.br)

Apoio Financeiro **FAPESP**.

Foram analisados 255 locos AFLP monoparentais heterozigóticos, 115 do acesso IAPAR-06 e 140 do IAPAR-123. Os mapas foram construídos usando o programa MAPMAKER.

A população foi inoculada e avaliada em casa de vegetação quanto à resistência ao isolado 18b de *X. campestris* pv. *passiflorae* (Nakatani, 2001). Foram usadas 3 repetições de cada planta e inoculadas 3 folhas em cada repetição. A inoculação foi feita através de um corte de 3 cm no ápice da folha com uma tesoura previamente imersa em solução bacteriana. A resistência foi avaliada pela área foliar média lesionada.

A identificação de QRLs foi feita por regressão linear múltipla usando o procedimento *stepwise* para seleção de variáveis regressoras, usando o programa computacional SAS, e pelo mapeamento por intervalo composto, usando o programa *QTL Cartographer*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No mapa do acesso IAPAR-06 (Figura 1), 112 marcas foram agrupadas e 3 (2,6 %) segregaram independentemente. Dos marcadores agrupados, 72 (64,3 %) foram ordenados com LOD > 2,0 e 40 (35,7 %) foram alocados no mapa como acessórios. Os grupos de ligação foram constituídos de 3 a 36 marcadores e o número de marcas ordenadas por grupo de ligação variou de 3 a 16. O comprimento do menor grupo foi de 11,9 cM e o do maior de 208,9 cM. O comprimento total do mapa foi de 790,2 cM. Embora distribuídos em 9 grupos de ligação, nos 3 maiores grupos concentraram-se aproximadamente 63% das marcas, enquanto nos 3 menores agruparam-se apenas 10%. Isto demonstra que a distribuição dos marcadores AFLP não ocorreu de forma aleatória nos grupos de ligação.

No mapa do acesso IAPAR-123 (Figura 1), 138 marcas foram agrupadas e 2 (1,4 %) segregaram independentemente. Dos marcadores agrupados, 53 (38,4 %) foram ordenados com LOD > 2,0 e 85 (61,6 %) foram alocados no mapa como acessórios. Os grupos de ligação foram constituídos de 8 a 23 marcadores e o número de marcas ordenadas por grupo de ligação variou de 3 a 9. O comprimento do menor grupo foi de 8,4 cM e o do maior 124,7 cM. O comprimento total do mapa foi de 473,2 cM. Assim como no acesso IAPAR-06, a distribuição das marcas não foi aleatória entre os grupos de ligação. Nos grupos 1, 3 e 4 foram agrupados 45,0 % dos marcadores, enquanto nos grupos 5, 8 e 9 foram agrupados 20,0 %.

As marcas, em ambos acessos, foram distribuídas em 9 grupos de ligação sugerindo que tenham sido contemplados todos os cromossomos da espécie ($2n=18$). Embora o número de marcas agrupadas do acesso IAPAR-123 tenha sido quase 20 % superior ao do IAPAR-06, a proporção de acessórios no mapa deste acesso foi de 61,6 %. O número de acessórios foi superior ao de marcas ordenadas em 6 dos 9 grupos de ligação. Já no IAPAR-06, a proporção de acessórios foi de 35,7 %. Apenas no grupo 1 o número de acessórios foi superior ao de ordenados.

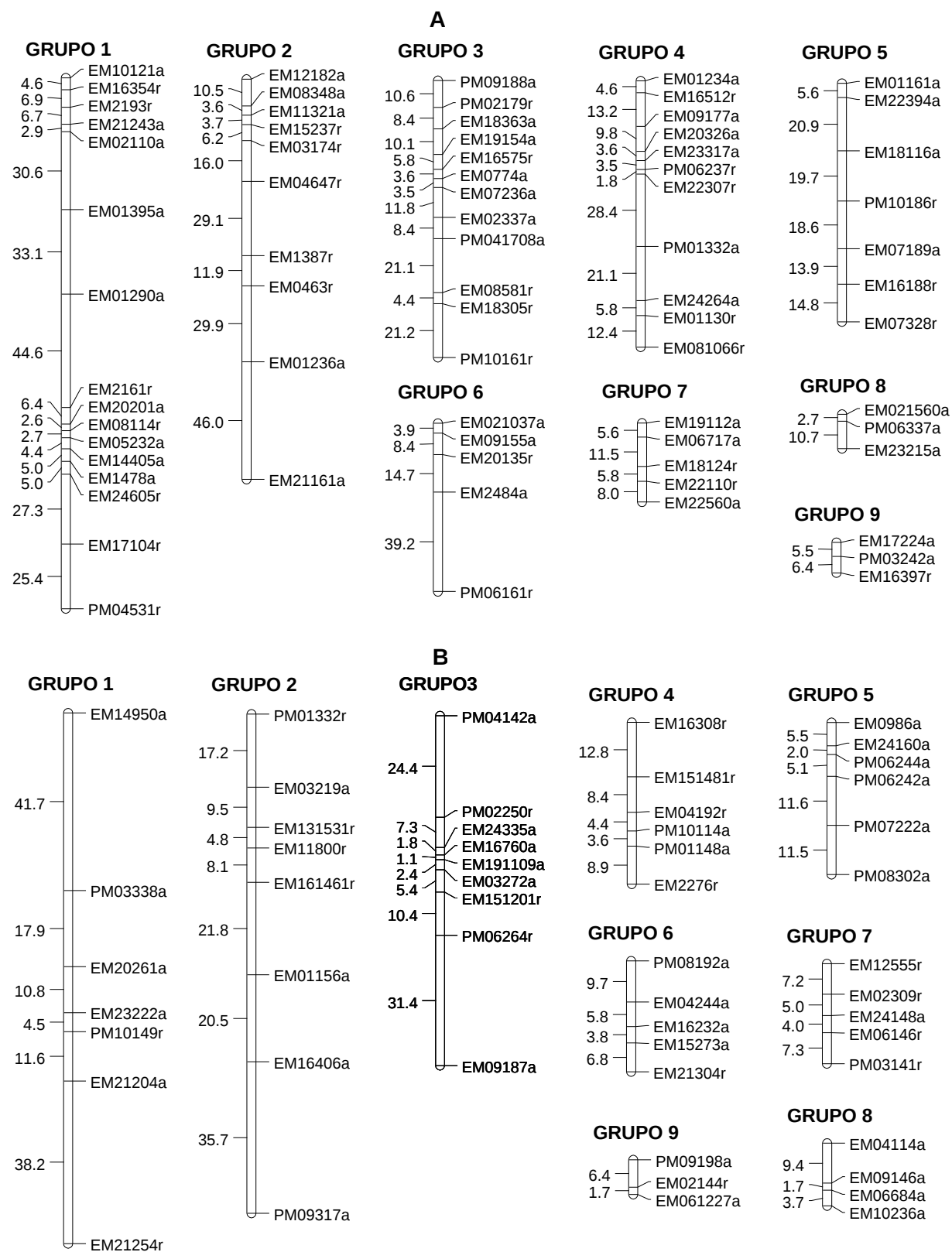


Figura 1 – Mapas de ligação AFLP dos acessos IAPAR-06 (A) e IAPAR-123 (B). Ao lado direito dos grupos estão os locos AFLP e ao lado esquerdo está a distância entre eles em cM (Haldane).

A distribuição dos marcadores também não foi aleatória dentro dos grupos de ligação em ambos acessos. A formação de *clusters* de marcas foi proporcionalmente maior no IAPAR-123, e isto influenciou no comprimento do mapa que corresponde à cerca de 60 % do comprimento do mapa do IAPAR-06. *Clustering* de marcadores AFLP, cromossomo-e-cultivar-específicos, foram observados em *Petunia* sendo estes agrupamentos associados a regiões onde há baixa frequência de recombinação (Strommer et al., 2002).

Os dados referentes à área foliar média lesionada dos 117 indivíduos foram divididos em 8 classes fenotípicas (Figura 2). A distribuição fenotípica da característica na população segregante indica que o controle genético da resistência é oligogênico.

Na análise da regressão linear múltipla os locos de ambos genitores foram usados em conjunto. Entraram no modelo de regressão os marcadores PM023558r ($P=0,0001$) e EM2378a ($P=0,0372$) (Tabela 1), ambos do acesso IAPAR-123, o qual apresentou o maior nível de resistência a *Xanthomonas* na avaliação fenotípica. O modelo composto por estas marcas explicou 21,3 % da variação da resistência na população segregante. O marcador PM023558r está ligado em repulsão ao alelo de resistência e explica sozinho 17,4 % da variação fenotípica da população segregante. Este marcador foi atribuído ao grupo de ligação 2. No entanto, o mesmo não foi ordenado com os demais marcadores no mapa e foi considerado como acessório, localizado a 8,1 cM do marcador EM161461r. O marcador EM2378a está ligado em associação ao alelo de resistência e explicou 3,9 % da variação fenotípica. Ele foi atribuído ao grupo de ligação 9, mas também foi colocado como acessório e está localizado a 5,7 cM do marcador PM09198a.

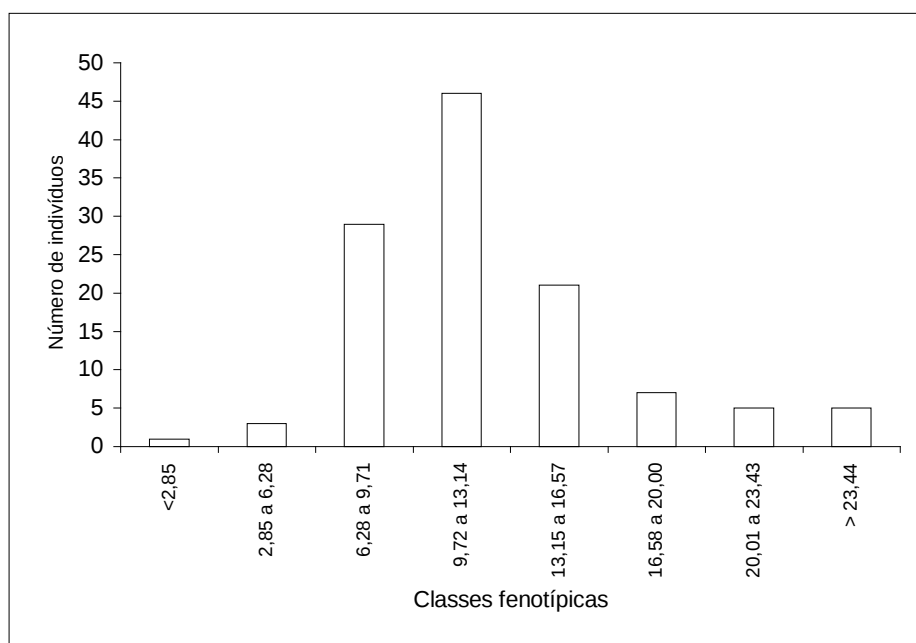


Figura 2 - Distribuição da variável área foliar média lesionada (cm^2) de 117 indivíduos da população segregante inoculados com o isolado 18b da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*.

Na análise de mapeamento por intervalo composto, o ponto de corte para declarar a presença de um QRL em determinado intervalo foi estabelecido (usando a técnica de baralhamento de dados com 1000 permutações e $\alpha = 0,05$) como LOD score 2,36. Apenas um QRL, explicando 15,8 % da variação fenotípica, foi identificado. Este QRL está localizado na posição 39,57 cM (LOD score = 4,41) no grupo de ligação 2, no intervalo entre os marcadores EM161461r e EM01156a (Figura 1). De acordo com a sua posição no grupo de ligação, este QRL corresponde ao identificado pela marca PM023558r na análise de regressão.

Tabela 1 - Resumo da análise de regressão múltipla para variável área foliar média lesionada (AFML) usando o processo *stepwise* para seleção de variáveis regressoras (marcadores).

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

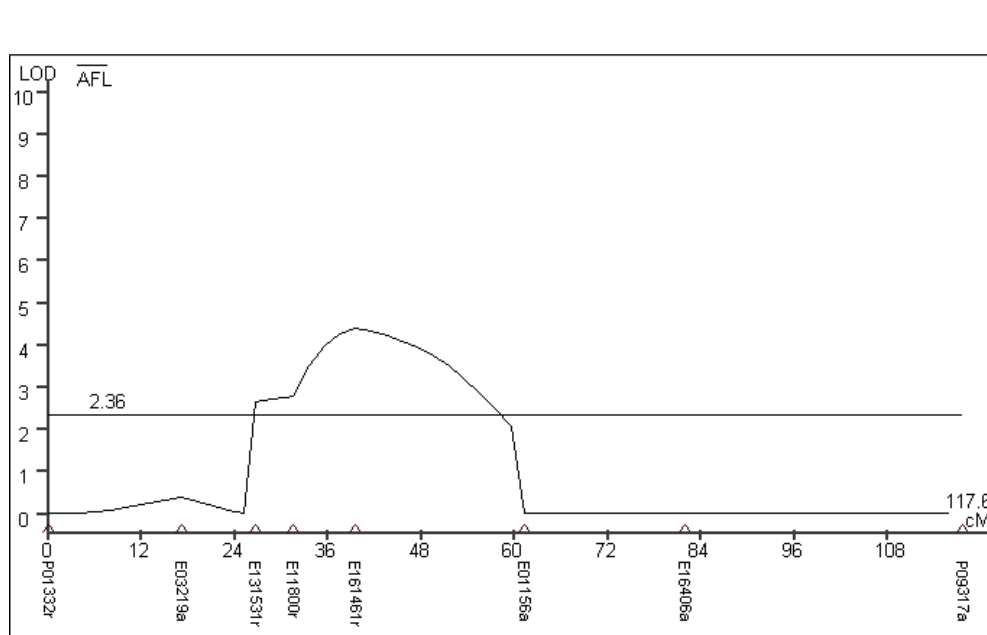


Figura 2. Mapeamento do QRL a *Xanthomonas campestris* pv. *passifloae* no cromossomo 4 do acesso IAPAR-123. No eixo vertical é apresentada a escala de LOD score. No eixo horizontal, a posição das marcas no grupo de ligação (cM).

Este é o primeiro estudo de mapeamento de locos associados ao controle de resistência a patógenos em *Passiflora*. Pretende-se aumentar o tamanho da população e com isto aumentar a resolução do mapa. Novos indivíduos serão analisados com os oligonucleotídeos usados na construção do mapa de RAPD destes acessos i.é., IAPAR-06 e IAPAR-123 (Carneiro et al., 2002), e

também com as combinações de iniciadores de AFLP. Por fim, será construído um único mapa usando ambos marcadores, RAPD e AFLP.

Essa população está sendo multiplicada e será inoculada com outros isolados da bactéria visando obter informação da efetividade e especificidade dos QRLs encontrados, bem como identificar outros QRLs. Também está sendo conduzido a campo um experimento para avaliação fenotípica de características do fruto e de produção visando identificar QTLs envolvidos no controle destas características.

Cabe ressaltar que as informações deste trabalho são inéditas para a espécie e deverão fornecer subsídios para trabalhos de melhoramento de maracujazeiro visando obter populações tolerantes a *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*.

CONCLUSÕES

1. O acesso IAPAR-123 possui genes de resistência à bacteriose, e poderá ser usado em programas de melhoramento visando ao desenvolvimento de variedades resistentes à enfermidade.
2. Marcadores AFLP não apresentam distribuição aleatória no genoma do maracujá e a formação de *clusters* demonstrou ser cromossomo-e-genótipo-específica.
3. Marcadores AFLP se prestam para construção de mapas genéticos e para identificar e mapear genes de interesse em maracujazeiro usando a estratégia duplo pseudocruzamento teste e marcadores dominantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARNEIRO, M.S.; CAMARGO, L.E.A.; COELHO, A. S. G.; VENCOVSKY, R.; LEITE JÚNIOR, R. P.; STENZEL, N. M. C.; VIEIRA, M. L. C. **RAPD-based genetic linkage maps of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.)**. Genome, v.45, p.670–678, 2002.

GRATTAPAGLIA, D, SEDEROFF, R. **Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers**. Genetics, 137: 1121-37, 1994.

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

NAKATANI, A.K. **Diversidade genética de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* e sensibilidade a produtos químicos**. Piracicaba, SP: ESALQ/USP, 2001. 61p. (Dissertação de mestrado).