

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA

MOLECULAR



IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES

LIGADOS À RESISTÊNCIA À FUSARIOSE DO

ABACAXIZEIRO

ANDRÉ MACHADO PORTUGAL

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Dezembro de 2005

P853

Portugal, André Machado.

Identificação de marcadores moleculares ligados à resistência à fusariose do abacaxizeiro / André Machado Portugal. – Ilhéus, Ba: UESC, 2005.

x, 43f. : il.

Orientador: Ronan Xavier Corrêa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui bibliografia.

1. Abacaxi. 2. Fitopatologia. I. Título.

CDD 634.774

ANDRÉ MACHADO PORTUGAL

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES LIGADOS À
RESISTÊNCIA À FUSARIOSE DO ABACAXIZEIRO

Dissertação apresentada a Universidade
Estadual de Santa Cruz, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre
em Genética e Biologia Molecular.

Aprovada: 22 de dezembro de 2005


Prof. Dr. Davi Theodoro Junghans
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical


Prof. PhD. Leandro Lopes Loguercio
UESC


Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa
UESC - Orientador

Aos meus amigos: Livia, Valmário,Sheila e Eudes,
sobretudo pelo amparo e carinho concedido,

OFEREÇO

Apesar das adversidades aqui encontradas,
encontrei força em minha avó, mãe e tia
(*in memoriam*) que não deixaram minhas
mãos vazias, portanto a elas,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, proteção e por ter permitido mais esta vitória.

À Universidade Estadual de Santa Cruz-UESC, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de realizar este curso.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, pela parceria e pelo apoio.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa, pelo incentivo, pela calma e paciência dedicados a mim neste trabalho, assim como pela sua orientação e seus ensinamentos.

À Prof^a. Dr^a. Fernanda Amato Gaiotto, pelo amparo muitas vezes concedido.

Ao Dr. Davi Theodoro Junghans, pela atenção e pelo fornecimento da população utilizada neste estudo.

À Prof^a. Dr^a. Mônica Rosa Bertão, pela compreensão no início do meu curso enquanto coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPG-GBM).

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Costa, pelo apoio dado a mim junto a coordenação do PPG-GBM.

Ao Prof. Dr. Leandro Lopes Loguércio, pelos primeiros ensinamentos de Genética e Biologia Molecular.

Aos colegas de mestrado, principalmente àqueles que se tornaram verdadeiros irmãos: Ademildes, Dahyana, Lívia, Márcia e Valéria.

A Jeiza Leal, Sônia, Dahyana, Maíza, Claudine e Joci Neuby, pelo apoio laboratorial.

Ao Valmário e à Sheila, em especial, pessoas que se tornaram fundamentais na minha vida. Obrigado pela amizade, pelo apoio, incentivo, aprendizado e suporte pessoal e emocional!

À família do Colégio Adventista, pelo carinho e pela compreensão.

À Michelle e ao Juninho, pelo carinho e pelas orações nessa etapa final.

A minha avó, mãe e filha, pelo carinho e amor; vocês são minha vida.

ÍNDICE

EXTRATO.....	vi
i	
ABSTRACT.....	i
x	
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Características da espécie	4
2.1.1. Aspectos gerais e importância sócio-econômica.....	4
2.1.2. Cultivares	6
2.1.3. A doença fusariose.....	9
2.2. Marcadores moleculares (RAPD) e o Melhoramento Genético.....	10
2.3. Estudos de herança genética	13
2.4. Identificação de marcadores associados a caracteres de interesse	14
2.5. Mapeamento genético.....	17
2.5.1. Mapeamento de Genes de Resistência	20
3. METODOLOGIA.....	22
3.1. Material vegetal	22
3.2. Inoculação e avaliação da resistência à fusariose.....	22
3.3. Extração de DNA genômico de <i>A. comosus</i>	23
3.4. Amplificação e caracterização genética dos locos RAPD.....	24
3.5. Análise de segregação e ligação genética.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Caracterização da população	26
4.2. Extração do DNA genômico.....	26
4.3. Caracterização dos locos RAPD.....	26
4.4. Amplificação do DNA dos <i>Bulks</i>	27

4.5. Combinação de <i>primers</i> RAPD.....	29
4.6. Análise de segregação e ligação genética.....	31
5. CONCLUSÕES.....	34
6. PERSPECTIVAS.....	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

EXTRATO

PORTUGAL, André Machado, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, dezembro de 2005. **Identificação de Marcadores Moleculares ligados à Resistência à Fusariose do Abacaxizeiro**. Orientador: Ronan Xavier Corrêa. Co-orientadora: Fernanda Amato Gaiotto.

O abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) é uma frutífera originária da região sul do Brasil que apresenta paladar agradável e valor nutracêutico atribuído à presença de vitaminas e sais minerais. Mesmo em se tratando de uma cultura de grande demanda no mercado mundial de frutas e de alta rentabilidade, o abacaxi ainda não conseguiu um lugar de destaque no cenário agrícola brasileiro, principalmente em função da fusariose, doença causada pelo fungo *Fusarium subglutinans*, que pode causar perdas de 30 a 40% na produção da cultura. A obtenção de um mapa genético do abacaxizeiro por meio de marcadores moleculares permite identificar regiões genômicas responsáveis por características da planta e do fruto que sejam de interesse agrônomo. No presente trabalho objetivou-se mapear genes de resistência à fusariose em uma população intra-específica, por meio de marcadores moleculares visando identificar marcas moleculares para auxiliar programas de melhoramento genético do abacaxizeiro. A população segregante foi constituída por 179 indivíduos F₁RC₁, dos quais 119 são provenientes do retrocruzamento de (Perolera x Smooth Cayenne) x Smooth Cayenne e 60 do cruzamento recíproco [Smooth Cayenne x (Perolera x Smooth Cayenne)], em que o híbrido é portador do alelo de resistência Rfs₁. Cada indivíduo dessa população foi clonado e inoculado com uma suspensão de esporos obtida de cultura monospórica de *F. subglutinans* f. sp. *ananas*, ajustada para 1 x 10⁵ conídios/mL, para avaliar a resistência. Por não

se saber no início o tipo de herança da resistência e para acessar tanto as bandas com segregação típica RC como F₂, cinco indivíduos da progênie foram genotipados com 60 *primers* RAPD, dos quais 20 amplificaram pelo menos uma banda polimórfica. Os dados de resistência a fusariose foram obtidos para 69 indivíduos e os demais indivíduos se encontram em fase de inoculações para posterior avaliação. A segregação de metade das plantas como resistentes e a outra metade como suscetíveis, após a inoculação com a cultura monospórica, confirmou a herança monogênica e dominante de Rfs₁; também encontrada pelo teste χ^2 a 5% de probabilidade. Após a confirmação da herança da resistência, utilizou-se a estratégia de BSA (Análise de *Bulks* Segregantes) para identificar marcadores ligados ao gene de resistência à fusariose. Dois *bulks* foram construídos com amostras de DNA de folhas de plantas da população F₁ de retrocruzamento para resistência/suscetibilidade a fusariose, sendo que cada *bulk* (resistente e suscetível) continha DNA de seis plantas. Os *bulks* foram analisados com os 60 *primers* individuais utilizados no início do trabalho e mais 177 combinações de diferentes *primers*, tomados dois a dois. O uso destes *primers* aos pares teve como objetivo maximizar o número de bandas amplificadas e, conseqüentemente, de aumentar o número de marcadores moleculares. Procedeu-se à reação RAPD dos cinco indivíduos aleatórios da progênie e dos *bulks* e foram identificados 12 marcadores, dos quais, após análise de co-segregação, 10 marcadores segregaram independentemente e dois formaram grupo de ligação. O *primer* OPA09, amplificou um fragmento de DNA com cerca de 300 pares de base (pb) ligado ao alelo Rfs₁. Na análise de co-segregação, verificou-se que esse marcador está ligado ao alelo de resistência a uma distância de 25,6 cM, e se constitui em marcador para a seleção indireta de plantas portadoras do alelo Rfs₁ em populações segregantes.

Palavras-chave: Abacaxi, Mapeamento Genético, RAPD e fusariose.

ABSTRACT

PORTUGAL, André Machado, M.Sc., State University of Santa Cruz, December, 2005. **Identification of a Molecular Marker linked to the Gene for Resistance to Fusariose in Pineapple.** Adviser: Ronan Xavier Corrêa. Co-adviser: Fernanda Amato Gaiotto.

The pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*) is a fruit-plant native from the south of Brazil that presents a pleasant palate and a nutritional value attributed to the presence of vitamins and mineral salts. Even being a crop of high profitability and of a great demand in the fruits market worldwide, the pineapple has not yet gotten a prominent place in the Brazilian agricultural scenario, mainly due to the 'fusariose' disease. This is caused by the fungus *Fusarium subglutinans* that can cause damages of about 30 to 40% in the pineapple production. The construction of a pineapple genetic map by means of molecular markers may help identifying genomic regions responsible for plant or fruit characteristics. In this work, a pineapple's resistance gene to fusariose was mapped in an intra-specific segregating population by molecular markers, to aid breeding programs of this crop. The segregating population was constituted by 179 individuals F1BC1, such that 119 resulted from the backcross (Perolera x Smooth Cayenne) x Smooth Cayenne and 60 were originated from the reciprocal backcross [Smooth Cayenne x (Perolera x Smooth Cayenne)], whose hybrids contained the *Rfs1* resistance allele. Each plant was duplicated by cloning and one member of the pair was inoculated with spore suspension of *F. subglutinans* f. sp. *ananas* (1×10^5 spores.mL⁻¹) to evaluate the resistance. Initially, we did not know the type of inheritance of this resistance. Additionally, it was desirable to obtain bands with typical BC or F2 segregation. Thus, five individuals were genotyped with 60 RAPD primers, among which 20 amplified at least one polymorphic band. The resistance data was obtained from 69 individuals. The other individuals remained

in the field for future inoculations and resistance evaluation. The segregation of half of the plants as resistant and the other half as susceptible, after the inoculation with the pathogen, confirmed the monogenic dominant inheritance for the *Rfs1* gene (Qui-square test at 5% significance level). After confirmation of the type of inheritance for the resistance characteristic, the bulk segregant analysis (BSA) was used to identify markers linked to this fusariose's resistance gene. Two bulks were built with DNA samples from leaves of plants of the backcrossed population, such that each bulk (resistant and susceptible) contained DNA from six plants. Bulks were analyzed by the 60 individual primers defined in the beginning of the work, as well as 177 pairwise combinations of different primers. This strategy improved the number of amplified bands and, consequently, increased the number of useful markers. Five random individuals were taken from the segregating population, with two DNA bulks being amplified by the RAPD primers. Twelve RAPD markers were identified, such that 10 segregated independently and two formed a linkage group. The primer OPA09 amplified a fragment of DNA with ~300 base pairs (bp) linked to the *Rfs1* allele. In the co-segregation analysis it was verified that this marker is linked to the resistance gene at 25.6 cM, and it constituted a possible marker for the indirect selection of pineapple plants containing the *Rfs1* resistance allele to fusariose.

Key-Words: Pineapple, Genetic mapping, RAPD, fusariose.

1. INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro (*A. comosus* var. *comosus*) é uma frutífera originária da região sul do Brasil que apresenta paladar agradável além de valor nutracêutico atribuído a presença de vitaminas e sais minerais. A Bahia é o quarto maior produtor do país, com uma produção de 116.557 mil frutos, atrás de Minas Gerais (315.682 mil frutos), Paraíba (274.208 mil frutos) e Pará (212.511 mil frutos). Estes estados em conjunto representam 64% da produção nacional (FAO, 2000; IBGE, 2002).

Apesar da grande demanda no mercado mundial de frutas, o abacaxi ainda não conseguiu destacar-se no cenário agrícola brasileiro, apresentando baixo consumo "per capita" e pequena contribuição para a renda agrícola (CUNHA et al., 1994).

O abacaxizeiro é uma planta pouco conhecida sob o ponto de vista do melhoramento genético, sendo o primeiro trabalho desenvolvido na Flórida em 1905, visando a obtenção de cultivares mais adaptadas às condições locais e melhoria da qualidade do fruto para industrialização. Os programas de melhoramento genético do abacaxi visam, em geral, obter cultivares produtivos, adaptados às condições climáticas locais e resistentes às mais importantes pragas e doenças (MANICA, 1999).

Dentre os problemas da cultura que podem ser solucionados pelo melhoramento e ações a serem desenvolvidas pode-se enumerar: Fusariose (*Fusarium subglutinans*) – desenvolver cultivares resistentes; murcha associada à cochonilha (*Dysmicoccus brevipes*) – Identificar fontes de resistência e desenvolver cultivares resistentes; floração natural – Identificar genótipos tolerantes e; utilização de poucas cultivares – promover a diversificação de

cultivares. Considerando que o uso de marcadores moleculares permite monitorar essas ações, um grande esforço vem sendo feito no sentido de se obter um mapa de ligação para o abacaxi, com base em diferentes tipos de marcadores moleculares (MANICA, 1999).

Com a disponibilidade de um grande número de marcadores genético-moleculares, surgiu um novo paradigma de geração de mapas genéticos específicos para populações de interesse, tornando o mapeamento genético mais útil aos programas de melhoramento. Segundo Grattapaglia e Sederoff (1994), esse paradigma consiste em desenvolver mapas genéticos específicos para os genótipos elite em programas de melhoramento.

O principal objetivo dos programas de melhoramento genético de abacaxi é desenvolver uma cultivar verdadeiramente nova, capaz de superar a Smooth Cayenne (variedade mais plantada). A estratégia de melhoramento adotado por diferentes grupos de pesquisa no mundo consiste em promover a hibridação entre esta cultivar e cultivares locais, selecionando plantas híbridas (F_1) que apresentem características superiores. A utilização de germoplasma geneticamente diverso pelos programas é limitada por problemas relacionados ao arraste de genes que codificam características não-desejáveis associados a locos de interesse (*linkage drag*) e longo tempo de recuperação de linhagens avançadas. Estes problemas podem potencialmente ser minimizados, pelo uso combinado de informação de mapa genético das características de interesse utilizando estratégias de monitoramento de retrocruzamentos com marcadores moleculares (CABRAL et al., 1997).

O desenvolvimento de cultivares de abacaxi resistentes a fusariose possibilitará o incremento de 30 a 40% da produtividade da cultura no Brasil, visto que não ocorrerão perdas por este fator. Além disso, a renda líquida do produtor será aumentada pela redução dos custos de produção, pois serão eliminadas as aplicações de fungicidas necessárias ao controle da doença.

Neste sentido, o mapeamento da resistência genética a fusariose se faz necessário, tanto para melhor entender suas bases genéticas, como para desenvolver marcadores moleculares que possam ser usados em programas de melhoramento. Entretanto, trabalhos objetivando detectar genes de resistência à fusariose no abacaxizeiro são escassos na literatura.

O primeiro relato de variação no comportamento de genótipos de abacaxi referente à incidência da fusariose baseou-se em observações em frutos, sob condições naturais de inoculação (GIACOMELLI et al, 1969). Apesar de eficiente, a avaliação a campo pode ser afetada pelas condições ambientais e pelo potencial de inóculo na área, além de demandar um tempo relativamente longo, correspondendo ao ciclo da cultura, uma vez que a avaliação é realizada no momento da colheita. Posteriormente, Souto e Matos (1978) usando a técnica de inoculação da base da muda tipo filhote desenvolvida por Matos (1978), foram capazes de identificar resistência em genótipos de abacaxi num período três meses após a inoculação.

Diante do exposto, o objetivo geral foi identificar regiões genômicas associadas a características de interesse do abacaxizeiro, a partir do mapeamento genético desta fruteira tropical. Os objetivos específicos foram: 1) estudar a herança envolvida na resistência do abacaxi à fusariose e 2) identificar marcadores moleculares ligados a regiões cromossômicas associadas a resistência à fusariose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características da espécie

2.1.1. Aspectos gerais e importância sócio-econômica

O abacaxi ou ananás, nomes utilizados tanto para a fruta como para a planta, pertence à família Bromeliaceae e gênero *Ananas* Mill. Esse gênero é vastamente distribuído nas regiões tropicais por intermédio da espécie *Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merr; a qual abrange todas as cultivares plantadas de abacaxi. O fruto é normalmente cilíndrico ou ligeiramente cônico, constituído por 100 a 200 pequenas bagas ou frutinhos fundidos entre si sobre o eixo central ou coração. A polpa apresenta cor branca, amarela ou laranja-avermelhada, sendo o peso médio dos frutos de um quilo, dos quais 25% é representado pela coroa (GIACOMELLI; PY, 1981).

A composição química do abacaxi varia muito de acordo com a época em que é produzido. De modo geral, a maior produção, que ocorre no período do verão, gera frutas com maior teor de açúcares e menor acidez. O abacaxi destaca-se pelo valor energético, em função à sua alta composição de açúcares, e valor nutritivo pela presença de sais minerais (cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cobre e iodo) e de vitaminas (C, A, B₁, B₂ e Niacina). No entanto, apresenta teor proteico e de gordura inferiores a 0,5% (FRANCO, 1989).

O abacaxizeiro é cultivado na Ásia, na África e nas Américas (Norte, Central e Sul). A Tailândia, as Filipinas, o Brasil, a China e a Índia destacam-se como os principais países produtores (IBGE, 2003).

O Brasil, em 2002, ocupou a terceira posição como produtor mundial de abacaxi, produzindo 2,8 milhões de toneladas em 60.000 hectares plantados. Em termos nacionais, o Estado de Minas Gerais é o principal produtor (740.000 ton), seguido pela Paraíba (540.000 ton) e pelo Pará (440.000 ton) (IBGE, 2003).

Estima-se que a área de plantio de abacaxi seja de 5.000 hectares na região do Triângulo Mineiro, com a média de 2.500 a 3.000 hectares/ ano e produção de 30 a 35 toneladas de fruta/hectare. No período de abril a setembro, as indústrias da região mineira e da região sul processam cerca de 60% da produção nacional de abacaxi (40% utilizados para o consumo *in natura*). No entanto, no período de outubro a março, o quadro se inverte com o consumo do abacaxi “*in natura*” chegando a quase 60% (ARANTES, 2001).

O fruto do abacaxi apresenta alto conteúdo em bromelina, que auxilia o processo de digestão. Trata-se de mistura de enzimas proteolíticas que em meio ácido, alcalino ou neutro, transforma as matérias albuminóides em proteoses ou peptona. A bromelina pode ser isolada do suco da fruta ou do talo da planta, ocorrendo em maior concentração no cilindro central do abacaxi (MEDINA, 1987). Outra importância desta proteína está na farmacologia, onde foi registrada sua interferência no crescimento de células malignas, na inibição de coágulos, na atividade fibrinolítica e na ação antiinflamatória (TAUSSIG; BATKIN, 1998).

A planta consiste em motivo ornamental para a pintura, arquitetura e escultura, sendo usada sobre pilares de alvenaria na entrada de casas, vilas e jardins. O caule é matéria-prima para a indústria de alimentos e para a obtenção de álcool etílico e gomas. O restante do abacaxizeiro pode ser usado na alimentação animal, como material fresco ou ensilado. Já o seu fruto é consumido ao natural, ou na forma de sorvetes, doces, picolés, refrescos e sucos caseiros. Quando industrializado, o fruto pode apresentar-se como polpa, xarope, geléia, doces em calda ou suco engarrafado. Em regiões secas e quentes obtém-se vinho do fruto doce e fermentado, sendo o suco do fruto verde utilizado como vermífugo em alguns países (MEDINA, 1987).

O abacaxi serve como matéria-prima para vários produtos, como geléias e compotas (BORGES, 1989). Mesmo com baixo teor de pectina, o abacaxi é

adequado para a fabricação de geléias em decorrência do teor de ácido (SENAI, 1990). Entretanto, nenhum desses recebe tanto destaque como o suco, alvo de grande número de trabalhos publicados, inclusive na literatura internacional.

2.1.2. Cultivares

As cultivares Smooth Cayenne (Figura 1a) e Pérola (Figura 1b) são as mais produzidas no Brasil. A cultivar Smooth Cayenne apresenta porte semi-ereto, pedúnculo curto, folhas verde-escuro com 1 m de comprimento e espinhos somente nas extremidades apicais. O fruto é atraente, ligeiramente cilíndrico, pesa de 1,5 kg a 2,5 kg, apresenta casca de cor amarelo-alaranjada quando maduro, polpa amarela, rico em açúcares (13 a 19 °Brix) e de acidez maior do que as outras variedades. Essas características a tornam adequada para a industrialização e a exportação como fruta fresca. A coroa é relativamente pequena e a planta produz poucas mudas do tipo filhote. São altamente suscetíveis à cochonilha e suscetíveis a fusariose. Conhecida vulgarmente como abacaxi havaiano, é a variedade mais plantada no mundo, tanto em termos de área, quanto em faixa de latitude, sendo considerada a rainha das variedades de abacaxi, porque possui muitas características favoráveis. O predomínio do plantio de 'Smooth Cayenne', nos principais países produtores do mundo; o uso de poucas variedades para plantios comerciais e a substituição de variedades locais por Smooth Cayenne vêm provocando o desaparecimento de variedades de interesse local ou regional (MANICA, 1999).

A cultivar Pérola, planta de crescimento ereto, apresenta folhas com 65 cm de comprimento, com espinhos em toda sua extensão. Possui pedúnculo longo que produz muitos filhotes (5 a 15). O fruto tem forma cônica (indesejável para a indústria), com peso de 1,0 kg a 1,5 kg, possui coroa grande, sua polpa é branca, succulenta e de baixa acidez. Têm boas características organolépticas, sendo o mais apreciado para o consumo in natura, porém sendo menos adequado para a indústria, por causa da baixa acidez e do menor aproveitamento da polpa. Possuem certa tolerância a cochonilha e alta suscetibilidade a fusariose. Cultivada amplamente no Brasil, é também conhecida como Pernambuco ou Branco de Pernambuco.

A cultivar Boituva tem as margens das folhas armadas de espinhos, sendo destinada apenas para a comercialização "in natura" (VAILLANT et al., 2001). Outras cultivares também se destacam em algumas regiões do Brasil. A cultivar IAC Gomo-de-mel produz fruto com 1,0 kg de peso médio, casca de espessura média, polpa de coloração amarelo-ouro suculenta e de ótimo sabor. A cultivar Perolera, proveniente da Colômbia, é uma planta com folhas verde-escuras sem espinhos, adapta-se bem em altitudes elevadas. Produz fruto com peso médio de 1,78 kg, de forma cilíndrica, com casca de espessura fina e coloração externa e da polpa amarela. A cultivar Primavera, originária da Amazônia, produz fruto cilíndrico, com peso médio de 1,25 kg, polpa de coloração variando de branca a amarela e folhas longas, de cor verde-claro e sem espinhos (OLIVEIRA, 2001). Estas duas últimas cultivares se destacam pela resistência a fusariose.

O abacaxi Imperial, variedade híbrida lançada nacionalmente pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, em sua sede, em Cruz das Almas, tem como principal característica a resistência à fusariose, o maior problema fitossanitário da cultura no país, gerando perdas superiores a 80% da produção. A nova planta é resultado do cruzamento das variedades perolera e smooth cayenne, não tem espinhos nas folhas, produz frutos com polpa amarela, elevado teor de açúcares e excelente sabor nas análises sensoriais (CABRAL; MATOS, 2005).

As principais características desejadas em uma variedade de abacaxi são: crescimento rápido; folhas curtas, largas e sem espinhos; produção precoce de rebentão localizado na base da planta próxima ao solo; produção de filhotes situados a mais de dois centímetros da base do fruto; fruto de casca de cor amarelo-alaranjada, olhos planos, polpa de cor amarela e consistência firme mas não fibrosa, teor de açúcar elevado, acidez moderada; coroa média a pequena. Associadas a essas características, procuram-se ainda variedades que proporcionem altos rendimentos e que sejam resistentes e, ou tolerantes às principais pragas e doenças que ocorrem nos locais de plantio.

É difícil encontrar uma variedade de abacaxi que reúna todas essas características. Assim, recomenda-se a escolha de variedades para usos específicos, considerando-se o destino da produção e a adaptação aos locais de plantio. A diversificação de variedades é importante para a sustentabilidade da cultura.



Figura 1: Principais cultivares de abacaxi no Brasil. A) 'Smooth cayenne'; B) 'Pérola'. (Foto Davi T. Junghans).



Figura 2: Sintomas da fusariose em muda inoculada e inflorescência do abacaxizeiro. (Foto Davi T. Junghans).



Figura 3: A) sementes em leito de espuma sintética; B) plântulas em canteiros de isopor; C) plântulas com 15 cm ou mais de comprimento. (Foto Davi T. Junghans).

No Brasil, existem poucos programas de melhoramento genético do abacaxi. Os primeiros trabalhos foram dirigidos para taxonomia e descrição de cultivares. Posteriormente, foram desenvolvidos trabalhos de avaliação de germoplasma e competição de cultivares (CABRAL et al., 1985; CABRAL et al., 1988). Com relação a programas de melhoramento, Cabral et al. (1993) obtiveram e selecionaram híbridos de abacaxi resistentes à fusariose.

O programa de melhoramento desenvolvido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical objetiva desenvolver cultivares resistentes à fusariose e com frutos de boa qualidade. Nesse programa já foram produzidos 28.826 híbridos e selecionados 26 genótipos. O híbrido, 'Perolera' x 'Smooth Cayenne-52' foi utilizado neste trabalho por ser considerado promissor para ser recomendado como nova variedade, em função de apresentar bom desempenho para os caracteres prioritários do critério de seleção nas avaliações que foram realizadas e resistência a fusariose.

2.1.3. A doença fusariose

Dentre todas as doenças do abacaxizeiro no Brasil, a fusariose destaca-se por ser a que maiores prejuízos econômicos traz aos produtores brasileiros, uma vez que as perdas podem atingir até 100% da produção. No Brasil, as duas cultivares mais plantadas são a 'Pérola' e a 'Smooth Cayenne', ambas suscetíveis à doença. (GIACOMELLI, 1974; PY, *et al.* 1984). A doença, relatada pela primeira vez por Kimati e Tokeshi (1964) no estado de São Paulo em frutos da cultivar Smooth Cayenne, atualmente já se encontra disseminada por todo o país e em alguns países da América Latina. Os sintomas mais característicos da doença são alterações morfológicas das plantas doentes, bem como exsudação de goma ou resina, daí a doença ser conhecida, inicialmente, por gomose (PISSARRA *et al.*, 1979). O agente etiológico é o fungo *Fusarium subglutinans* (Wollenweber e Reinking) Nelson, Toussoun e Marasas f. sp. *ananas* Ventura, Zambolim e Gilbertson, que apresenta especificidade para o abacaxizeiro (VENTURA *et al.*, 1993a; VENTURA, 1996).

A doença causa perdas variáveis na produção de frutos, a depender do inóculo inicial, da região produtora e da época de produção. *F. subglutinans* infecta mudas, plantas em desenvolvimento vegetativo e frutos, causando

podridão dos tecidos afetados, com exsudação de substância gomosa a partir da região atacada. O patógeno penetra via aberturas naturais e, ou, ferimentos na superfície da planta; nos frutos a infecção se dá via flores abertas (MATOS; CABRAL, 2005).

Para o controle da doença recomenda-se a integração de medidas que incluem o plantio de material propagativo sadio, a erradicação de plantas doentes, a eliminação dos restos culturais, a uniformização da indução floral e o controle químico com fungicidas durante a antese (VENTURA *et al.*, 1993b). O uso constante do fungicida sistêmico benomyl para o controle da doença tem induzido a seleção de isolados do fungo resistentes (VENTURA *et al.* 1994; SANTOS, 2000), comprometendo o uso deste fungicida no controle da doença. O uso de cultivares de abacaxi resistentes é uma das alternativas mais viáveis para o controle da doença (MATOS; CABRAL, 1988; MATOS *et al.*, 1991). Cabral *et al.* (1985) identificaram as cultivares Perolera e Primavera como fontes de resistência para programas de melhoramento, tendo o Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas-Ba recomendado o seu uso em áreas onde a doença é endêmica (VENTURA *et al.*, 1994). Recentemente, a EMBRAPA/CNPMF lançou a variedade Imperial, que dentre outras qualidades, possui resistência genética a fusariose.

2.2. Marcadores moleculares (RAPD) e o Melhoramento Genético

Até recentemente, os estudos genéticos eram realizados utilizando-se marcadores morfológicos determinados por mutações simples em um gene particular, gerando alterações fenotípicas de fácil identificação no organismo. Os marcadores morfológicos contribuíram significativamente para o estabelecimento dos princípios teóricos do mapeamento genético e das análises de ligação gênica. No entanto, o número reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis, a ausência de ligação destes com caracteres de importância econômica e os efeitos deletérios das mutações limitaram sua utilização (GUIMARÃES; MOREIRA, 1999).

Com o advento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a manipulação do DNA, que culminou no surgimento dos vários tipos de marcadores moleculares. Estes apresentam vantagens sobre os marcadores

morfológicos por fornecerem um número ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma e por serem independentes dos efeitos ambientais e do estágio fisiológico da planta, permitindo a identificação precisa e precoce dos genótipos de interesse. O avanço das técnicas moleculares tem sido acompanhado de perto pelo grande desenvolvimento nas áreas da bioinformática e da genética quantitativa, que tem contribuído de forma sinérgica para o atual nível de conhecimentos sobre a estrutura genética de várias espécies cultivadas e silvestres. Atualmente, estão disponíveis mapas genéticos saturados para a maioria das espécies vegetais de interesse agrônomo, além de metodologias precisas para análise de locos gênicos associados a caracteres quantitativos (QTLs). A maioria dos caracteres de importância econômica está sob controle genético complexo, envolvendo a ação de vários genes, o que torna difícil sua manipulação e compreensão. Regiões genômicas contendo locos gênicos associados a tais caracteres quantitativos são denominados QTLs (*Quantitative Trait Loci*). A aplicação dessas metodologias para acelerar e monitorar os programas de melhoramento genético tem implicado em grandes avanços no desenvolvimento de variedades melhoradas.

Muitos estudos realizados têm enfatizado aspectos à seleção individual de características desejáveis em programas de melhoramento (USBERTI FILHO et al., 1995). Técnicas isoenzimáticas como marcadores genéticos estão sendo utilizadas com sucesso em plantas de abacaxi visando, principalmente, à identificação de cultivares (DEWALD et al., 1988) e estudos genéticos e taxonômicos (DEWALD et al., 1992; ARADHYA et al., 1994), entre outros.

O advento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (MULLIS; FALOONA, 1987) e seus posteriores avanços, utilizando uma enzima DNA polimerase termoestável e termocicladores programáveis com elevada capacidade de processamento, imprimiram grande automatização à síntese in vitro de DNA. A técnica de PCR consiste na síntese enzimática de um segmento de DNA, delimitado por um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) de seqüências específicas de nucleotídeos de fita simples. *Primers* são seqüências curtas de DNA, que pareiam com o DNA molde e servem de iniciadores para a síntese in vitro de uma nova fita de DNA. As reações ocorrem em ciclos alternados de temperatura, sendo que cada ciclo do PCR envolve três etapas. Na primeira ocorre a desnaturação da fita dupla de DNA, posteriormente, os *primers*

se pareiam com as seqüências complementares específicas que flanqueiam o sítio alvo, e então a nova fita de DNA é sintetizada a partir das extremidades 3'-OH livres dos *primers* por meio da enzima DNA polimerase. Como cada ciclo é repetido várias vezes, a amplificação do DNA-alvo ocorre em progressão geométrica, requerendo uma quantidade muito pequena de DNA molde. A facilidade, a rapidez e a sensibilidade da técnica de PCR possibilitaram o surgimento de uma nova geração de marcadores moleculares baseados na amplificação de DNA, como: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) ou ASA (*Amplified Specific Amplicon*); Microssatélite (ou SSR - *Simple Sequence Repeats*); e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). As tecnologias de marcadores moleculares estão evoluindo rapidamente e modificações já existem para algumas das técnicas acima mencionadas. O detalhamento de cada um dos tipos de marcadores acima citados pode ser encontrado em Milach (1998) e Ferreira e Grattapaglia (1995).

Os marcadores RAPD (WILLIAMS et al., 1990) também chamados de AP-PCR (*Arbitrarily Primed-PCR*) (WELSH; MCCLELLAND, 1990), constituem uma variação da técnica de PCR que utiliza um único *primer* de dez nucleotídeos, com seqüência arbitrária, e que utiliza menor temperatura na etapa de anelamento a fita molde. Para que um fragmento de DNA seja amplificado, duas regiões complementares ao *primer* devem estar separadas por até 2.000 pb e em orientações opostas. Com isso, são amplificados fragmentos de DNA distribuídos ao acaso no genoma, sem a necessidade do conhecimento prévio da seqüência do DNA. A detecção dos produtos de amplificação é feita em gel de agarose tratado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. As bases moleculares do polimorfismo de RAPD são mutações de ponto ou deleções no sítio de pareamento do *primer*, ou inserções entre os sítios de pareamento, deixando-os a uma distância tal que impossibilita a sua amplificação. O RAPD é uma técnica de fácil execução, de custo reduzido e aplicável a qualquer tipo de organismo. No entanto, existem problemas inerentes à reprodutibilidade dos padrões de amplificação, além do baixo conteúdo de informação genética por loco, uma vez que esses marcadores são essencialmente dominantes. Este tipo de marcador possibilita a detecção de apenas um alelo por loco, sendo que a presença de uma banda no gel identifica indivíduos homozigotos dominantes (AA)

ou heterozigotos (Aa), não permitindo a distinção entre eles. O homozigoto recessivo (aa) é identificado pela ausência da banda.

A técnica de RAPD, dentre as apresentadas, é a de menor custo, número de etapas, tempo para obter os resultados; e a de maior facilidade de implementação. Tem, contudo, a desvantagem da baixa repetibilidade e pouca consistência entre laboratórios, o que dificulta a comparação de dados obtidos em diferentes locais. Assim, cuidados devem ser tomados na padronização da técnica de RAPD no laboratório para determinadas finalidades, como por exemplo, a caracterização de cultivares. O nível de polimorfismo obtido com RAPD varia grandemente com a espécie em questão, e tem sido utilizada com sucesso na caracterização de variedades de cevada (TINKER et al., 1993; PENNER et al., 1998), e arroz (MACKILL, 1995), entre outras.

Ruas *et al.* (1995) citaram a importância das estimativas da relação e da diversidade genética de cultivares de abacaxizeiro para avaliação de recursos genéticos. Estes autores encontraram uma relação genética bastante similar entre quatro cultivares de abacaxizeiro (Pérola, Smooth Cayenne, Primavera e Perolera), bem como compatibilidade dos resultados obtidos por meio de marcadores moleculares RAPD e análises das características morfológicas e agrônômicas, mostrando que a análise por RAPD pode ser usada de maneira eficiente para caracterização de recursos genéticos no gênero *Ananas*.

2.3. Estudos de herança genética

Estudos de herança genética são relativamente simples quando a característica em questão é qualitativa e, portanto, apresenta distribuição discreta. Nestes casos, são feitos testes de aderência para verificar se a segregação observada ajusta-se à esperada considerando diferentes hipóteses. Entretanto, se a característica de interesse tiver distribuição contínua, é freqüente a utilização de modelos de genética quantitativa, os quais assumem um grande número de locos de efeitos aproximadamente iguais e pequenos. Dispondo-se de genitores contrastantes (P_1 e P_2) e das gerações F_1 , F_2 , RC_1 e RC_2 , podem-se estimar componentes de variância e de médias. Uma das metodologias mais utilizadas para inferir sobre componentes de médias é o teste de escala conjunto, descrito por Mather e Jinks (1971).

Entretanto, uma vez que a distribuição fenotípica contínua nem sempre é sinônimo de herança poligênica, a validade desta metodologia é grandemente comprometida se genes de efeito maior também contribuírem para a expressão do caráter. Caso a variação ambiental seja suficientemente grande em relação ao efeito individual de qualquer gene, efeitos de genes maiores podem ser completamente obscurecidos e confundidos com efeitos de poligenes (LYNCH; WALSH, 1998). Portanto, quando a característica em questão tem distribuição contínua, é interessante verificar se ocorre um gene de efeito maior ou se a herança é essencialmente poligênica. A distinção entre efeitos de genes maiores e efeitos de poligenes é importante para o entendimento da expressão do gene maior em relação à constituição genética (poligênica e, ou ambiental) e para a predição da segregação de um cruzamento (JIANG et al., 1994). Os testes mais poderosos para a detecção de genes maiores são aqueles que usam a informação de marcadores moleculares ligados. Entretanto, dados puramente fenotípicos também podem ser usados para inferir sobre a presença ou ausência desses genes (LYNCH; WALSH, 1998).

Considerando a segregação de um gene maior e assumindo que a distribuição fenotípica de cada genótipo do gene maior (AA, Aa e aa) seja normal, a distribuição resultante, ou seja, uma mistura de distribuições normais, é geralmente não normal. Entretanto, a simples rejeição de normalidade, por si só, não é suficiente para inferir sobre a presença de um gene de efeito maior. Assim, uma abordagem mais poderosa é testar se a distribuição fenotípica resulta da mistura de duas ou mais distribuições normais (LYNCH; WALSH, 1998).

Embora a frequência de recombinação esteja associada à distância física entre os locos, esta relação varia entre organismos e ao longo do genoma de um mesmo organismo (LIU, 1998). Em *Arabidopsis*, por exemplo, 1 cM equivale a 140 kb (1 kb = 1.000 pares de bases); em milho, equivale a 2.000 kb (LYNCH; WALSH, 1998).

2.4. Identificação de marcadores associados a caracteres de interesse

O primeiro passo no mapeamento genético de uma espécie é a identificação de marcadores que revelem polimorfismo entre os genitores e que, portanto, segregarão na população proveniente do cruzamento entre eles. Para

isso, o DNA dos genitores é analisado com diferentes marcadores. Esta análise, embora revele polimorfismos, não fornece informações sobre qual dos polimorfismos encontrados está ligado à genes de interesse.

Linhagens quase isogênicas têm sido utilizadas com bastante sucesso na identificação de marcadores ligados a genes de resistência em várias espécies de importância econômica, como ao vírus TMV em tomate (YOUNG et al., 1988), a *Pseudomonas* sp. em tomate (MARTIN et al., 1991) e a *Phytophthora megasperma* em soja (DIERS et al., 1992). Grande parte desses trabalhos têm sido desenvolvidos pela associação de marcadores moleculares a caracteres de herança simples, uma vez que as variações fenotípicas são de fácil mensuração e análise. Esta associação pode ser facilitada por meio da análise de *bulks* segregantes ou BSA (ARNHEIM et al., 1985; MICHELMORE et al., 1991). Esta análise se baseia na constituição de *bulks* (ou misturas) de amostras de DNA de indivíduos com fenótipos extremos pertencentes à população segregante para a característica de interesse. Presume-se que locos marcadores ligados a genes que controlam o fenótipo de interesse estejam distribuídos de forma desigual nos dois *bulks* (desequilíbrio de ligação), sendo detectados por meio de polimorfismos entre eles. Entretanto, marcadores não ligados às características que serviram de critério para separar os *bulks* devem estar distribuídos aleatoriamente nos mesmos sendo, portanto, monomórficos entre eles. Marcadores polimórficos entre *bulks* são posteriormente analisados na população para confirmação da ligação e determinação da distância genética dos mesmos em relação aos genes estudados. Assim, o marcador que co-segregar com os *bulks* tem uma grande probabilidade de estar ligado à característica avaliada, sem necessitar da genotipagem de um grande número de indivíduos nem da construção de um mapa genético saturado.

A análise de *bulks* segregantes permite uma rápida análise de um grande número de marcadores e conseqüente otimização do mapeamento de regiões que flanqueiam locos de caracteres de interesse. Na técnica de BSA, apenas polimorfismos para marcadores localizados a menos de 30 cM da região alvo são identificados, segundo estudo envolvendo populações F₂ (MICHELMORE et al., 1991).

A probabilidade de detecção de falsos positivos na BSA, ou seja, marcadores polimórficos entre *bulks*, mas não ligados a característica de

interesse (gene de resistência, etc), é bastante reduzida. O tamanho mínimo do *bulk* é determinado pela frequência com que locos não ligados devem ser detectados como polimórficos entre as amostras. Isto depende do tipo de marcador (dominante ou codominante) e do tipo de população usada para gerar os *bulks* (F_2 , retrocruzamentos, etc). Para um marcador dominante segregando em uma população F_2 , a probabilidade de um *bulk* de n indivíduos ter um alelo marcador e um segundo *bulk* de igual tamanho não ter esse alelo é de $2[1 - (1/4)^n](1/4)^n$, quando o loco é não ligado ao gene alvo. Portanto, poucos indivíduos por *bulk* são requeridos (MICHELMORE et al., 1991), entretanto, quanto menor o *bulk*, maior a frequência de falsos positivos.

Vários exemplos demonstram o sucesso da técnica de BSA, como a identificação de marcadores RAPD e RFLP ligados a genes de resistência ao míldio em alface (MICHELMORE et al., 1991; PARAN et al., 1991; PARAN; MICHELMORE, 1993). Regiões genômicas que controlam outras características importantes, como amadurecimento do fruto e abscisão do pedicelo em tomate, foram também detectadas utilizando essa estratégia (GIOVANNONI et al., 1991). Em feijão foram identificados alguns genes de resistência a mancha-angular usando marcadores RAPD (CORRÊA et al., 2001; FERREIRA et al., 1999). A estratégia de BSA também pode ser utilizada na identificação de locos controladores de caracteres quantitativos (QTLs) que possuam grandes efeitos sobre a característica de interesse. Utilizando esta estratégia, Schuster (1999) identificou seis marcadores moleculares associados à resistência da soja ao nematóide de cisto da soja. Os marcadores RAPD com valor para seleção de plantas podem ser transformados em SCAR para melhor utilização em larga escala nos programas de melhoramento (CORRÊA et al., 2000).

A identificação de marcadores ligados a genes que conferem resistência a vários patógenos permite monitorar e acelerar a introgressão destes genes em cultivares comerciais, além de possibilitar a piramidação de dois ou mais genes de resistência em um cultivar comercial. Por exemplo, cultivares de feijão foram desenvolvidas com base nessa estratégia, utilizando marcadores para monitorar a introgressão de genes de resistência a doenças causadas por fungos (FALEIRO et al., 2001; FALEIRO et al., 2003).

2.5. Mapeamento genético

Mapeamento genético é um processo que define pontos (marcadores genéticos, ou seqüências de DNA, ou genes), em uma linha que representa o cromossomo em termos físicos e genéticos. O posicionamento relativo dos marcadores baseia-se na freqüência de recombinação entre os mesmos. Os resultados desse processo são representações lineares que descrevem a organização de um conjunto de marcadores. Um grupo de marcadores genéticos ligados entre si, que segrega independentemente dos demais, é dito grupo de ligação. Normalmente, uma espécie tem tantos grupos de ligação quantos forem os seus cromossomos representados no conjunto haplóide (CORRÊA, 1995).

O mapeamento genético é baseado na hipótese de que a co-transmissão de dois marcadores reflete a proximidade entre eles, uma vez que a probabilidade de ocorrerem permutas genéticas entre dois marcadores é menor quanto mais próximos eles estiverem localizados. Tal fato torna possível ordenar linearmente a informação genética ao longo dos cromossomos, tendo em vista que o genoma eucarioto é organizado e transmitido como unidades lineares.

A distância genética entre os locos é medida em termos de freqüência de recombinação, que é a probabilidade de ocorrência de permuta genética entre dois marcadores. A distância de mapeamento, expressa em centiMorgans (cM), é calculada com base na freqüência de recombinação por meio de funções de mapeamento que corrigem as distorções entre a conversão das unidades. A função de Haldane é a mais simples e admite que as permutas genéticas ocorrem ao acaso e são independentes. Já a função de Kosambi considera interferência parcial nos cálculos da distância de mapeamento. A interferência é o fato de que uma permuta genética afeta a ocorrência de outras em regiões adjacentes próximas a ela, considerando, desta forma, a ocorrência de *crossing-overs* duplos. A precisão na obtenção das distâncias genéticas é diretamente proporcional ao tamanho da população e ao número de marcadores analisados.

Marcadores utilizados no mapeamento genético devem ser polimórficos entre os indivíduos parentais e apresentar uma segregação mendeliana na progênie. Marcadores cuja segregação é estatisticamente validada pelo teste de Qui-quadrado são agrupados e ordenados em grupos de ligação com base nas análises de segregação destes em uma população de mapeamento, por meio de

pacotes computacionais apropriados, como MapMaker (LANDER et al., 1987) e JoinMap (STAM, 1993).

O mapa físico consiste na localização de regiões específicas de DNA nos cromossomos por análise citológica ou molecular. O mapa físico com bases citogenéticas contém a ordem e a localização de locos no cromossomo em relação a padrões de bandeamento.

O mapeamento genético com marcadores moleculares tem possibilitado o aparecimento de mapas saturados para diversas espécies. Uma etapa comum da aplicação desses marcadores no mapeamento do genoma de uma espécie tem sido a integração de diversos tipos de marcadores, incluindo os morfológicos e isoenzimáticos, bem como os RAPD e AFLP (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994; CAI et al., 1994; STROMMER et al., 2002; CARNEIRO et al., 2002). Outro marcador molecular que vem sendo muito usado na construção de mapas genéticos é o microssatélite. Segundo Risterucci et al. (2000a), os microssatélites permitem identificação mais cedo do grupo de ligação e comparação de mapas entre várias progênies devido alta especificidade dos locos e do nível de polimorfismo. Já a alta relação multiplex do AFLP permite análises de grande número de loco, boa distribuição no genoma e habilita um grupo de ligação denso.

A possibilidade de se empregar marcadores moleculares na construção de mapas genéticos de ligação oferece oportunidades para se compreender a organização do genoma, identificar locos marcadores associados a genes controladores das características de interesse, além de auxiliar os programas de melhoramento por meio da seleção assistida por marcadores (TAR'AN et al., 2001). Segundo Tanksley et al. (1989), a construção de mapas saturados (mapas de ligação que cobrem todo o genoma) é o primeiro passo para algumas aplicações dos marcadores moleculares no melhoramento genético.

Para construção de mapas de ligação, marcadores codominantes, como microssatélites, também denominados SSRs (*simple sequence repeats*), são preferidos, pois podem ser transferidos para mapas genéticos de diferentes cruzamentos, em contraste com os RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), os quais são marcadores dominantes e portanto, novos mapas devem ser gerados para cada cruzamento (VAN DER VEM; MCNICOL, 1996). As características dos marcadores

microssatélites os elegem como os marcadores ideais para este propósito, pois são codominantes, multialélicos, reprodutíveis e distribuídos por todo o genoma (DEVEY et al., 1996).

A obtenção de um mapa genético do abacaxizeiro construído a partir de populações segregantes e por meio de marcadores baseados na reação de polimerase em cadeia (RAPD, AFLP e SSR – “*Simple Sequence Repeats*”) permitirá identificar regiões genômicas responsáveis por características de interesse da planta e do fruto. Entre estas, destacam-se características potencialmente quantitativas (análise de QTLs), tais como dias até o florescimento após a indução floral, altura de planta, número de filhotes, comprimento e espessura do pedúnculo, peso de fruto, peso de coroa, acidez titulável total (ATT), percentual de sólidos solúveis (°Brix). Com o mapeamento genético procura-se também encontrar características de resistência às principais doenças que atacam a cultura, como a fusariose e murcha do abacaxi.

Apenas em 2004, Carlier et al. (2004), apresentaram o primeiro mapa genético do abacaxizeiro, com base em um cruzamento interespecífico (*Ananas bracteatus* x *A. comosus*).

No presente trabalho, optou-se por desenvolver um mapa de natureza intra-específica (*A. Comosus*), a partir de variedades de interesse agrônômico, com vistas a mapear genes de resistência a fusariose. Com estes resultados pretende-se melhorar a qualidade do abacaxi produzido no Brasil. Uma das principais metas é desenvolver variedades resistentes à fusariose, considerada a principal doença da cultura. A Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, situada em Cruz das Almas na Bahia, possui em seu Banco Ativo de Germoplasma, aproximadamente 700 acessos de abacaxi e espécies afins, que podem conter grande parte da variabilidade genética do abacaxi brasileiro.

A construção de um mapa consensual de abacaxi poderá ser realizada por meio da obtenção de mapas genéticos de ligação elaborados a partir progênies provenientes de diferentes genitores, permitindo a localização relativa dos marcadores ancorados, o que conduzirá a uma melhor compreensão do seu genoma.

2.5.1. Mapeamento de Genes de Resistência

A construção de um mapa genético envolve a avaliação do padrão de segregação das marcas em indivíduos segregantes, a análise de desequilíbrio de ligação, a determinação da distância entre marcas e o conseqüente ordenamento linear das mesmas em grupos de ligação (VUYLSTEKE et al., 1999). Várias metodologias podem ser utilizadas para o mapeamento de genes de resistência, como a análise de agrupamentos segregantes (*Bulked Segregant Analysis*; MICHELMORE et al., 1991). Essa estratégia serve tanto para aumentar a eficiência de identificar marcadores relevantes para as características prioritárias no programa de melhoramento quanto para refinar o mapeamento em regiões genômicas específicas.

O método BSA consiste na avaliação de dois grupos de indivíduos obtidos de pontos extremos da curva de distribuição do caráter em estudo. Espera-se que os alelos dos marcadores que estiverem associados aos alelos do gene de resistência estejam distribuídos de forma desigual entre os dois grupos, possibilitando sua detecção (MICHELMORE et al., 1991). Segundo Lynch e Walsh (1998), na composição dos *bulks*, apenas as regiões com forte influência no caráter estarão sendo mostradas em detrimento daquela de pequeno efeito. Neste caso, a análise requer a utilização de populações segregantes com maior número de indivíduos.

Os princípios do mapeamento genético de características qualitativas e quantitativas são os mesmos. Entretanto, o mapeamento destas características difere em alguns aspectos, como a necessidade de construção de um mapa genético da espécie, no caso de características quantitativas. Outro aspecto que diferencia o mapeamento de características qualitativas e quantitativas refere-se aos programas estatísticos utilizados para a análise de ligação gênica (MILACH, 1998). A existência de desequilíbrio de ligação, decorrente da redução da frequência de recombinação entre genes ligados, fundamenta as análises de mapeamento de genes. Assim, são os desvios em relação às proporções esperadas pela segregação independente de alelos de locos diferentes que permitem a detecção e o mapeamento de QTLs (COELHO, 2000).

Há vários procedimentos estatísticos para determinar se um gene está ligado a um loco marcador. Todos os procedimentos compartilham o mesmo

princípio básico que consiste em dividir a população em diferentes classes genotípicas baseado na constituição alélica do loco marcador e usar correlações estatísticas para determinar se indivíduos de genótipos distintos diferem significativamente entre si em relação ao caráter medido. Se houver diferenças significativas, infere-se que pelo menos um gene que controla o caráter está ligado ao loco marcador usado para genotipar a população. Normalmente, não é possível determinar se o efeito detectado com um marcador é devido a um ou mais genes ligados que afetam o caráter (TANKSLEY, 1993).

Genes de resistência podem estar arranjos de diferentes formas no genoma. Locos de resistência podem ser genes simples com múltiplos alelos. Entretanto, a maioria dos genes de resistência pertence a família de genes ligados. Em espécies com uma alta densidade gênica, como *Arabidopsis* e arroz, os genes são fisicamente próximos uns dos outros (HULBERT et al., 2001). Em espécies com uma menor densidade de genes, eles se encontram mais distantes, como é o caso do loco Rp₁ de milho (SUN et al., 2000).

O uso de mapas genéticos baseados em marcadores moleculares permite que genes de resistência a vários patógenos sejam mapeados uns em relação aos outros. A partir desses mapas, observou-se que genes dentro de um único *cluster* (agrupamento) podem determinar resistência a patógenos muito diferentes (HULBERT et al., 2001).

3. METODOLOGIA

3.1. Material vegetal

Uma população constituída por 179 indivíduos F_1RC_1 foi obtida pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, do retrocruzamento entre o híbrido 52 e a cultivar Smooth Cayenne. O Híbrido 52 é oriundo do cruzamento entre a cultivar Perolera e a Smooth Cayenne. Destaca-se dos quais 119 são provenientes do retrocruzamento de (Perolera x Smooth Cayenne - 52) x Smooth Cayenne e 60 do cruzamento recíproco [Smooth Cayenne x (Perolera x Smooth Cayenne - 52)]. Cada indivíduo dessa população foi clonado e inoculado com uma suspensão de esporos obtida de cultura monospórica de *F. subglutinans* para avaliar a resistência.

O híbrido resistente (Perolera x Smooth Cayenne - 52) foi retrocruzado com o cultivar suscetível (Smooth Cayenne) para a obtenção da população supracitada. As sementes obtidas foram semeadas em caixas de acrílico (gerbox) com leito de espuma sintética e germinadas em incubadoras com temperatura e fotoperíodo controlados (30°C/16 horas diárias de luz). As plântulas obtidas foram repicadas para canteiros de isopor e mantidas em casa de vegetação durante 6-8 meses. Posteriormente, as mudas foram aclimatadas em telado (50% sombra) por um a três meses, divididas ao meio (clonadas) e depois transplantadas em canteiros de alvenaria à pleno sol (Figura 3).

3.2. Inoculação e avaliação da resistência à fusariose

As mudas das progênies F_1RC_1 com 15 cm ou mais de comprimento foram feridas na base com instrumento perfurante e imergidas por 3 minutos numa suspensão de esporos obtida de cultura monospórica de *F. subglutinans* ajustada

para 1×10^5 conídios/ml. Em seguida, foram replantadas nos canteiros de alvenaria à pleno sol. Entre 90 e 120 dias após a inoculação foi realizada a avaliação da incidência da doença na progênie, mediante a observação dos sintomas da doença. Mudanças das cultivares Pérola e Smooth Cayenne, padrão de suscetibilidade, bem como Perolera, Primavera e o híbrido genitor, padrões de resistência, foram incluídas como testemunhas nos experimentos (MATOS et al., 1978).

3.3. Extração de DNA genômico de *A. comosus*

A extração do DNA de folhas foi realizada pelo método de CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), modificado para diferentes espécies de plantas (CORRÊA et al., 1999; QUEIRÓS, 1999). Como a folha do abacaxi apresenta uma parte mais clorofilada (ápice) do que a outra (base), foi feito um teste para saber qual das partes apresentava uma maior concentração de DNA. Através deste teste pode-se observar que ambas as partes forneciam igual concentração de DNA, em função disto preferiu-se utilizar a base da folha por esta apresentar facilidade na maceração. A folha foi macerada em cadinhos de porcelana, na presença de nitrogênio líquido, e o macerado foi transferido para tubos ependorfs. Após a maceração foram adicionados 750 μ L de tampão de extração CTAB 2%, agitando-se no vortex e deixado em banho-maria por 30 a 40 minutos, sendo levemente agitado a cada 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 600 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v/v) e, posteriormente, centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa contendo o DNA foi transferida para outro tubo e o DNA foi precipitado por adição de 400 μ L isopropanol, seguido de incubação por 3 horas a -20°C . Logo após, foi centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm. A fase aquosa foi retirada e o precipitado foi lavado duas vezes com álcool 70% e uma vez com 95%. O pellet ficou em temperatura ambiente por 30 minutos e depois foi ressuspensão em 100 μ L de TE (Tris-HCl 10 mmol.L^{-1} e EDTA, pH 8,0 a 1 mmol.L^{-1}) com RNase (livre de DNase) 10 $\mu\text{g/mL}$ e incubado por 30 minutos a 37°C para degradar os RNAs presentes.

3.4. Amplificação e caracterização genética dos locos RAPD

Inicialmente adotou-se uma estratégia de mapeamento clássico, em função disto 60 *primers* decâmeros, identificados pela *Operon* como Kits (cada um com vinte *primers*) A, B, e C foram testados em cinco indivíduos aleatórios da progênie. Apesar da população em estudo se tratar de um RC, o fato de se utilizar 5 indivíduos aleatórios da progênie para identificar polimorfismos gerados por *primers* RAPD em vez dos dois genitores, foi em decorrência de não conhecer previamente o tipo de herança da resistência a fusariose. Deste modo, seguindo essa alternativa, pode-se acessar tanto as bandas com segregação típica RC como aquelas que se comportam como F₂.

Após análise fenotípica, mudou-se a estratégia de mapeamento clássico para localizado, com o intuito de identificar a região genômica responsável pela resistência à fusariose. Desta maneira, quantidades equimolares de DNA de seis indivíduos resistentes foram misturados e ajustados para concentração de 10 ng/μL para constituir o *bulk* resistente. Esse mesmo procedimento foi adotado com seis plantas suscetíveis para constituir o *bulk* suscetível. Os dois bulks foram testados com os mesmos 60 *primers* iniciais citados anteriormente. Para aumentar a obtenção de polimorfismos de marcadores moleculares do tipo RAPD-PCR, entre os dois *Bulks*, foi utilizada a combinação de dois oligonucleotídeos iniciadores de cada vez (WILLIAMS et al., 1993; CORRÊA et al., 1997), perfazendo um total de 177 combinações testadas neste trabalho.

As amplificações por reação de polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas em 25 μl de uma mistura composta por 2 μL de DNA genômico à 10 ng/μL, 1,2 μl de dNTP a 2,5 mmol.L⁻¹, 2,5 μl de MgCl₂ a 20 mmol.L⁻¹, 2,5 μl de tampão PCR 10X (Tris-HCl 1 mol.L⁻¹, KCl 50 mol.L⁻¹, MgCl₂ 1,5 mol.L⁻¹, pH 8,3), 2,5 μL do *primer* a 4 μmol.L⁻¹, 0,2 μL de *Taq* DNA polimerase a 5 u/μL e 14,1 μl de água ultrapura. Para a combinação de *primers*, o volume de água autoclavada era reduzido para 11,6 μL, em função da adição do outro *primer*. As amplificações foram realizadas em termociclador programado para o seguinte protocolo: 4 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 35 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 min; 40 ciclos a 94 °C por 15 segundos, 40 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 min; e, um passo final a 72 °C por 7 min.

Os produtos das ampliações foram separados por eletroforese em géis de agarose a 1,0%, corados com brometo de etídio e fotografados. Os padrões de bandas (presença/ausência) foram transformados em dados binários e incluídos em planilhas do programa computacional *Excel* para análises genético-estatísticas.

Após a padronização das condições de reação para cada par de *primer*, os mesmos foram empregados para amplificar os indivíduos da população segregante.

A banda RAPD polimórfica detectado nos *bulks* segregantes foi testado em todos os indivíduos constituintes de cada *bulk* para observar se está estava realmente ligada ao gene de resistência. Aquelas que apresentaram segregação semelhante ao gene da resistência foi amplificado em apenas 37 indivíduos da progênie, devido somente estes indivíduos estarem amplificando e apresentarem o teste de campo em relação a resistência ou suscetibilidade a fusariose.

3.5. Análise de segregação e ligação genética

Procedeu-se à análise de χ^2 dos resultados observados, tanto da reação da população F₁RC₁ ao patógeno, quanto da segregação dos marcadores RAPDs obtidos. As distâncias genéticas foram calculadas pela função de Kosambi (1999) escolhido com base nos critérios discutidos por CORRÊA et al, a partir de uma matriz de dados binários de presença, ausência e dado faltante, representado por 1, 0 e 9, respectivamente e com o auxílio do programa Mapmaker EXP 3.0 (LANDER et al., 1987; LINCOLN et al., 1992), com LOD score mínimo de 1,0. Esse valor indica que a região genômica que apresentar o valor de LOD igual ou maior que um será considerada como associada da característica em estudo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da população

Dos 179 indivíduos F_1RC_1 , 69 foram avaliados em campo (JUNGHANS et al., 2005). A herança monogênica e dominante da resistência à fusariose foi confirmada pelo teste qui-quadrado, comprovando segregação 1:1 (Tabela 1).

4.2. Extração do DNA genômico

Em um primeiro ensaio foram utilizadas para extração parte basal e do ápice da folha do abacaxizeiro (Figura 4a). Não houve diferença na concentração do DNA obtido a partir das diferentes partes da folha (Figura 4b). Porém, foi adotada a parte basal da folha para a extração do DNA, porque esta é macia, exigindo menor esforço na maceração.

Todos os 179 indivíduos amostrados tiveram seu DNA extraído e apresentaram resultados satisfatórios em termos de quantidade de DNA. A análise da qualidade e a quantidade do DNA foram feitas por visualização direta em gel de agarose 1%, pela comparação com amostras de concentração molecular conhecida (Figura 4c).

4.3. Caracterização dos locos RAPD

Dos 60 *primers* testados em cinco indivíduos aleatórios da progênie, 20 *primers* apresentaram padrões de amplificação que evidenciaram polimorfismos na população segregante (Figura 5). Foram amplificadas de 1 a 8 bandas por *primer*, sendo que o número de bandas polimórficas variou de 1 a 2 por *primer*. A

alta porcentagem de bandas monomórficas entre os cinco indivíduos da progênie sugere uma elevada similaridade genética entre os materiais analisados.

Dos 20 *primers* polimórficos, foram selecionados quatro (A08, A09, A15 e A18) apropriados para a análise do mapa, e testados em 179 indivíduos da população (Figura 6), com amplificação em apenas 82 indivíduos. Para os DNA que não amplificaram foram feitas re-purificações utilizando NaCl 5M e clorofórmio-álcool isoamílico, testes de concentração do DNA, re-extrações e novas extrações oriundas de nova coleta; para os materiais que não foram amplificados com os primeiros quatro *primers* testados, foram realizadas de três até quatro extrações de DNA independentes; mas estes continuaram a não amplificar. Uma possível explicação para essa não amplificação foi algum erro no uso de reagentes ou gerado no transporte e armazenamento dessas folhas.

4.4. Amplificação do DNA dos Bulks

Alterando-se a estratégia de mapeamento clássico para localizado, doze dos 60 *primers* usados para amplificação dos *bulks* R e S apresentaram bandas polimórficas (Figura 7), sendo que nenhuma destas, na abertura dos *bulks* (com o pai, mãe, seis indivíduos resistentes e seis suscetíveis) segregaram de acordo com a resistência. Os que mais se aproximaram foram os *primers* C19 (Figura 8) e B15 e, portanto, utilizados na análise de ligação dos 37 indivíduos da progênie com DNA amplificando e resultados fenotípicos.

Marcadores moleculares do tipo RAPD, ligados a genes que condicionam resistência a doenças têm sido identificados em várias culturas utilizando a técnica "Bulk Segregant Analysis" (BSA) desenvolvida por Michelmore et al. (1991). Utilizando esta estratégia, Alzate-Marin et al. (1999) identificaram marcadores RAPD em acoplamento e em repulsão ligados ao gene *Co-6* presente na variedade AB 136 de feijoeiro comum que confere resistência a várias raças de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc e Magnus) Lams. - Scrib. Pela mesma estratégia, Schuster et al. (2001) mapearam um QTL de efeito maior, localizado no grupo de ligação D2 da soja, que explica mais de 40% da resistência à raça 14 do nematóide de cisto (NCS).

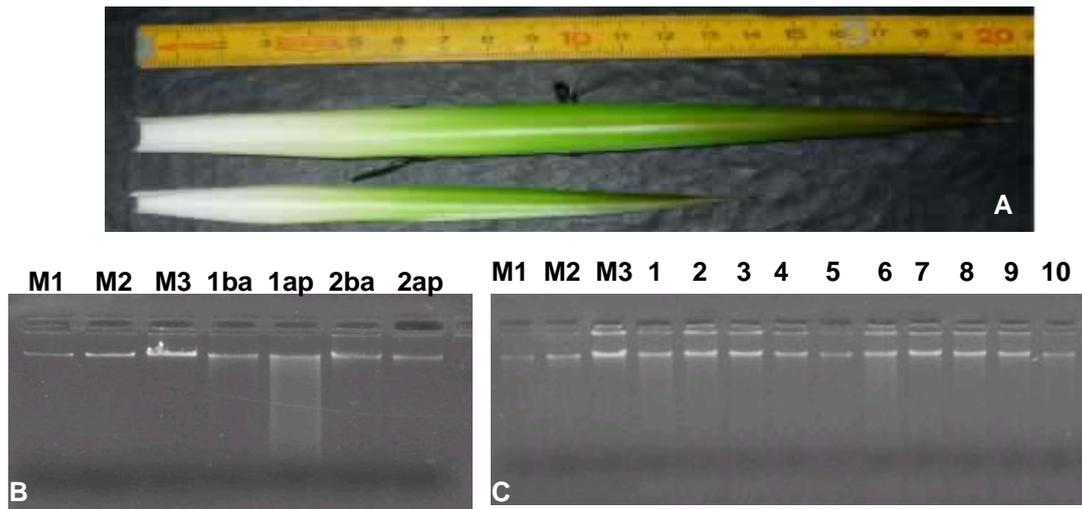


Figura 4: Amostras de folhas e DNA extraído. A) Folhas de abacaxi evidenciando porção aclorofilada (base) e clorofilada (ápice); B) 5 μ L de DNA total extraídos de diferentes partes da folha do abacaxizeiro: base (ba) e ápice (ap) de duas plantas; C) amostras de DNA total de dez plantas de abacaxizeiro (1 a 10), separadas por eletroforese em gel de agarose 1%, coradas com brometo de etídio e fotografadas pelo sistema EDAS290/Kodak. As três primeiras canaletas contêm DNA do fago lambda em quantidades conhecidas: M1 = 20 ng; M2 = 50 ng; M3 = 200 ng.

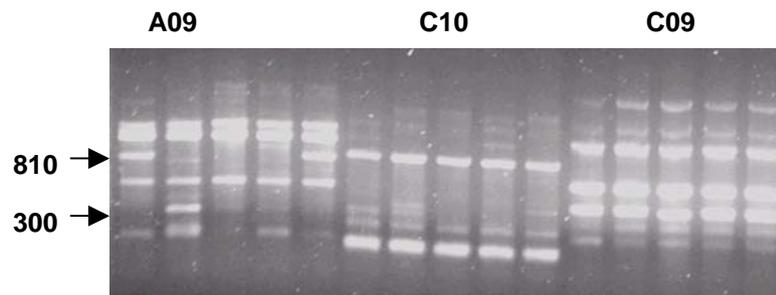


Figura 5: Padrão de ampliações de DNA. Produtos PCR separados por eletroforese em gel de agarose 1%, com três *primers* RAPD (A09, C10 e C09) em 05 diferentes indivíduos aleatórios da progênie.

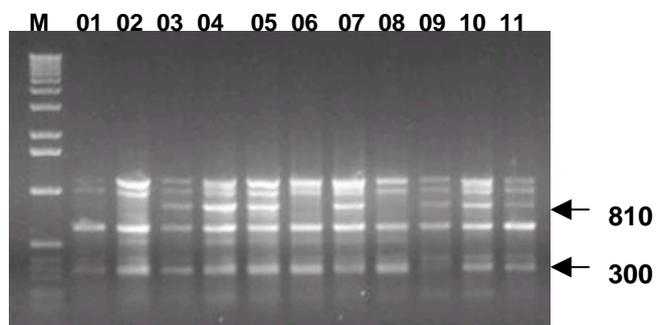


Figura 6: Padrão de ampliações de DNA. Produtos PCR separados por eletroforese em gel de agarose 1%, com o *primer* RAPD (A09) em 11 indivíduos da progênie. M = marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen).

A identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência permite a seleção de genótipos resistentes e possibilita a piramidação desses genes em cultivares suscetíveis. Estes marcadores têm diversas vantagens em relação aos marcadores fenotípicos tradicionais, pois podem ser identificados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, não são afetados pelo ambiente e não interagem epistaticamente (WILLIAMS et al., 1993).

4.5. Combinação de primers RAPD

Dos doze *primers* usados para amplificação dos *bulks* R e S citados anteriormente, três foram selecionados para a combinação de *primers*. Foram utilizados os *primers* C13, C18 e C07 por apresentarem boa amplificação e um maior número de bandas polimórficas.

Dez dos 59 *primers* combinados com o *primer* C13 pela técnica de RAPD com pares de *primers* (WILLIAMS et al., 1993; CORRÊA et al., 1997) e testados em *Bulk* R e S apresentaram bandas polimórficas (Figura 09), sendo que nenhuma destas, na abertura dos *bulks* (com o pai, mãe, seis indivíduos resistentes e seis suscetíveis) segregaram de acordo com a proporção 1:1 verificada no *loco* de resistência. Os pares que mais se aproximaram foram aqueles formados com o *primer* C13 combinado com B11 (Figura 10) e *primer* C13 combinado com A18. Porém, na amplificação dos 37 indivíduos da população, apenas a combinação C13 + B11 apresentou bandas claramente visíveis enquanto os da C13 + A18 foi considerada como inconsistente (dado espúrio). Quatro dos 59 *primers* associados com o *primer* C18 e testados em *Bulk* R e S apresentaram bandas polimórficas, sendo que nenhuma destas, na abertura dos *bulks* segregaram de acordo com a resistência. E na combinação dos 59 *primers* com C07 testados em *Bulk* R e S, 5 apresentaram bandas polimórficas, porém nenhuma destas segregaram de acordo com a resistência na abertura dos *bulk*.

Observa-se que o número de reações com produtos polimórficos foi aproximadamente idêntico no lote em que se empregou *primers* individuais e o primeiro lote de 59 *primers* combinados com o *primer* C13. Esse resultado está de acordo com o esperado para associações de *primer* (WILLIAMS et al., 1993; CORRÊA et al., 1997).

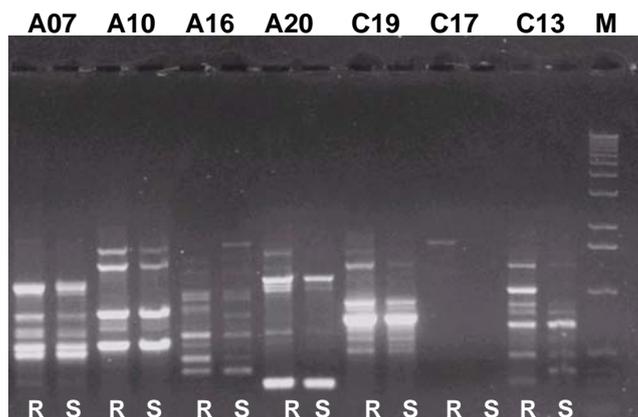


Figura 7: Padrão de ampliações de DNA dos *Bulks*. Produtos PCR separados por eletroforese em gel de agarose 1%, com 07 *primers* RAPD (A07, A10, A16, A20, C19, C17 e C13) em *Bulk* R (resistente) e S (suscetível). M = marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen).

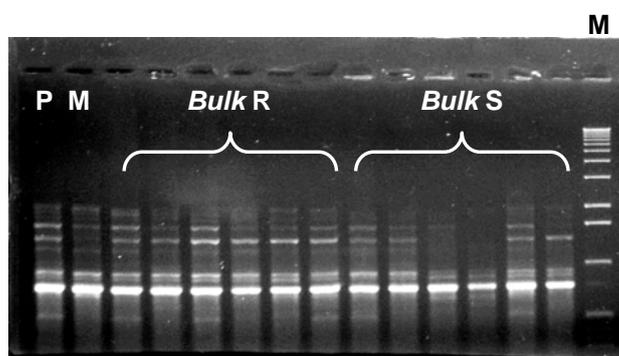


Figura 8: Abertura dos *Bulks*: Produtos PCR separados por eletroforese em gel de agarose 1%, com o *primer* C19 em 12 indivíduos da progênie (Pai, mãe, 6 indivíduos R e 6 indivíduos S). M = marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen).

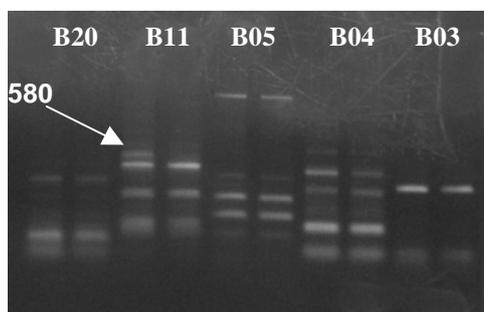


Figura 9: *Primer* C13 combinado com 05 *primers* RAPD (B20, B11, B05, B04 e B03). A primeira canaleta de cada combinação de *primer* é constituída por DNA de plantas resistentes a fusariose. A segunda canaleta por DNA de plantas suscetíveis.

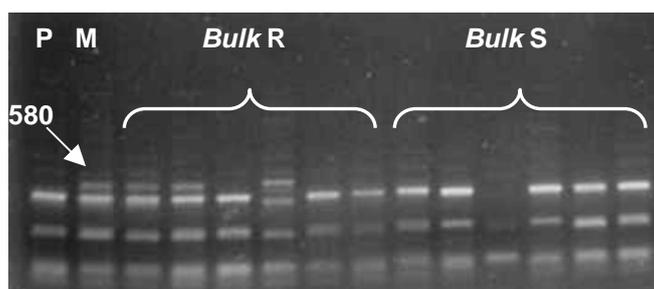


Figura 10: *Primer* C13 + B11 em 12 indivíduos da progênie (Pai, mãe, 6 indivíduos R e 6 indivíduos S). M = marcador de peso molecular de 1 Kb da invitrogen.

No entanto, as 59 combinações com o *primer* C18 bem como com C7 foram menores. Em todo caso, o número total de polimorfismos detectados por *primer* é otimizado, visto que, com um mesmo número de *primers* há grande número de possibilidades de combinações, sendo que no presente caso foram explorados 177, alcançando 19 polimorfismos adicionais. Segundo Corrêa et al. (1997), esses polimorfismos encontrados com a combinação de *primers* potencialmente representam regiões diferentes daquelas identificadas pelos *primers* individuais, isto é, estão distribuídas aleatoriamente no genoma.

4.6. Análise de segregação e ligação genética

Os quatro *primers* iniciais (A08, A09, A15 e A18) utilizados na amplificação dos 81 indivíduos da população, identificaram nove bandas polimórficas. Os dois *primers* (C19 e B15) oriundos da estratégia de BSA e analisados em 37 indivíduos, identificaram quatro bandas polimórficas. Já o único *primer* oriundo da combinação de primers (C13+B11) e também analisado em 37 indivíduos produziu apenas uma banda polimórfica. No total foram utilizadas 14 bandas polimórficas para a análise de ligação.

A situação mais favorável para se marcar um alelo é quando a herança do caráter é monogênica. Esse é o caso da reação de resistência do abacaxizeiro à fusariose (Tabela 1), pela segregação de metade de plantas resistentes e metade suscetíveis, na geração F_1 do retrocruzamento (PE x SC – 52) x SC. Embora tenha sido feita avaliação da reação ao patógeno em plantas individuais, as condições foram favoráveis ao desenvolvimento da doença, produzindo um resultado muito próximo do esperado (JUNGHANS *et al.*, 2005).

No mapa de ligação de (PE x SC – 52) x SC, 2 marcas foram agrupadas e 9 segregaram independentemente. Os marcadores agrupados foram ordenados com $LOD < 2,0$ (Tabela 2). Um dos marcadores que segregaram independentemente, segregou similar a doença e formou um grupo de ligação também com $LOD < 2,0$ (Tabela 3).

Tabela 1: Análise de segregação do gene Rfs_1 e dos marcadores RAPD, segundo hipóteses mendelianas pelo teste Qui-quadrado (SC = pai; PExSC-52 = mãe ; 0 e 1 indicam, respectivamente, ausência e presença de banda nos pais

Gene e Marcador	pai	mãe	Número Observado		Hipótese	χ^2	Probabilidade (%)
			Ausência	Presença			
Rfs_1^{**}	0	1	31	38	1:1	0,710	39,90
C19 ₉₀₀	1	0	16	21	1:1	0,675	41,11
C19 ₆₇₀	0	1	13	24	1:1	3,270	7,05
C19 ₄₉₀	1	0	23	14	1:1	2,189	13,90
B15 ₄₂₀	1	0	12	23	1:1	3,457	6,30
(C13+B11) ₅₈₀	0	1	17	18	1:1	0,029	86,58
A08 ₉₅₀	1	1	18	61	1:3	0,207	64,93
A08 ₄₈₀	1	1	25	53	1:3	2,068	15,04
A08 ₃₀₀	1	1	14	64	1:3	2,070	15,04
A09 ₈₁₀	1	1	19	40	1:3	1,633	20,13
A09 ₃₀₀	1	1	13	33	1:3	0,261	60,95
A15 ₇₀₀	1	1	18	34	1:3	2,564	10,93
A15 ₃₇₀	9	9	25	25	1:1	0,000	100,00
A18 ₈₀₀	0	1	29	47	1:3	7,018	0,81*
A18 ₈₀₀	0	1	29	47	1:1	4,263	3,89*
A18 ₄₇₀	0	1	19	57	1:3	0,000	100,00

* significativo pelo teste χ^2 a 5 % de probabilidade, não se aceita a hipótese de segregação.

** Gene de resistência ao *F. subglutinans*

TABELA 2 – Análise de ligação entre os marcadores RAPD C19₆₇₀ e B15₄₂₀, identificados na população de retrocruzamento (PE x SC-52) x SC, pelo programa MAPMAKER/EXP

ORDEM	LOCO	DISTÂNCIA	LOD SCORE
1	C19 ₆₇₀		...
2	B15 ₄₂₀	37 cM	1,07

TABELA 3 – Análise de ligação entre o marcador RAPD A09₃₀₀ e do alelo Rfs_1 , identificados na população de retrocruzamento (PE x SC-52) x SC), pelo programa MAPMAKER/EXP

ORDEM	LOCO	DISTÂNCIA	LOD SCORE
1	$Rfsa_1$...
2	A09 ₃₀₀	25,6 cM	1,64

A análise dos *bulks* segregantes, por meio do RAPD, identificou um potencial marcador de aproximadamente 300 pares de bases (pb) na fase de repulsão, amplificado pelo *primer* A09. Tal marcador também ocorreu no genitor resistente.

Um marcador ideal deve mostrar herança monogênica. Isso foi verificado pelos resultados de segregação da presença ou ausência da banda identificada nas plantas da geração F1 de retrocruzamento (Tabela 1). À semelhança dos resultados da reação ao patógeno, notou-se uma proporção de plantas com ou sem a banda muito próxima do esperado. Tanto os resultados de reação quanto os da presença ou ausência da banda, podem ser considerados confiáveis, apesar do LOD inferior à 2,0 em função da população ter sido de tamanho menor do que o ideal (WU et al., 1992).

Em geral, o valor de LOD é estipulado entre um limite de pelo menos 2 ou 3 (MILACH, 1998). Porém, foi considerado o valor de 1,64 como evidência de ligação do marcador A09₃₀₀ com genes que controlam a resistência à fusariose a uma distância de 25,6 cM. Esse é um dado importante, uma vez que na literatura são escassos trabalhos sobre genes que controlam a resistência à fusariose em abacaxizeiro. Além disso, esse resultado inicial permite indicar que houve efetiva avaliação fenotípica em campo, com resultado molecular que valida a formação dos *bulks* de DNA. Novas reações deverão ser feitas para selecionar marcadores mais proximamente ligados ao gene de resistência.

A identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência permite a seleção de genótipos resistentes e possibilita a piramidação desses genes em cultivares suscetíveis. Estes marcadores têm diversas vantagens em relação aos marcadores fenotípicos tradicionais, pois podem ser identificados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, não são afetados pelo ambiente e não interagem epistaticamente (WILLIAMS *et al.*, 1993).

Outro problema a ser resolvido é o controle fitossanitário, evitando desta forma o uso de métodos de inoculação com *F. subglutinans* para avaliar e selecionar materiais resistentes. Um exemplo é o trabalho de Santos, 2000 que indica um desses métodos de inoculação para avaliar em um curto período de tempo a doença fusariose.

A resistência genética tem se mostrado uma medida de elevado potencial de controle da fusariose, apresentando as vantagens de ser eficiente, econômica e não agressiva ao meio ambiente.

5. CONCLUSÕES

1. A herança monogênica e dominante da resistência à fusariose foi confirmada.
2. Nove marcadores segregaram independentemente e dois formaram um grupo de ligação.
3. O alelo de resistência do abacaxizeiro à fusariose Rfs_1 cossegregou a 25,6 cM do marcador RAPD A09₃₀₀.
4. O marcador A09₃₀₀ poderá ser empregado para auxiliar na seleção precoce de genótipos resistentes em progênies oriundas de 'Perolera'.

6. PERSPECTIVAS

1. Novas coletas e extrações deverão ser feitas para completar a análise da população segregante.
2. Amplificações com RAPD e outros marcadores deverão ser feitas para obter um mapa mais abrangente para essa população e identificar novas marcas localizadas mais próximas ao gene de resistência estudado no presente trabalho.
3. Avaliação fenotípica de toda população deverá ser realizada para que as estimativas de distância entre gene e marcadores seja mais precisa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZATE-MARIN, A.L.; PAULA JR., T.J.; MENARIN, H.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Use of RAPD markers to understand the dominant nature of antracnose resistance genes present in common bean cultivar AB- 136. **Annual Reporter of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v.40, p.132-133, 1997.
- ARADHYA, M.K; ZEE, F.; MANSARDT, R.M. Isoenzyme variation in cultivated and wild pineapple. **Euphytica**, Dordrecht, v.79, p.87-99, 1994.
- ARANTES, G. **Informações sobre produção de abacaxi na região do triângulo Mineiro**. Canópolis, MG: [s.n.]. 2001.
- ARNHEIM, N.; STARNGE, C.; ERLICH, H. Use of pooled DNA samples to detect linkage disequilibrium of polymorphic restriction fragments and human disease: studies of the HLA class II loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.82, n.20, p.6970-6974, 1985.
- BORGES, J. M. **Práticas de tecnologia de alimentos**. 2.ed. Viçosa: Universitária, 1989. 156 p.
- CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P. de. **Imperial, Nova Cultivar de Abacaxi**. Cruz da Almas, BA: Embrapa-CNPMPF, 2005. 4p. (Embrapa-CNPMPF. Comunicado Técnico, 114).
- CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P. de; CUNHA, G.A.P. da. Selection of pineapple cultivars resistant to fusariose. **Acta Horticulturae**, n.334, p.53-58, 1993.
- CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P. de; CUNHA, G.A.P. da. Caracterização morfológica-agronômica de germoplasma de abacaxi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9, 1987, Campinas, SP. Anais... Campinas, SP: **Sociedade Brasileira de Fruticultura**, v.1, p.35-40, 1988.
- CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P. de; SOUTO, G.F. Reação de germoplasma de abacaxi à inoculação com *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília. v.20, n.7, p.787-791, 1985.

CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P.; D'EECKENBRUGGE, G.C. Segregation for resistance to fusariose, leaf margin type, and leaf color from the Embrapa pineapple hybridization program. **Acta Horticulturae**, n. 425, p.137-144, 1997.

CAI, Q.; GUY, C.L.; MOORE, G.A. Extension of the linkage map in citrus using Random Amplified Polymorphic DNA e RFLP mapping of cold acclimation-responsive loci. **Theoretical and Applied Genetics**, n. 89, p. 606-614. 1994.

CARLIER, J.D.; REIS, A.; DUVAL, M.F.; COPPENS D'EECKENBRUGGE e LEITÃO, J.M. Genetic maps of RAPD, AFLP and ISSR markers in *Ananas bracteatus* and *A. comosus* using the pseudo-testcross strategy. **Plant Breeding** v.123, p.186-192, 2004.

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

COELHO, A.S.G. Considerações gerais sobre a análise de QTL's. In: Pinheiro, J.B.; Carneiro, I. F. **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000. p.1-20.

CORRÊA, R.X. ; GOODGOD, P.I.V. ; OLIVEIRA, M.L.P. ; NIETSCH, S. ; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Herança da resistência a mancha-angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistencia. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.26, n.1, p.27-32, 2001.

CORRÊA, R.X.; COSTA, M.R.; GOODGOD, P.I.V.; RAGAGNIN, V.A.; FALEIRO, F.G.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Sequence characterized amplified regions linked to resistance genes to rust in the common bean. **Crop Science**, Estados Unidos, v. 40, n.3, p.804-807, 2000.

CORRÊA, R.X.; ABDELNOOR, R.V.; FALEIRO, F.G.; CRUZ, C.D.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Genetic distances in soybean based on RAPD markers. **Bragantia**, Campinas, v.58, n.1, p.15-22, 1999.

CORRÊA, R.X. **Mapeamento genético da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) utilizando marcadores RAPD**. 1995. 97 f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CUNHA, G.A.P de; MATOS, A.P. de; SOUZA, L.F. da S.; SANCHES, N.F.; REINHARDT, D.H.R.C.; CABRAL, J.R.S. **Abacaxi para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: Frupex, 1994. 41p.

DEVEY, M.E.; BELL, J.C.; SMITH, D.N. et al. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.673-679. 1996.

DEWALD, M.G.; MOORE, G.A.; SHERMAN, W.B. Identification of pineapple cultivars by isozyme. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.113, n.6, p. 935-938, 1988.

DEWALD, M.G.; MOORE, G.A.; SHERMAN, W.B. Izoenzimas in *Ananas* (pineapple): genetics and usefulness in taxonomy. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.117,n. 3, p.491-496, 1992.

DIERS, B.W.; MANSUR, L.; IMSANDE, J.; SHOEMAKER, R.C. Mapping *Phytophthora* resistance loci in soybean with restriction fragment length polymorphism markers. **Crop Science**, v.32, p.377-383, 1992.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, n.1, p.13-15, 1990.

FALEIRO, F.G; RAGAGNIN, V.A; SCHUSTER, I; CORRÊA, R.X; GOOD-GOD, P.I; BROMMONSHENKEL, S.H; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.059-066, 2003.

FALEIRO, F.G; RAGAGNIN, V.A; CARVALHO, G.A; PAULA Jr; T.J; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Development of common bean lines resistant to rust and anthracnose by molecular markers-assisted backcrossing. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v.44, p.109-110, 2001.

FAO. Site FAO (2000).<http://apps.fao.org/>, consulta realizada em 5 de abril de 2004.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D.. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. **EMBRAPA-CENARGEN**, Documento 20, 220p. 1995.

FERREIRA, C. F.; BORÉM, A.; NIESTCHE, S.; PAULA JR, T.J.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identificação de marcador RAPD ligado ao gene de resistência à raça 63.39 de mancha-angular do feijoeiro. **Bragantia**, Campinas, v.58, n.2, p. 247-252, 1999.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 8.ed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1989, 230p.

GIACOMELLI, E.J. Apontamentos das aulas de abacaxicultura. **SUDENE/UFRPE**, 1974.

GIACOMELLI, E. J.; PY, C. Abacaxi no Brasil. **Campinas: Fundação Cargill**, p.101, 1981.

GIACOMELLI, E. J.; ROESSING, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Incidência da gomose numa coleção de ananas e pseudananas. **Bragantia**, Campinas, v. 28, Único, p.27-31, 1969.

GIOVANNONI, J.J.; WING, R.A.; GANAL, M.W.; TANKSLEY, S.D. Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations. **Nucl. Acids Res**; v.19, p.6553-6558, 1991.

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

GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 1999. p.715-740.

HULBERT, S.H.; WEBB, C.A.; SMITH, S.M.; SUN, Q. Resistance gene complexes: evolution and utilization. **Annual Review of Phytopathology**, v.39, p.285-312, 2001.

IBGE Disponível no site IBGE (2002). URL: http://www.sidra.ibge.gov.br/cgi_bin/prtabl Levantamento sistemático da produção agrícola – LISPA/IBGE (Março/2002). Acessado em 02 de março de 2005.

IBGE (2003). Dados de safra de abacaxi no Brasil. On-line. Disponível na Internet: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp>>. Em: 20 out. 2005.

JIANG, C.; PAN, X.; GU, M. The use of mixture models to detect effects of major genes on quantitative characters in plant breeding experiments. **Genetics**, v. 136, n.1, p. 383-394, 1994.

JUNGHANS, D. T.; BRASILEIRO, H. S.; SANTOS, V. J.; CABRAL, J. R. S.; MATOS, A. P. de. Herança da resistência a fusariose em abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza - CE, v. 30, n. Suplemento, p. S123-S123, 2005.

KIMATI, H.; TOKESHI, H. Nota sobre a ocorrência de *Fusarium* sp. causando resinose em abacaxi. **Revista de Agricultura**, 39:131-33. 1964.

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

LINCOLN, S.; DALY, M.; LANDER, E. Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0. 3rd ed; **Whitehead Institute, Cambridge**. Technical Report. 1992.

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

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

- MACKILL, D.J. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. **Crop Science**, v.35, p.889-894, 1995.
- MANICA, I. **Fruticultura Tropical: 5. Abacaxi**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1999. 501p.
- MARTIN, G.B.; WILLIAMS, J.G.K.; TANKSLEY, S.D. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance genes in tomato using random primer and near-isogenic lines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, p.2336-2340, 1991.
- MATHER, K.; JINKS, J. L. **Biometrical Genetics**. Ithaca, Cornell University Press, 1971. 382p.
- MATOS, A.P.; CABRAL, J.R.S. Interação entre variedades de abacaxi e isolados de *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Revista Brasileira de Fruticultura** v.10, p.55-61, 1988.
- MATOS, A.P.; MOURICHON, X.; LAPEYRE, F. Reaction of pineapple accessions to inoculation with *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Fruits**, v.46, p.647-652. 1991.
- MATOS, A.P. de.; CABRAL, J.R.S. **Manejo Integrado da Fusariose do Abacaxizeiro**. Cruz das Almas – BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2005. 2p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular Técnica, Abacaxi em foco, 32).
- MEDINA, J.C. Abacaxi: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. **Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos**, 1987, 285 p.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 9828-9832, 1991.
- MILACH. S.C.K. **Marcadores de DNA em plantas**. UFRGS, Porto Alegre, 1998. 141 p.
- MULLIS, K. e FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol**, n.155, v. 335, 1987.
- OLIVEIRA, Dalmo. Nova técnica aumenta produção de abacaxi. Banco de notícias da EMBRAPA (2001) On-line. Disponível em: <<http://www.cnpmf.embrapa.br/jornal/index.htm>>. Acesso em: 12 set. 2005.
- PARAN, I.; KESSELI, R.; MICHELMORE, R.W. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. **Genome**, v.34, p.021-1027, 1991.

- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**; v.85, p.985-993, 1993.
- PENNER, G.A.; ZHENG, Y.; BAUM, B. Identification of DNA fingerprints for two-row barley cultivars registered in Canada. **Genome**, 1998.
- PISSARRA, T.B.; CHAVES, G.M.; VENTURA, J.A. Sintomatologia da fusariose (*Fusarium moniliforme* Scheld. var. *subglutinans* Wr.; Rq.) do abacaxizeiro, **Fitopatologia Brasileira**, v.4, p.225-263, 1979.
- PY, C.; LACOEUILHE, J.J.; TEISSON, C. **L'Ananas sa culture, ses produits**. Paris, G. M. Maisoneuve et Larose, 1984.
- QUEIRÓS, W.T. Mapeamento genético do cacauzeiro e identificação de QTLs para resistência à vassoura-de-bruxa. 64p. **Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)**. Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa-MG. 1999.
- RISTERUCCI, A.M.; ESKES, B.; FARGEAS, D.; MOTAMAYOR, J.C.; LANAUD, C. Use of microsatellite markers for germplasm identity analysis in cocoa. In: **Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding, Ingenic**, Malaysia. p.25-33. 2000a.
- RISTERUCCI, A. M.; GRIVET, L.; N'GORAN, J. A. K.; PIERETTI, I.; FLAMENT, M. H.; LANAUD, C. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. **Theor Appl Genet**; n. 101, p. 948-955. 2000b.
- RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; FAIRBANDS, J. D.; ANDERSEN, R. W.; CABRAL, J. R. S. Genetic relationship among four varieties of pineapple, *Ananas comosus*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 3, p. 413-416, 1995.
- SALZANO, F. M. **Biologia, cultura e evolução**. 2.ed. Porto Alegre, editora da Universidade/UFRGS. 1993, 111p.
- SANTOS, B.A. **Resistência do Abacaxizeiro a Fusariose: Análise Molecular do Patógeno e do Hospedeiro**. (Tese de Doutorado). Viçosa. Minas Gerais. 2000.
- SCHUSTER, I. **Identificação de QTL para a resistência ao nematóide de cisto da soja e capacidade de combinação de genitores**. Viçosa: UFV, 85p. Dissertação de Doutorado. 1999.
- SCHUSTER, I.; ABDELNOOR, R.V.; MARIN, S.R.R.; CARVALHO, V.P.; KIIHL, R.A.S.; SILVA, J.F.V.; SEDIYAMA, C.S.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of a new major QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p.91-96, 2001.

- SENAI - RS. **Alimentação: fabricação de geléias e geleadas**. Porto Alegre, 1990. 61p.
- SOUTO, G. F.; MATOS, A. P. Método para avaliar resistência à *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* em abacaxi. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.1, n.2, p.23-30, 1978.
- STAM, P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. **Plant Journal**; v.3, p.739-744, 1993.
- 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.
- SUN, Q.; COLLINS, N. C.; AYLIFFE, M.; SMITH, S.M.; DRAKE, J.; PRYOR, T.; HULBERT, S. H. Recombination between paralogues at the *Rp1* rust resistance locus in maize. **Genetics**, v.158, n.1, p.423-438, 2000.
- TANKSLEY, S. D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v.27, p.205-233, 1993.
- TANSLEY, S.D.; YOUNG, N.D.; PATERSON, A.H. et al. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Bio/Technology**, v.7, p.247-264. 1989.
- TAR'AN, B.; MICHAELS, T.E.; PAULS, K.P. Mapping genetic factors affecting the reaction to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* L. under field conditions. **Theoretical and Applied Genetic**; v.44, p.1046-1056. 2001.
- TAUSSIG, S.J.; BATKIN, S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. **Journal Ethnopharmacology**, Limerick, v. 22, n.2, p.191-203, 1998.
- TINKER, N.A.; FORTIN, M.G.; MATHER, D.E. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. **Theoretical and Applied Genetic**, v.85, p.976-984, 1993.
- USBERTI FILHO, J.A. et al. Inheritance of leaf spininess and segregation of leaf color in pineapple (*Ananas comosus* L.Merrill) **Revista Brasileira de Genética**, Campinas, v.18, n. 4, p. 547-552, 1995.
- VAN DER VEN, W.T.G.; MCNICOL, R.J. Microsatellites as DNA marker in *Stika spruce*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.613-617. 1996.
- VAILLANT, F.; MILLAN, A.; DORNIER, M.; DECLoux, M.; REYNES, M. Strategy for economical optimization of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. **Journal of Food Engineering**, v.48, p.83-90, 2001.
- VENTURA, J.A. **Fusariose do Abacaxizeiro: Caracterização do patógeno, epidemiologia da doença, resistência e micropropagação da hospedeiro *in vitro***. (Tese de Doutorado). Viçosa. Minas Gerais.1996.

VENTURA, J.A.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Resistência de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* ao benomyl em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.328, 1994.

VENTURA, J.A.; ZAMBOLIM, L.; GILBERTSON, R.L. Proposição de nova forma *specialis* em *Fusarium subglutinans* no abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.280, 1993a.

VENTURA, J.A.; ZAMBOLIM, L. & CHAVES, G.M. Integrated management system for pineapple *Fusarium* disease control. **Acta Horticulturae**, v.334, p.439-453, 1993b.

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

YOUNG, N.D.; ZAMIR, D.; GANAL, M.W. e TANKSLEY, S.D. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the *Tm-2a* gene in tomato. **Genetics**, v.120, p.579-585, 1988.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; HANAFEY, M.K.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.C. Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. **Methods in Enzimology**, v.218, p.704-740, 1993.

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

WU, K.K.; BURNQUIST, W.; SORRELLS, M.E.; TEW, T.L.; MOORE, P.H.; TANKSLEY, S.D. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. **Theoretical and Applied Genetics**, v.83, p.294-300, 1992.