



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

MAPEAMENTO DE QTLS E EQTLS ASSOCIADOS À REAÇÃO A “*Candidatus  
Liberibacter asiaticus*” EM *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* E HÍBRIDOS

TATIANY APARECIDA TEIXEIRA SORATTO

Araras  
2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**MAPEAMENTO DE QTLS E EQTLS ASSOCIADOS À REAÇÃO A “*Candidatus  
Liberibacter asiaticus*” EM *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* E HÍBRIDOS**

**TATIANY APARECIDA TEIXEIRA SORATTO**

ORIENTADORA: PROFa. DRa. MARIÂNGELA CRISTOFANI-YALY  
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO GAZAFFI

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Produção  
Vegetal e Bioprocessos Associados  
como requisito parcial à obtenção do  
título de MESTRE EM PRODUÇÃO  
VEGETAL E BIOPROCESSOS  
ASSOCIADOS

Araras

2017

Teixeira Soratto, Tatiany Aparecida

Mapeamento de QTLs e eQTLs associados à reação a “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” em *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* e híbridos / Tatiany Aparecida

Teixeira Soratto. -- 2017.

97 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador: Mariângela Cristofani-Yaly

Banca examinadora: Mariângela Cristofani-Yaly, Luciana Aparecida Carlini Garcia, Lísia Borges Atílio

Bibliografia

1. Patossistema Citros - Huanglongbing (HLB). 2. Expressão Gênica. 3. Mapeamento Genético. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Tatiany Aparecida Teixeira Soratto, realizada em 01/09/2017:

---

Profa. Dra. Mariângela Cristofani-Yaly  
IAC

---

Profa. Dra. Luciana Aparecida Carlini-Garcia  
APTA

---

Profa. Dra. Lísia Borges Atílio  
IAC

## AGRADECIMENTOS

A Deus criador de toda vida, responsável maior por ter conseguido chegar até aqui.

Aos meus pais, Marcos e Izete, pelo exemplo de vida, por serem os responsáveis maiores pela concretização deste curso, pelo apoio incondicional. Ao meu irmão Marcos Bruno pelo carinho.

À minha orientadora Dra. Mariângela Cristofani-Yaly, pela paciência, confiança, amizade e carinho, por todo o conhecimento que tive o privilégio de receber ao longo desses anos e pela imensurável contribuição para a concretização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Dr. Rodrigo Gazaffi, pela paciência, pelos ensinamentos e todo o auxílio na realização dessa pesquisa.

A todos os colegas de trabalhos, em especial Isabela, Henrique, Mariana, Nágela, por toda ajuda, colaboração e amizade; aos colegas de laboratório Inaiara, Francisco, Eduardo, Simone, Diogo, Laís, Cesar e Paulo pelo entretenimento e apoio nos momentos difíceis; à Amanda Bernardi, por dividir todas as angústias e anseios ao longo desses dois anos de curso.

À Maiara Curtolo, pela confiança, amizade e pela imensurável contribuição nas análises de mapeamento; ao Rômulo Lima pela contribuição por tirar minhas dúvidas e por toda à ajuda à distância.

Ao Centro de Ciências Agrárias - UFSCar e ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, pela oportunidade de ser membro discente do Mestrado; ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo (IAC), bem como toda sua equipe de funcionários, em especial ao laboratório de biotecnologia, por colocar a disposição sua infraestrutura, pelo apoio e exemplo de dedicação à pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos; à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Aos professores, que compartilharam seus conhecimentos, experiências e aspirações.

As meninas da república Rabo de Saia e ao Pedro Boraschi, pelas palavras de incentivo, relação de carinho e pelo apoio nos momentos que mais precisei.

A todos os meus amigos da minha cidade natal e meus familiares, pelo amor e carinho.

A todos aqueles que de alguma forma possibilitaram a execução dessa pesquisa, o meu agradecimento e carinho.

## SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iii
RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivo Geral .....	5
2.2. Objetivos Específicos.....	5
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1. <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> : <i>Huanglongbing</i> dos Citros .....	6
3.2. Botânica, genética e melhoramento de citros .....	11
3.3. Mapas genéticos e mapeamento de QTLs .....	14
3.4. Expressão gênica e mapeamento de eQTLs .....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
4.1. Análises comparativas entre os mapas de ligação e o genoma de referência....	20
4.2. Local de Experimentação.....	22
4.3. Material Genético .....	22
4.4. Avaliação Fenotípica.....	23
4.4.1. Detecção e Quantificação da Bactéria por qPCR .....	24
4.4.1.1. Extração de DNA .....	24
4.4.1.2. PCR quantitativo em tempo real (qPCR) .....	24
4.4.1.3. Obtenção da Curva Padrão .....	25
4.4.2. Quantificação de Amido.....	26
4.4.3. Análises dos dados fenotípicos .....	27
4.5. Avaliação da Expressão Gênica .....	28
4.5.1. Extração de RNA e síntese de cDNA .....	30
4.5.2. Análise da Expressão Gênica.....	30
4.5.3. Normalização dos dados de qPCR e análises de expressão gênica.....	31
4.5.4. Análises dos dados de expressão gênica.....	32
4.6. Mapeamento de QTLs e eQTLs.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
5.1. Análises comparativas entre os mapas de ligação e o genoma de referência....	35

5.2. Quantificação da Bactéria (CLas) e de Amido .....	40
5.3. Expressão Gênica.....	47
5.4. Mapeamento de QTLs .....	52
5.5. Mapeamento de eQTLs .....	56
6. CONCLUSÕES .....	66
7. LITERATURA CITADA.....	67
8. APÊNDICE.....	79

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Distribuição do número de marcadores mapeados em cada grupo de ligação.....	21
<b>Tabela 2.</b> Sequências dos iniciadores utilizados para quantificação de CLas. ....	25
<b>Tabela 3.</b> Sequências de iniciadores utilizados em qPCR para análises de expressão gênica. ....	29
<b>Tabela 4.</b> Sintenia dos grupos de ligação com o pseudocromossomo correspondente. ....	36
<b>Tabela 5.</b> Estimativas das variâncias, herdabilidade, coeficientes de variação e médias ajustadas para a quantificação da bactéria (valor de Ct e log do nº de moléculas 16S) e quantificação de amido (grupo controle e inoculado). ....	42
<b>Tabela 6.</b> Estimativas das variâncias genóticas e fenotípicas, herdabilidade e coeficientes de variação para a expressão gênica. ....	48
<b>Tabela 7.</b> Correlações de Pearson para os grupos R (resistente), T (tolerante) e S (suscetível) para os 14 genes candidatos avaliados com os dados fenotípicos, quantificação de CLas (Ct) e quantificação de amido no grupo inoculado. ....	51
<b>Tabela 8.</b> QTLs identificados a partir da quantificação de amido nos grupos controle (Cont.) e inoculado (Inoc.) e da quantificação de CLas (Ct) no mapa do <i>P. trifoliata</i> . ....	54
<b>Tabela 9.</b> QTLs identificados a partir da quantificação de amido nos grupos controle (Cont.) e inoculado (Inoc.) e da quantificação de CLas (Ct) no mapa da <i>C. sunki</i> . ...	55
<b>Tabela 10.</b> eQTLs identificados a partir dos valores de expressão para os genes em estudo no mapa do <i>P. trifoliata</i> . ....	58
<b>Tabela 11.</b> eQTLs identificados a partir dos valores de expressão para os genes em estudo no mapa da <i>C. sunki</i> . ....	59
<b>Tabela 12.</b> Relação dos genes que apresentaram eQTLs sobrepostos e localizados em <i>hotspots</i> para cada grupo de ligação nos dois mapas genéticos construídos para cada genitor. ....	63
<b>Tabela 13.</b> Relação dos genes que apresentaram eQTLs sobrepostos à QTLs para cada grupo de ligação nos dois mapas genéticos construídos para o mapa de cada genitor. Entre parênteses a posição de início em cM. ....	65



<b>Apêndice 1.</b> Divisão dos híbridos e dos genitores em grupos com relação aos valores de quantificação de amido nos grupos Controle e Inoculado, e quantificação de CLas em Ct e log do nº de cópias do 16S (log).....	79
<b>Apêndice 2.</b> Valores de <i>Foldchange</i> corrigido para os 14 genes candidatos na população de híbridos e nos genitores <i>C. sunki</i> (Sun) e <i>P. trifoliata</i> (Trif). Valores menores que um é reprimido e maiores que um induzido.....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> A pirâmide da doença para as doenças das plantas associadas à <i>Candidatus Liberibacter</i> (Retirado e adaptado de WANG et al., 2017). .....	7
<b>Figura 2.</b> Sintomas típicos do huanglongbing em plantas de citros: (A) ramos com folhas amareladas e/ou mosqueadas, (B) folha com sintomas semelhantes à deficiência mineral, nervura da folha espessa e mais clara, manchas irregulares no limbo foliar, alternado gradativamente entre o verde e o amarelo (C) fruto apresentando tamanho reduzido, columela torta, sementes abortadas e amadurecimento e coloração desuniformes e (D) fruto com a casca com pequenas manchas circulares verde-claras que contrastam com o verde normal do fruto. (Retirado e adaptado de FUNDECITRUS, 2017). .....	8
<b>Figura 3.</b> Um modelo de interação entre citros e CLas. Componentes relatados da CLas possivelmente associados aos seus mecanismos de virulência em relação à supressão da imunidade do hospedeiro e à manipulação de sua fisiologia. Os componentes da flagelina induzem bloqueio do plasmodesmo do floema e prejudicam o fluxo de seiva entre as células. Os grãos de amido se acumulam nos cloroplastos em resposta a várias mudanças nas atividades enzimáticas. O ácido salicílico pode ser dividido em catecol por hidroxilases e as espécies reativas de oxigênio são suprimidas pela atividade das peroxidases da bactéria (Retirado e adaptado de DALIO et al., 2017). .....	10
<b>Figura 4.</b> Modo de regulação da expressão gênica inferida pela análise expressão de caracteres quantitativos (eQTLs). (a) a <i>cis</i> -regulação é considerada a causa provável da acumulação observada de mRNA dependente do genótipo, se as posições do eQTLs e do gene corresponderem. (b) Se não o fizerem, o <i>trans</i> - fator codificado por um locus eQTLs (cromossomo 2H) é a causa mais provável das diferenças observadas. (c) se for observado múltiplos eQTLs, com um coincidindo com a localização do gene, pode ser inferida a regulação combinada <i>cis</i> e <i>trans</i> (Adaptado e retirado de: DRUKA et al., 2010). .....	17
<b>Figura 5.</b> Mapas de ligação de <i>P. trifoliata</i> (à esquerda) e <i>C. sunki</i> (à direita), usando a estratégia <i>pseudo-testcross</i> . Os mapas de ligação foram construídos com 2.778 marcadores DarT-Seq™ para <i>C. sunki</i> e 3.084 marcadores DArT-Seq™ para <i>P. trifoliata</i> . .....	21

- Figura 6.** Foto da casa de vegetação com a população de híbridos em delineamento inteiramente casualizado.....23
- Figura 7.** Esquema da montagem da placa para RT-qPCR para a análise de expressão gênica dos 14 genes. Numeração de 1 a 18 representa os híbridos inoculados, e de 1 a 18 cont os respectivos híbridos controles. Trif representa o genitor *P. trifoliata* e Sunki o genitor *C. sunki*. Quatro placas para cada gene foram utilizadas para a população de 72 híbridos. ....33
- Figura 8.** Comparação dos grupos de ligação construídos com o genoma de *C. sinensis*, disponível em: <http://citrus.hzau.edu.cn/orange/>. À esquerda as siglas TLG (TLG1, TLG2, TLG3, TLG4, TLG5, TLG6, TLG7, TLG8a, TLG8b e TLG9) representam os grupos de ligação construídos para o mapa de *P. trifoliata*. Já as abreviações Chr (Chr1, Chr2, Chr3, Chr4, Chr5, Chr6, Chr7, Chr8 e Chr9), à direita, ilustram os cromossomos do genoma de referência utilizado, sendo que Chr *Un* (Chr *unassigned*) é um segmento do genoma onde estão todas as sequências que não foram posicionadas nos pseudocromossomos. E o Chr N representa todas as seqüências que não foram alinhadas no genoma de referência.....37
- Figura 9.** Comparação entre as posições dos marcadores dispostos nos grupos de ligação do mapa de ligação de *P. trifoliata* e dos pseudocromossomos de *C. sinensis* (Chr). Os grupos de ligações estão representados por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8a, 8b e 9, enquanto os Chr1, Chr2, Chr3, Chr4, Chr5, Chr6, Chr7, Chr8 e Chr9 representam os cromossomos do genoma de *C. sinensis*. As linhas na horizontal que ligam os grupos e os cromossomos representam a ordenação e colinearidade dos marcadores ancorados no mapa com as sequências do genoma. ....38
- Figura 10.** Comparação dos grupos de ligação construídos com o genoma de *C. sinensis*, disponível em: <http://citrus.hzau.edu.cn/orange/>. À esquerda as siglas SLG (SLG1, SLG2, SLG3, SLG4, SLG5, SLG6, SLG7, SLG8, SLG9 e SLG10) representam os grupos de ligação construídos para o mapa de *C. sunki*. Já as abreviações Chr (Chr1, Chr2, Chr3, Chr4, Chr5, Chr6, Chr7, Chr8 e Chr9), à direita, ilustram os cromossomos do genoma de referência utilizado, sendo que Chr *Un* (Chr *unassigned*) é um segmento do genoma onde estão todas as sequências que não foram posicionadas nos pseudocromossomos. E o Chr N representa todas as sequências que não foram alinhadas no genoma de referência. ....39
- Figura 11.** Comparação entre as posições dos marcadores dispostos nos grupos de ligação do mapa de ligação de *C. sunki* e dos pseudocromossomos de *C. sinensis*

(Chr). Os grupos de ligações estão representados por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, enquanto os Chr1, Chr2, Chr3, Chr4, Chr5, Chr6, Chr7, Chr8 e Chr9 representam os cromossomos do genoma de *C. sinensis*. As linhas na horizontal que ligam os grupos e os cromossomos representam a ordenação e colinearidade dos marcadores ancorados no mapa com as sequências do genoma. ....40

**Figura 12.** Histogramas das médias: à esquerda, quantificação de amido no grupo inoculado (mg de glicose/g de peso seco) e à direita, quantificação de CLas (valores de Ct). Em vermelho, o genitor feminino (*C. sunki*) e em verde, o genitor masculino (*P. trifoliata*). ....42

**Figura 13.** Coeficientes de correlação e dispersão dos dados fenotípicos para a quantificação de bactérias (Ct e log) e quantificação de amido (Inoculado e Inoc.cont) (\* valor de  $p < 0,001$ ). ....43

**Figura 14.** Biplot dos componentes principais (PC). Para a quantificação de CLas têm-se os valores de Ct (Ct) e o log do nº de cópias do 16S de CLas (log). Para a quantificação de amido mostra-se o grupo inoculado (Inoculado) e o grupo Inoculado corrigido pelo controle (Ino-cont). ....45

**Figura 15.** *Heatmap* do perfil de expressão gênica global pela análise de agrupamento entre os 14 genes-alvo avaliados com os 74 genótipos selecionados (72 híbridos, mais os genitores: *P. trifoliata* (Trif) e *C. sunki* (Sunki)). ....49

**Figura 16.** Em azul, QTLs associados à quantificação da bactéria (Ct), em vermelho, QTLs associado à quantificação de amido no grupo inoculado e em preto no grupo controle. No eixo Y estão os valores de LOD e no X os grupos de ligação do mapa de *P. trifoliata* (TLG1, TLG2, TLG3, TLG4, TLG5, TLG6, TLG7, TLG8a, TLG8b e TLG9). As linhas horizontais são os valores de LOD definidos pelo teste de permutação com 5% de significância. ....55

**Figura 17.** Em azul, QTLs associados à quantificação da bactéria (Ct), em vermelho, QTLs associado à quantificação de amido no grupo inoculado e em preto no grupo controle. No eixo Y estão os valores de LOD e no X os grupos de ligação do mapa de *C. sunki* (SLG3, SLG4, SLG5, SLG6, SLG7 e SLG8). As linhas horizontais são os valores de LOD definidos pelo teste de permutação com 5% de significância. ....56

**Figura 18.** Distribuição do número de eQTLs detectados para cada gene candidato com relação aos mapas dos genitores. ....57

**Figura 19.** Distribuição dos eQTLs no mapa genético de *P. trifoliata* relacionados ao processo de expressão gênica dos genes estudados. No eixo y encontram-se os valores de LOD e no eixo x o mapa de ligação de *P. trifoliata*. .....60

**Figura 20.** Distribuição dos eQTLs no mapa genético de *C. sunki* relacionados ao processo de expressão gênica dos genes estudados. No eixo y encontram-se os valores de LOD e no eixo x o mapa de ligação de *C. sunki*. .....61

## **MAPEAMENTO DE QTLs E EQTLs ASSOCIADOS À REAÇÃO À “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” EM *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* E HÍBRIDOS**

**Autor: TATIANY APARECIDA TEIXEIRA SORATTO**

**Orientador: Profa. Dra. MARIÂNGELA CRISTOFANI-YALY**

**Co-orientador: Prof. Dr. RODRIGO GAZAFFI**

### **RESUMO**

O Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC vem realizando um amplo programa de melhoramento genético de citros via cruzamentos dirigidos. Em um estudo prévio com o patossistema Citros-*huanglongbing* (HLB) realizado pelo nosso grupo, utilizando uma população obtida por hibridação controlada entre *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*, foram verificadas diferenças na multiplicação da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), agente causal do HLB, tanto nos genitores quanto na progênie. A taxa de infecção e a concentração de bactéria foi maior em *Citrus sunki* em relação ao *P. trifoliata*. Assim, é importante aprofundar os estudos com esses gêneros e seus híbridos para ampliar o conhecimento de quais mecanismos poderiam estar envolvidos na tolerância ao HLB, considerada a mais importante doença dos citros atualmente. O objetivo do trabalho foi estabelecer sintenia entre os grupos de ligação dos mapas de *C. sunki* e *P. trifoliata* com o genoma de *Citrus sinensis* e mapear regiões genômicas associadas à tolerância a CLAs por meio de análise fenotípica (QTLs) e de expressão gênica (eQTLs). Com a análise comparativa entre mapas e genoma, foi observado que todos os grupos de ligação apresentaram sintenia com pseudocromossomos do genoma de referência utilizado, com exceção do grupo de ligação 10 do mapa da *C. sunki*. Para os dados fenotípicos foi utilizada uma população de 79 híbridos F<sub>1</sub> entre *C. sunki* e *P. trifoliata*, sendo avaliada a quantificação da bactéria e acúmulo de amido nas folhas após dois anos da inoculação com o patógeno. Com a análise estatística utilizando modelo misto foi possível agrupar os híbridos em resistentes, tolerantes e suscetíveis, sendo importante a validação desses dados em campo. A análise de expressão de 14 genes candidatos relacionados ao HLB foi realizada em 72 híbridos da população e utilizados como dados de expressão para o mapeamento de eQTLs. Foram encontrados nove QTLs e 52 eQTLs no mapa do genitor *C. sunki* enquanto no mapa do genitor *P. trifoliata* foram encontrados 17 QTLs e 40 eQTLs. A sobreposição de eQTLs da grande maioria dos genes com QTLs dos dados fenotípicos, indicam que os genes têm relação com o fenótipo e que provavelmente são responsivos à infecção do patógeno.

## **MAPPING OF QTLS AND EQTLS ASSOCIATED TO REACTION TO "*Candidatus* Liberibacter asiaticus" IN *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* AND HYBRIDS**

**Author: TATIANY APARECIDA TEIXEIRA SORATTO**

**Adviser: Profa. Dra. MARIÂNGELA CRISTOFANI-YALY**

**Co-adviser: Prof. Dr. RODRIGO GAZAFFI**

### **ABSTRACT**

The Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC has been conducting an extensive breeding program of citrus via directed crosses. In a previous study with Citrus-huanglongbing pathosystem (HLB) held in our group, using a population obtained by hybridization between *Citrus sunki* and *Poncirus trifoliata*, differences were found in the multiplication of the bacterium *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLas), the causal agent of HLB, in the parents and in the progeny. It was observed that the rate of infection and bacterial concentration was higher in *C. sunki* than in *P. trifoliata*. Thus, it is important to deepen the studies with this genus and hybrids to increase knowledge of which mechanisms could be involved in the tolerance to HLB, considered the most important disease of citrus currently. In this sense, the objective of this study was to establish synteny between the linkage groups of the *C. sunki* and *P. trifoliata* maps with the genome of *Citrus sinensis* and to map genomic regions associated to tolerance CLas bacterium through phenotypic analysis (QTLs) and gene expression (eQTLs). With the comparative analysis between maps and genome, it was observed that all the linkage groups showed synteny with reference genome chromosomes used, with the exception of the linkage group 10 of the *C. sunki* map. For the phenotypic data, a population of 79 F<sub>1</sub> hybrids between *C. sunki* and *P. trifoliata* was used. The quantification of the bacterium and accumulation of starch in the leaves were evaluated after two years of inoculation with the pathogen. Through the statistical analysis of the mixed model it was possible to group the hybrids into resistant, tolerant and susceptible, being important the validation of these data in the field. The expression of 14 candidate genes related to HLB was performed in 72 hybrids of the population and used as expression data for the mapping of eQTLs. It was possible to locate nine QTLs and 52 eQTLs on the *C. sunki* genitor map and 17 QTLs and 40 eQTLs were found on the *P. trifoliata* genitor map. The overlapping eQTLs of the majority genes of QTL (phenotypic data) indicates that the genes are related to the phenotype and are probably responsive to the pathogen infection.

## 1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira é uma importante cadeia produtiva do agronegócio do país, por se mostrar um setor organizado e competitivo. Estima-se que a produção mundial de frutas cítricas supere os 90 milhões de toneladas anuais (USDA, 2015), sendo o Brasil o segundo maior produtor com quase 20 milhões de toneladas da fruta, superado apenas pela China (FAO, 2015). A produção está concentrada principalmente na região sudeste, com destaque para o cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo Mineiro e deverá ser de 364,47 milhões de caixas de laranja de 40,8 kg em 2017/18 (FUNDECITRUS, 2017).

Pragas e doenças são os principais fatores limitantes da atividade econômica da industrialização da citricultura nacional. Essa vulnerabilidade decorre de uma estreita base genética ocasionada pela adoção de um sistema de produção considerado monocultural, em que um número reduzido de variedades é cultivado em grandes extensões de terra (BOSCARIOL-CAMARGO et al., 2010). Mesmo o gênero *Citrus* apresentando uma grande diversidade de espécies, apenas um pequeno número é utilizado comercialmente (MACHADO, 2005). Segundo o Fundecitrus (2017), dentre as principais doenças que afetam a citricultura brasileira destacam-se: a pinta preta, a clorose variegada dos citros (CVC), a leprose, a tristeza, a morte súbita (MSC), o cancro cítrico e, o *huanglongbing* (HLB) ou *greening*. Sendo que, as duas últimas estão em ampla disseminação no parque



citrícola e são as que mais preocupam a cadeia produtiva deste agronegócio (FUNDECITRUS, 2017).

O HLB, embora seja a doença de relato mais recente em São Paulo (COLETTA-FILHO et al., 2004), é sem dúvidas a que mais tem desafiado o setor (produção, extensão e pesquisa) em face da rápida disseminação e severidade. Em 2008, 0,61% das árvores da cultura eram sintomáticas, em 2016 esse número aumentou para 16,92% (FUNDECITRUS, 2017). O progresso do HLB em pomares de 8 a 12 anos é rápido, em quatro anos de avaliação 50% das copas apresentaram sintomas da doença, com aproximadamente 60% de queda na produção (FUNDECITRUS, 2017).

O controle de HLB depende de exclusão do patógeno de uma área produtora de citros com utilização de material de propagação livre da doença, redução da fonte de inóculo por meio da remoção das árvores infectadas, assim que detectadas, e controle de vetores (psílídeos) com uso de inseticidas, ou de agentes biológicos (FAN et al., 2013), práticas que correspondem de 5 a 10% do custo de produção da cultura (FUNDECITRUS, 2017). A busca por tolerância ao patógeno tornou-se imprescindível, porém até o momento, não há nenhuma fonte de resistência, entre as espécies do gênero *Citrus*, que possa ser utilizada no controle dessa doença, o que restringe, por ora, a utilização do controle genético.

O HLB afeta todas as variedades cítricas de importância comercial, incluindo laranjas, pomelos e tangerinas (BOVÉ, 2006; FOLIMONOVA et al., 2009). Observações em campo mostraram que algumas cultivares cítricas são mais tolerantes ao HLB do que outras (HALBERT; MANJUNATH, 2004). Stover et al. (2016), observaram que algumas combinações de copa/porta-enxerto de híbridos de tangerina, mesmo com título da bactéria, continuaram se desenvolvendo e produzindo frutos, o que sugere tolerância dessas variedades à bactéria.

Verificaram-se que algumas cultivares de citros da Malásia apresentaram-se mais tolerantes ao patógeno (SHOKROLLAH et al., 2009). Estudos demonstraram que os trifoliatas têm maior tolerância ao HLB do que outros grupos cítricos (BOSCARIOL-CAMARGO et al., 2010; FOLIMONOVA et al., 2009; ALBRECHT; BOWMAN, 2011, 2012; BOAVA et al., 2015, 2017). Segundo estudos, os psílídeos apresentam menor preferência a cultivares de *Poncirus trifoliata* resultando em plantas expostas a menor quantidade de inóculo (HALL et al., 2015; RICHARDSON; HALL, 2014).

Com o monitoramento da população bacteriana, por meio de PCR quantitativo (qPCR), observou-se resposta diferencial de genótipos de citros e gêneros afins ao patógeno (BOSCARIOL-CAMARGO et al., 2010). De acordo com os autores, foi possível confirmar que a multiplicação da bactéria é uma característica contrastante entre as espécies de citros e gêneros próximos, sendo reduzida em lima da Pérsia, *Poncirus* e *Atalantia*, sugerindo que essas espécies possam apresentar maior tolerância à bactéria do HLB.

Em um estudo sobre patossistema Citros-HLB, utilizando uma população obtida do cruzamento entre *C. sunki* e *P. trifoliata*, verificou-se diferença na multiplicação da bactéria tanto nos genitores quanto na progênie (MARENGO, 2009; BOAVA et al., 2015, 2017). Os resultados obtidos por qPCR indicaram diferenças na multiplicação da bactéria entre as duas espécies estudadas. Após 240 dias da inoculação do patógeno, verificou-se que a taxa de infecção foi maior em *C. sunki* do que em *P. trifoliata*, além de uma grande variação entre os híbridos avaliados. Observações de sintomas também foram realizadas e esses levantamentos permitiram a distinção de híbridos contrastantes quanto à tolerância ao HLB (MARENGO, 2009). Assim, é importante aprofundar os estudos com esses gêneros e seus híbridos para entender quais mecanismos poderiam estar envolvidos na tolerância ao HLB.

As características agrônômicas como tolerância a doenças, geralmente são controladas pela ação de múltiplos locos, responsáveis por pequenos efeitos no fenótipo, o que ocasiona uma variação contínua dada pela própria segregação genotípica. Por esse motivo, os chamados QTLs (*Quantitative Trait Loci*) têm sido bastante estudados em programas de melhoramento genético a fim de associá-los a mapas genéticos, os quais permitem fazer correlações fenotípicas confiáveis a partir da genotipagem de uma progênie (COLLARD et al., 2005; TOLEDO et al., 2008; MACKAY, 2009).

A genética genômica surge como uma técnica que engloba o mapeamento de locos quantitativos e análises de expressão gênica para identificar a associação entre o estado alélico de uma região do genoma e a quantificação dos transcritos gênicos (JANSEN; NAP, 2001). Tais regiões genômicas são denominadas como QTLs de expressão (eQTLs), e permitem que se mensure a variação da expressão gênica entre populações de indivíduos segregantes, determinando uma região cromossômica que atua no processo de expressão de um gene para uma dada

característica (SCHADT et al., 2003). Sendo assim, o estudo de eQTLs é de grande importância para o entendimento da interação patógeno-hospedeiro, a fim de compreender os mecanismos de resposta às doenças.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Estabelecer sintonia entre os grupos de ligação dos mapas de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata* com o genoma de *Citrus sinensis* e mapear regiões genômicas associadas à tolerância a *C. Liberibacter asiaticus* por meio de análise fenotípica (QTLs) e de expressão gênica (eQTLs).

### 2.2. Objetivos Específicos

1. Estudar a sintonia a partir da análise comparativa entre os mapas de ligação de *C. sunki* e *P. trifoliata* e o genoma de referência de *C. sinensis*;
2. Detectar e quantificar a bactéria *C. Liberibacter asiaticus* nos híbridos de *C. sunki* e *P. trifoliata*;
3. Quantificar o acúmulo de amido e sacarose nas folhas dos híbridos;
4. Analisar a expressão de genes candidatos relacionados à resistência à *C. Liberibacter asiaticus*;
5. Identificar QTLs e eQTLs a partir da análise da quantificação da bactéria, do amido e da expressão gênica nos mapas de ligação de *C. sunki* e *P. trifoliata*.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. *Candidatus Liberibacter asiaticus*: *Huanglongbing* dos Citros

O HLB foi observado pela primeira vez na China no final de 1800 e foi confirmado na Índia em 1967, com uma transmissão bem sucedida da doença obtida pelo do inseto vetor (GHOSH et al., 2015). Está distribuída na maioria dos países asiáticos, africanos e alguns países americanos, levando a expressivas perdas econômicas na produção dos citros (GOTTWALD, 2007). Foi detectada no Brasil, no estado de São Paulo, em 2004 (COLETTA-FILHO et al., 2004) e na Flórida, Estados Unidos, em 2005 (HALBERT, 2005).

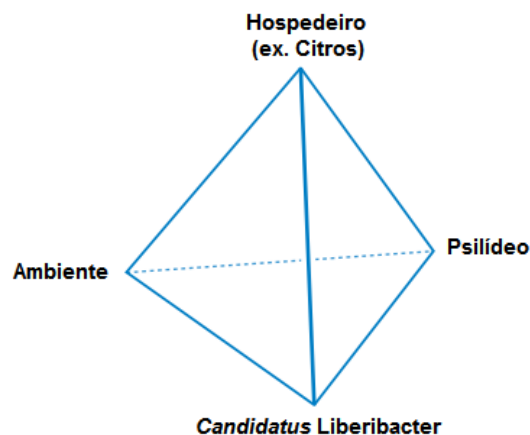
O HLB é causado pela bactéria fastidiosa, Gram-negativa (GARNIER et al., 1984), de ocorrência restrita aos vasos crivados do floema, chamada *Candidatus Liberibacter* spp., uma  $\alpha$ -proteobacteria da ordem Rhizobiales e família Rhizobiaceae. Nenhum método eficiente de cultivo foi encontrado para isolar a bactéria até o momento, permanecendo no status de 'Candidatus' (FLEITES et al., 2014).

Existem três diferentes espécies de *Liberibacter* que estão associadas com a doença: "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" (CLas) encontrada na Ásia e América, "*Candidatus Liberibacter africanus*" na África e "*Candidatus Liberibacter americanus*", na América. Entre as três *Liberibacters* conhecidas que causam a doença HLB, a CLas é a mais difundida e é a responsável pelo aumento das perdas

econômicas na produção de citros nos últimos anos. Em 2004, quando o HLB foi relatado pela primeira vez no estado de São Paulo, a espécie principal de *Liberibacter* com mais do que 95% de árvores de HLB sintomáticas testadas estava infectado pela "*Ca. L. americanus*". Em 2008, a situação se inverteu, e as árvores mais sintomáticas testadas se encontravam infectadas com CLas (LOPES et al., 2009).

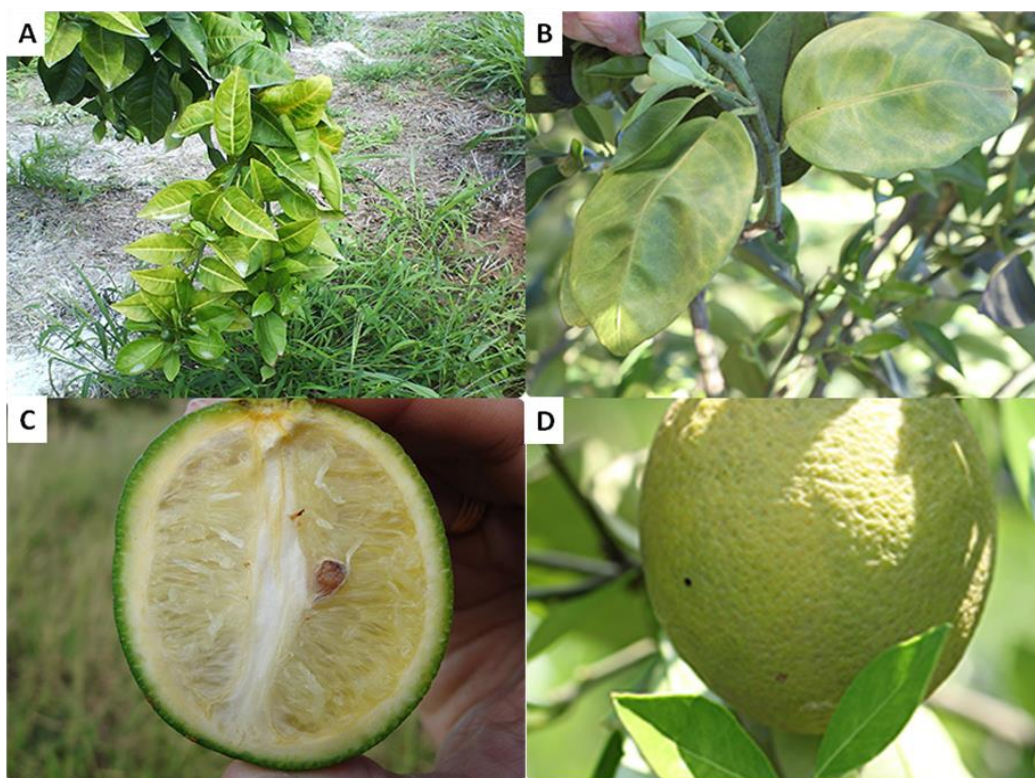
A doença pode ser disseminada de duas formas: transmissão da bactéria de plantas infectadas para plantas saudas por inseto vetor, um psílídeo (*Diaphorina citri* ou *Trioza eritreae*), bem como por propagação de tecidos de citros infectados (BOVÉ, 2006). A bactéria é transmitida pelos psílídeos *Diaphorina citri* na maioria das regiões de crescimento dos citros, e pela *Trioza eritreae* na África. Ambas as espécies de psílídeos podem transmitir todas as espécies de *Liberibacter* e são atraídos por voláteis emitidos a partir de brotações novas (PATT; SÉTAMOU, 2010).

Dessa forma, segundo Wang et al. (2017) o HLB não depende apenas do triângulo da doença, convergência temporal e espacial de um patógeno virulento, hospedeiro suscetível e ambiente propício à doença. E sim, os resultados epidemiológicos da doença são determinados pela forma como vários fatores ambientais afetam as interações das plantas-bactéria-psílídeo coletivamente e, assim, são melhores descritos por uma pirâmide da doença, com o vetor como componente obrigatório adicional (Figura 1). A dependência de *Liberibacter* a um vetor (inseto) móvel complica dramaticamente a epidemiologia e o gerenciamento da doença (WANG et al., 2017).



**Figura 1.** A pirâmide da doença para as doenças das plantas associadas à *Candidatus Liberibacter* (Retirado e adaptado de WANG et al., 2017).

Os sintomas em plantas com HLB iniciam-se de forma setorizada e sempre ocorrem em ramos com fluxos vegetativos recentes. Inicialmente há o aparecimento de brotações amareladas seguindo-se do mosqueamento assimétrico, evoluindo gradativamente para uma completa clorose da folha. O limbo foliar das folhas sintomáticas pode se tornar mais espesso, juntamente com o aumento espessura da nervura central. Com relação aos frutos, o sintoma mais característico é a assimetria do eixo central do fruto, e também ocorrência de sementes abortadas, inversão da coloração do fruto que se inicia pelo pedúnculo, aumento da acidez e queda dos mesmos, com reflexos negativos na produção e baixa qualidade do fruto e do suco (Figura 2) (BRLANSKY et al., 2009).



**Figura 2.** Sintomas típicos do huanglongbing em plantas de citros: (A) ramos com folhas amareladas e/ou mosqueadas, (B) folha com sintomas semelhantes à deficiência mineral, nervura da folha espessa e mais clara, manchas irregulares no limbo foliar, alternado gradativamente entre o verde e o amarelo (C) fruto apresentando tamanho reduzido, columela torta, sementes abortadas e amadurecimento e coloração desuniformes e (D) fruto com a casca com pequenas manchas circulares verde-claras que contrastam com o verde normal do fruto. (Retirado e adaptado de FUNDECITRUS, 2017).

Até agora, nenhum mecanismo conclusivo de patogenicidade de CLas foi identificado (DA GRAÇA et al., 2016). Disfunção do floema parece ser a principal alteração que pode determinar o surgimento de outros sintomas (KOH et al., 2012). Uma das principais alterações anatômicas observadas em tecidos com a bactéria do HLB é a formação e deposição de alta quantidade de calose aparentemente bloqueando os poros da placa crivada dos elementos de vasos do floema (MACHADO et al., 2010), o que pode interromper a distribuição de fotoassimilados ao longo do sistema, causando acumulação excessiva de amido nos cloroplastos das folhas (KOH et al., 2012). Outros fatores, como a acumulação de proteína de floema (PP2) nas placas crivadas e o colapso das células do floema podem contribuir para a disfunção do floema (Figura 3) (KIM et al., 2009).

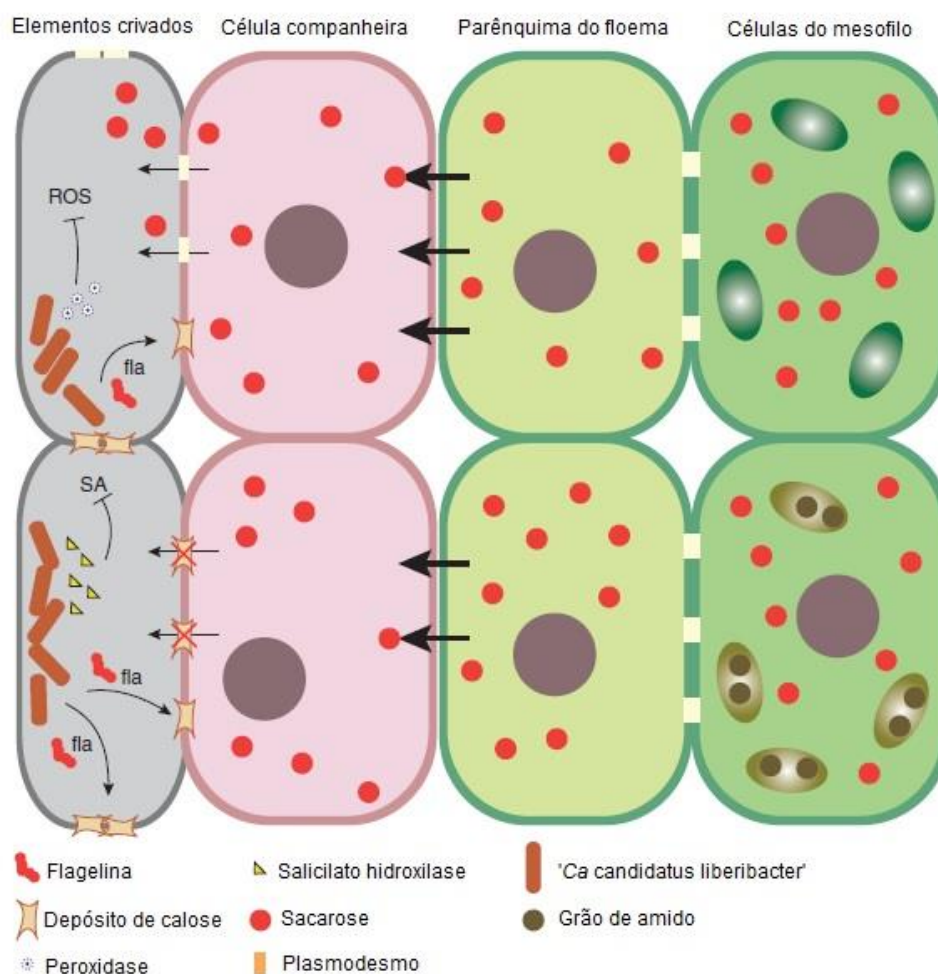
Assim como ocorre para outras bactérias de floema, o mecanismo de patogenicidade das bactérias do HLB estaria associado à indução de distúrbios metabólicos no hospedeiro, provavelmente, em resposta a produtos da bactéria, levando ao desequilíbrio no metabolismo de carboidratos. Tem sido demonstrado que folhas sintomáticas acumulam quantidades excessivas de amido. A retenção de amido e de sacarose em folhas de citros infectados sugere prejuízo na exportação de fotoassimilados (KIM et al., 2009). Segundo Kim et al. (2009), as consequências deste bloqueio são: deficiências nutricionais, prejudicando o crescimento das plantas, maturação dos frutos e o desenvolvimento de sementes nas plantas afetadas.

Por se encontrar nos vasos do floema, a bactéria pode se distribuir por toda a planta: nervuras da folha, raízes, tecidos florais (pétalas, pistilos e estames) e tecidos do fruto, porém, essa distribuição ocorre de forma desigual, dificultando a diagnose da doença. Para o diagnóstico da doença, utilizam-se do PCR em tempo real (qPCR), pois este método permite detecções mais sensíveis, além de permitir a quantificação do patógeno (SCHAAD; FREDERICK, 2002).

Existem várias pesquisas que foram desenvolvidas com qPCR para estimar o título de *Liberibacter* na planta. Segundo Li et al. (2006), é possível detectar e quantificar por qPCR as três espécies de *Liberibacter* que afetam os citros (*africanus*, *asiaticus* e *americanus*). Wang et al. (2006) desenvolveram uma análise de qPCR que detectou CLas e um método de estimar o número de cópias do gene de *Liberibacter* como um método indireto de medir a população da bactéria na planta. Este mesmo grupo de pesquisa desenvolveu um modelo de análise com



qPCR, com base no sistema TaqMan e sequências genômicas do rDNA 16S de CLas, que podem ser aplicados a outros patógenos (CARLOS et al., 2006). A técnica do qPCR, além do ganho em sensibilidade e especificidade, tem possibilitado o aumento de informações quanto à concentração de CLas na amostra analisada.



**Figura 3.** Um modelo de interação entre citros e CLas. Componentes relatados da CLas possivelmente associados aos seus mecanismos de virulência em relação à supressão da imunidade do hospedeiro e à manipulação de sua fisiologia. Os componentes da flagelina induzem bloqueio do plasmodesmo do floema e prejudicam o fluxo de seiva entre as células. Os grãos de amido se acumulam nos cloroplastos em resposta a várias mudanças nas atividades enzimáticas. O ácido salicílico pode ser dividido em catecol por hidroxilases e as espécies reativas de oxigênio são suprimidas pela atividade das peroxidases da bactéria (Retirado e adaptado de DALIO et al., 2017).

### 3.2. Botânica, genética e melhoramento de citros

Devido à grande diversidade encontrada entre plantas, as frutas cítricas possuem taxonomia muito complexa, o que ainda gera muita controvérsia no que diz respeito à classificação botânica. O termo Citros é utilizado para todas as espécies sexualmente compatíveis da família Rutaceae: *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* (CUNHA et al., 2013). A maioria das espécies desses três gêneros é diploide, com  $2n=18$  cromossomos em células somáticas e possui um genoma relativamente pequeno cerca de 367 Mb (XU et al., 2012). São originários principalmente das regiões subtropicais e tropicais do sul e sudeste da Ásia, incluindo áreas da Austrália e África. Foram levados para a Europa na época das Cruzadas e chegaram ao Brasil trazidos pelos portugueses, no século XVI (QUEIROZ et al., 1999).

O gênero *Poncirus* é monoespecífico (*P. trifoliata*) e desempenha um papel central na obtenção de porta-enxertos, uma vez que possui tolerância a muitos fatores bióticos como resistência a baixas temperaturas. Outro fator característico desse gênero corresponde à formação de plantas com pequeno tamanho e ao mesmo tempo, produção de frutos com alta qualidade (POMPEU JUNIOR; BLUMER, 2014).

O gênero *Fortunella* inclui algumas cultivares como os Kumquats (TADEO et al., 2008). Seus frutos são aromáticos, pequenos, com cerca de 2,5 cm de diâmetro, produzidos em abundância. São de formato oval, superfície lisa e coloração amarelo-ouro a laranja avermelhada. Tem sabor adocicado, mas moderadamente ácido. São as espécies cítricas mais resistentes ao frio (MAZZINI; PIO, 2010).

Já o gênero *Citrus* apresenta maior importância econômica por conter a maioria das espécies consumidas no mundo, e conseqüentemente é o que levanta maiores discussões com relação a sua classificação, uma vez que diferentes critérios são utilizados por diversos sistemas de taxonomia, gerando principalmente uma divergência no número de espécies verdadeiras que compõe esse gênero (BASTIANEL et al., 2001). Alguns autores afirmam, por exemplo, que muitos biótipos existentes classificados como espécies podem ser o resultado de hibridações interespecíficas, preservadas ao longo do tempo por meio da embrionia nucelar, possibilitando um isolamento reprodutivo destas novas combinações (CAMERON; FROST, 1968).

Considerando que a maioria das variedades cítricas comerciais atuais surgiu em decorrência de algum tipo de mutação natural, pode-se dizer que essas deram origem aos primeiros processos de melhoramento genético da cultura. Práticas utilizadas, como a enxertia e a estaquia, e a característica de embrionia nucelar da cultura, facilitaram o acúmulo e a conservação dessas mutações (EMBRAPA, 1998). Exemplos de laranjas doces que se originaram dessa forma incluem a 'Shamouti', de grande importância em Israel, provavelmente derivada de uma mutação de gema da laranja 'Beladi', as Laranjas sanguíneas como a 'Maltese', que surgiram na região Mediterrânea e a laranja 'Bahia' (de umbigo) que foi encontrada no Brasil, no Bairro do Cabula, Salvador, Bahia, como variação de ramo da laranja 'Seleta', cabendo destacar que, no grupo das laranjas de umbigo e 'Valência', muitas variedades têm sido selecionadas a partir de mutações somáticas em gemas ou ramos (NISHIURA, 1965).

Posteriormente, surgiram programas de melhoramento que utilizam a variabilidade genética existente nos gêneros de citros para a obtenção de híbridos de interesse com uso de cruzamentos controlados. Tais programas de melhoramento podem estar voltados tanto para o melhoramento da copa quanto do porta-enxerto, sendo esse primeiro bastante restrito e visando o aumento na performance da árvore principalmente em termos de produtividade, tolerância ao frio, adaptação a colheita mecânica e também a resistência a pragas e doenças (KHAN, 2007).

Os programas de melhoramento de porta-enxertos são mais comuns e por muito tempo se restringiam basicamente ao melhoramento do limão 'Cravo', que liderava as preferências devido a sua precocidade e a alta produtividade conferida à variedade-copa nele enxertada, além de sua tolerância à seca e à Tristeza (CTV). Apesar disso, a susceptibilidade à Morte Súbita dos Citros (MSC) fez com que os programas de melhoramento passassem a focar em porta-enxertos que o substituíssem a partir do surgimento e expansão da doença (CRISTOFANI et al., 2005).

Com esse cenário, foi necessário ter maior heterogeneidade de porta-enxertos para a citricultura, a partir de esforços de enxertia principalmente com a tangerina Cléopatra (*C. reshni* Hort. ex Tan.), o citrumelo Swingle [*C. paradisi* Macfad. cv. Duncan x *P. trifoliata* (L.) Raf.] e a tangerina Sunki [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tan.] (SCHINOR et al., 2011). Assim, a tangerina Sunki (*C. sunki* Hort. ex

Tan.), mostrou-se bastante indicada como porta-enxerto para copas cítricas por não apresentar problemas de incompatibilidade, apresentando diversos caracteres agrônômicos desejáveis, como vigor, boa produtividade de frutos, resistência a diversas doenças citrícolas (CTV, declínio dos citros, MSC, entre outras) e tolerância a fatores abióticos (salinidade e seca) (SCHINOR et al., 2011).

Segundo Lima (2016), existem diversos programas de melhoramento genético de porta-enxertos dos citros espalhados pelo Brasil, com destaques ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira, em Cordeirópolis-SP, à Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, em Cruz das Almas-BA, à Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), em Taquarí-RS, e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre-RS. Nesses programas, hibridações controladas têm sido conduzidas e como resultado, foram obtidos diversos porta-enxertos utilizados pela citricultura brasileira, como as tangerineiras, os citrangeiros (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) e os citrandarins (*C. reticulata* x *P. trifoliata*), dentre outros (OLIVEIRA, 2008).

O avanço genético via técnicas clássicas de melhoramento é dificultado pela baixa variabilidade genética existente entre os diferentes representantes do grupo de citros (laranjas doce e azeda, limas ácida e doce, limões e tangerinas, entre outros), determinado pela estreita origem genética destas espécies (SOUZA, 2012). Wu et al. (2014) realizaram um estudo comparativo entre o genoma de variedades do gênero *Citrus* (tangerina, toranja, laranja doce, laranja azeda e Clementina) e concluíram que essas variedades derivam de apenas duas espécies progenitoras.

Outro fator limitante para citros é o longo período de juvenilidade, proporcionado pela propagação por sementes, que retarda o início da floração e conseqüentemente a formação dos frutos, tornando a obtenção de novos híbridos, em cruzamentos dirigidos, demorada (PASQUAL et al., 2015). Esse processo varia de acordo com a espécie podendo chegar a 13 anos (MACHADO et al., 2005).

O melhoramento genético de citros buscam-se genitores contrastantes, para a realização de cruzamentos interespecíficos com o objetivo de obter híbridos, que contribuirão para a ampliação da variabilidade genética (BERED, 1997; VALLE, 2002), prática essa realizada em programas de melhoramento genético como do Centro APTA Citros Sylvio Moreira, o qual investe cada vez mais em pesquisa e na produção de porta-enxertos alternativos para a citricultura.

### 3.3. Mapas genéticos e mapeamento de QTLs

Os mapas genéticos baseados na frequência de recombinação entre marcadores polimórficos em uma progênie tornaram-se ferramentas fundamentais para acelerar o processo de seleção de marcadores associados a caracteres quantitativos (DANAN et al., 2011). O mapeamento de QTLs visa encontrar associações entre os marcadores mapeados e as observações das características fenotípicas, principalmente de natureza quantitativa. A associação entre marcadores e características fenotípicas pode ser realizada de várias maneiras. Duas abordagens comumente usadas são: a) análise de ligação utilizando uma população de mapeamento bi-parental segregando para a(s) característica(s) de interesse, ou b) análises de associação, que podem ser realizadas em populações naturais, coleções de germoplasma, conjunto de materiais elite, entre outros.

Por ser uma espécie perene, o tipo de população utilizada para a construção dos mapas em citros é principalmente  $F_1$ , porém, também, é utilizado retrocruzamento. A maioria dos estudos de mapeamento de QTLs focou na resistência/tolerância a doença em porta-enxertos.

As estratégias de mapeamento utilizadas nos mapas em citros são o *pseudo-testcross* e a construção de mapas integrados. Segundo Souza et al. (2013), tradicionalmente, a construção de mapas genéticos de populações  $F_1$ , envolvem a estratégia *pseudo-testcross*, em que são construídos dois mapas, uma para cada genitor, e apenas marcadores que segregam na proporção de 1:1 são considerados. Com modernas tecnologias de marcadores disponíveis para populações  $F_1$ , que segregam em 3:1 (dominantes), 1:2:1 (codominantes), e 1:1:1:1 (codominantes), para além de 1:1, podem ser usados para integrar mapas de ligação individuais (SOUZA et al., 2013).

A maioria das características de interesse da cultura é controlada por locos quantitativos, sendo que seu estudo permite a identificação, mapeamento e quantificação de seus efeitos. Fatores como o número e a frequência de recombinação dos QTLs, magnitude dos seus efeitos, características como herdabilidade, interações entre genes, tipos de marcadores e grau de saturação do mapa genético, influenciam a detecção dessas regiões (SOUZA et al., 2012).

Em várias culturas perenes, o mapeamento de QTLs tem favorecido e ajudado no melhoramento genético. Em citros, existem vários estudos de

mapeamento, a maioria para identificar QTLs ligados à resistência/tolerância a doenças, tais como a tristeza dos citros (GMITTER et al., 1996; DENG et al., 1997; FANG et al., 1998; CRISTOFANI et al., 1999), à *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros (CVC) (OLIVEIRA et al., 2004), à mancha marrom de alternaria (DALKILIC et al., 2005), à gomose de *Phytophthora* (SIVIERO et al., 2006) e de resistência à leprose (BASTIANEL et al., 2009). Além de características como a apomixia (GARCÍA et al., 1999), resistência ou susceptibilidade ao frio (CAI et al., 1994; MOORE et al., 2000) juvenilidade (RAGA et al., 2012), vigor e acidez da fruta (GMITTER et al., 1996), peso, tamanho de frutos e número de sementes (GARCÍA et al., 2000) e o mais recente mapeou características de qualidade de fruto (CURTOLO et al., 2017).

Além do estudo e da localização dos QTLs e da determinação de seus efeitos, é interessante considerar que o desenvolvimento de um mapa genético permite estudos em várias outras áreas como, por exemplo, o esclarecimento da estrutura do genoma, a clonagem de genes de interesse e os estudos de sintenia (LIU, 1997).

O cruzamento das informações obtidas com o mapeamento genético tradicional e com o mapeamento físico do genoma deve facilitar a caracterização de genes e de regiões do genoma críticas para a expressão fenotípica, dando subsídios para a clonagem de blocos de genes desejáveis (ROCHA et al., 2003). Tais estudos, associados à sintenia entre as espécies, podem facilitar o entendimento de muitos processos fisiológicos e de diferenças entre espécies, fornecendo a base teórica para a seleção e manipulação genética.

### **3.4. Expressão gênica e mapeamento de eQTLs**

QTLs de expressão são regiões genéticas identificadas pela aplicação de métodos de análise de QTLs para dados sobre a abundância de transcrições de genes específicos em amostras de diferentes indivíduos (genótipos) em uma população segregante, ou em populações com outras estruturas genéticas. A abundância de transcrição é usada como uma medida do nível da expressão desse gene em cada indivíduo e pode ser analisada como uma característica, assim como outros fenótipos, como altura ou rendimento da planta (DRUKA et al., 2010).

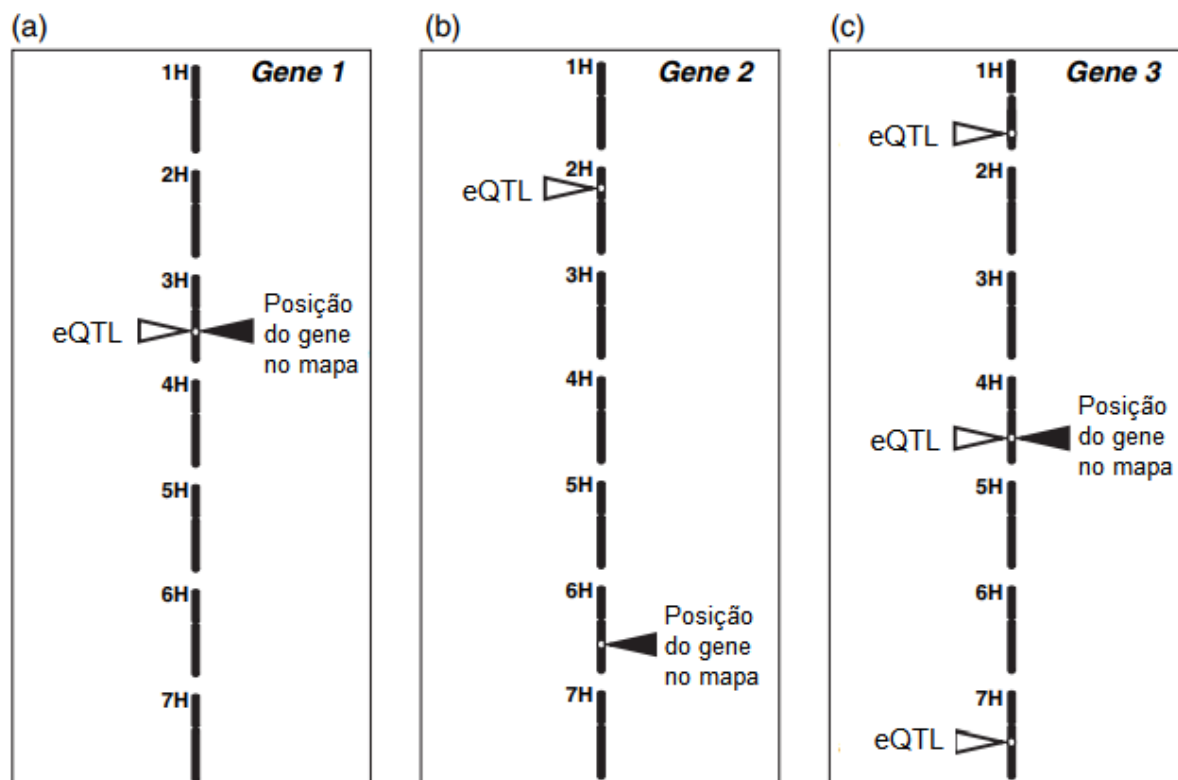
A análise integrada de dados genotípicos e dados quantitativos de transcrição, na associação com características complexas, pode auxiliar na identificação de genes envolvidos no fenótipo (WANG et al., 2014). Jansen e Nap (2001) propuseram a genética genômica como uma técnica que engloba o mapeamento de locos quantitativos e análises de expressão gênica para identificar a associação entre o estado alélico de uma região do genoma e a quantificação dos transcritos gênicos. Schadt et al. (2003) referiram-se a tais regiões genômicas como QTLs de expressão (eQTLs).

A determinação de uma região cromossômica que atua no processo de expressão de um gene para um dado caráter fenotípico em populações segregantes pelo mapeamento de eQTLs é de extrema importância para o melhoramento de plantas, partindo do pressuposto de que a transcrição de um gene consiste no intermediário entre a informação codificada no genoma e o fenótipo final (JANSEN; NAP, 2001; ROSA, 2007; KUJUR et al., 2013).

Estudos com abordagem de perfil diferencial de expressão gênica tais como microarranjos, RNA-Seq e RT-qPCR (reverse transcriptase quantitative PCR), têm sido utilizados para determinar os níveis de expressão gênica em uma população segregante e identificar regiões genômicas, explicando a variação de transcritos em genes co-regulados. Quando correlacionados com os dados de caracteres quantitativos, esta estratégia tem permitido identificar, com sucesso, genes candidatos pela co-localização da expressão e caracterização de QTLs (HANSEN et al., 2008; ACKERMANN et al., 2013). Alguns trabalhos já foram conduzidos com eQTLs em várias culturas vegetais, relatando grandes diferenças nos valores de expressão entre os indivíduos segregantes para um único gene, o que resultou na detecção de eQTLs tanto próximos quanto distantes à sequência gênica (WEST et al., 2007; HOLLOWAY et al., 2011; DROST et al., 2010).

Wang et al. (2014) concluíram que a expressão dos transcritos apresenta alta herdabilidade, sendo possível identificar dois tipos de eQTLs, de ação em *cis* e em *trans*. O primeiro é uma região localizada próxima a posição física de um gene, por exemplo, próximo a 5Mb (Figura 4a), já o segundo trata-se de um eQTLs distante do gene (> 5 Mb ou até mesmo em diferentes cromossomos) (Figura 4b). Os genes subjacentes a *trans*-eQTLs são assumidos para codificar fatores de transação - tipicamente proteínas que, ao se unirem a *cis*-elementos de outros genes, que controlam sua expressão de mRNA. Assim, um *trans*-eQTLs poderia, por

exemplo, representar a localização de um fator de transcrição que controla a expressão do alvo sozinho ou, potencialmente, a expressão correlacionada de vários genes funcionalmente relacionados. Na realidade, a expressão do gene alvo pode ser controlada por uma combinação de elementos de ação *cis*- e *trans* (Figura 4c) (DRUKA et al., 2010).



**Figura 4.** Modo de regulação da expressão gênica inferida pela análise expressão de caracteres quantitativos (eQTLs). (a) a *cis*-regulação é considerada a causa provável da acumulação observada de mRNA dependente do genótipo, se as posições do eQTLs e do gene corresponderem. (b) Se não o fizerem, o *trans*-fator codificado por um locus eQTLs (cromossomo 2H) é a causa mais provável das diferenças observadas. (c) se for observado múltiplos eQTLs, com um coincidindo com a localização do gene, pode ser inferida a regulação combinada *cis* e *trans* (Adaptado e retirado de: DRUKA et al., 2010).

Estudos de eQTLs vêm sendo realizados tanto em cultura anuais quanto em perenes. Wang et al. (2014) correlacionaram onze genes candidatos nas regiões de eQTLs que estavam sobrepostos a QTLs identificados para acúmulo de isoflavonas em soja. Chen et al. (2010) identificaram um gene candidato subjacente a um *trans*-



eQTL, demonstrando a viabilidade da clonagem de eQTLs no milho e, assim, ajudando a compreender o mecanismo de regulação da expressão gênica.

Kirst et al. (2005) observaram em híbridos de eucalipto, que QTLs para crescimento em diâmetro estavam co-localizados com eQTLs para genes relacionados com lignina, sugerindo que esta característica e lignina são controladas pelos mesmos locos. Drost et al. (2010) mostraram que, em *Populus*, os genes expressos nos órgãos estudados da planta (xilema, folhas e raízes) são *cis*-regulados (~ 92%), enquanto os genes com eQTLs em apenas um órgão são, em grande parte, *trans*-regulados, o que sugere que a regulação por *trans* pode ser o principal fator de diferenciação na função entre os órgãos das plantas.

Em citros foram desenvolvidos alguns trabalhos de eQTLs (LIMA, 2016; MAURICIO, 2013; SUGIYAMA et al., 2014). Mauricio (2013) utilizou híbridos de tangor Murcott com laranja Pera para mapear eQTLs relacionados à resistência a CVC (Clorose Variegada dos Citros). Lima (2016) mapeou QTLs de expressão em uma população de híbridos entre *C. sunki* e *P. trifoliata* associados à resistência à *Phytophthora parasitica*. Sugiyama et al. (2014) mapearam eQTLs para genes do metabolismo de carotenóides em híbridos de *Citrus*.

Vários estudos de transcriptomas em interações citros-HLB foram publicados até o momento (ALBRECHT; BOWMAN, 2012; FAN et al., 2012; MAFRA et al., 2013; MARTINELLI et al., 2013). Estes estudos demonstraram que as expressões de genes do metabolismo de carboidratos, de transporte de nutrientes, síntese da parede celular, e vias de resposta de defesa e hormonais foram reprogramadas pela infecção com CLas e o desenvolvimento da doença. Também sugeriram que a interrupção na via fonte e dreno de carboidratos e obstrução do floema, provavelmente, foram as principais causas do aparecimento dos sintomas de HLB (ARITUA et al., 2013; MAFRA et al., 2013; MARTINELLI et al., 2013). As técnicas de microarranjos e RNA-seq foram utilizadas para estudos de expressão gênica em tecidos de frutos, folhas, ramos e raízes de citros em resposta à infecção com CLas (DUAN et al., 2009; FAN et al., 2012).

De acordo com Rawat et al. (2015), pouca sobreposição foi observada entre as respostas obtidas nos estudos de transcriptomas, quanto aos genes diferencialmente expressos. Os autores discutem que, provavelmente, isto se deve às diferentes técnicas, tecidos ou genótipos utilizados. Além disso, alguns estudos focaram apenas em plantas totalmente sintomáticas, enquanto outros realizaram

análises ao longo do tempo de desenvolvimento da doença. Estes mesmos autores, conduziram uma análise integrada das informações de 46 plataformas públicas de dados de microarranjos disponíveis para o patossistema Citros-HLB. A análise de ontologia gênica desse conjunto de dados sugeriu que o metabolismo de carboidratos, transporte de nutrientes e estresse biótico foram as vias centrais moduladas em citros por infecção CLas e desenvolvimento de HLB.

A identificação de eQTLs e dos genes cuja expressão eles regulam é de grande interesse para revelar os componentes chave da arquitetura genética que desencadeiam muitos processos biológicos. A população que será utilizada neste estudo tem sido avaliada para a tolerância ao HLB e outras doenças (BOAVA et al., 2011, 2015). Estas informações fenotípicas, em combinação com a pesquisa proposta, serão utilizadas futuramente para identificar os genes associados com a variação quantitativa de características comercialmente importantes para o setor citrícola.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Análises comparativas entre os mapas de ligação e o genoma de referência

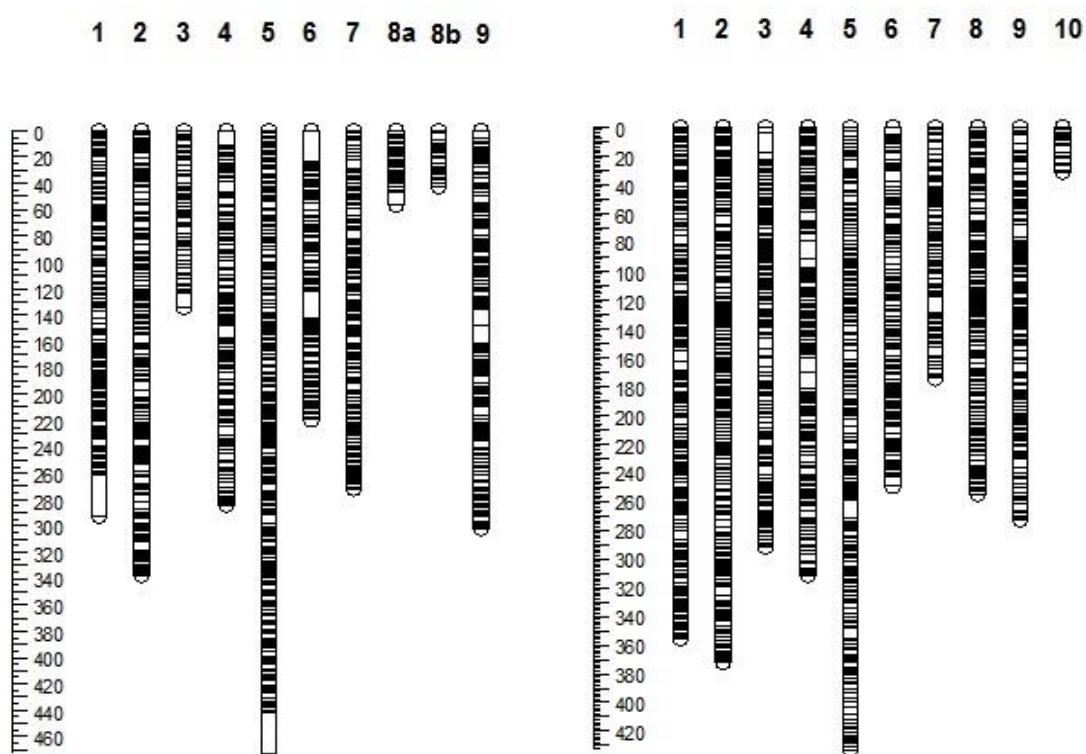
Para as análises comparativas, foram utilizados os mapas de ligação previamente construídos para *C. sunki* e *P. trifoliata* utilizando marcadores DArT-Seq™ e a estratégia *pseudo-testcross*. Os mapas estão apresentados na tabela 1 e figura 5 (CURTOLO et al., 2017, submetido para publicação).

Para a construção dos mapas de ligação foi utilizado o software OneMap. O mapa de *P. trifoliata*, foi construído com 3.084 marcadores distribuídos em um total de nove grupos de ligação, correspondendo ao número haplóide de cromossomos da espécie, com um tamanho total de 2.411,55 cM, com os grupos variando de 42,03 cM (TLG 8b) a 472,60 (TLG 5). A distância média entre marcas foi de 0,78 cM, sendo que o grupo com menor densidade foi o TLG 8b com 0,96 cM e o com maior densidade foi o TLG 8a com 0,62 cM entre marcas. Já o mapa de *C. sunki*, possui um total de 2.778 marcadores moleculares e um tamanho de 2.446,6 cM, distribuídos em dez grupos de ligação, superando o número haplóide de cromossomos da espécie (n=9). Os grupos de ligação de tangerina Sunki (SLG) variaram de 30,98 cM (SLG 10) a 432,73 cM (SLG 5) com uma distância média de 0,88 cM entre marcas. O grupo com menor densidade foi o SLG 10 com 0,53 cM e o com maior foi o SLG 5 com 1,87 cM entre marcas (Figura 5, Tabela 1).

**Tabela 1.** Distribuição do número de marcadores mapeados em cada grupo de ligação.

Mapa de ligação <i>P. trifoliata</i>			Mapa de ligação <i>C. sunki</i>		
	Número de marcadores	Tamanho do grupo de ligação (cM)		Número de marcadores	Tamanho do grupo de ligação (cM)
*TLG 1	434	292,54	**SLG 1	525	355,43
TLG 2	435	337,52	SLG 2	396	372,06
TLG 3	155	133,87	SLG 3	311	291,84
TLG 4	341	283,92	SLG 4	287	311,18
TLG 5	629	472,60	SLG 5	231	432,73
TLG 6	256	219,24	SLG 6	228	249,58
TLG 7	316	271,53	SLG 7	94	174,83
TLG 8a	91	56,40	SLG 8	298	255,34
TLG 8b	44	42,03	SLG 9	349	272,63
TLG 9	383	301,90	SLG 10	59	30,98
TOTAL	3.084	2.411,55	TOTAL	2.778	2.446,6

\*TLG = grupo de ligação do *P. trifoliata*; \*\*SLG = grupo de ligação da *C. sunki*.



**Figura 5.** Mapas de ligação de *P. trifoliata* (à esquerda) e *C. sunki* (à direita), usando a estratégia *pseudo-testcross*. Os mapas de ligação foram construídos com 2.778 marcadores DarT-Seq™ para *C. sunki* e 3.084 marcadores DarT-Seq™ para *P. trifoliata*.

Foi realizada a análise comparativa entre os mapas de ligação com o genoma de referência de *C. sinensis*. Para que fosse possível esta comparação, todas as sequências dos marcadores ancorados no mapa foram alinhadas com o genoma, a partir do BLASTN, onde somente o resultado do primeiro melhor alinhamento, com base no *e-value*, foi utilizado para a comparação. Com o intuito de facilitar a visualização dos resultados dos alinhamentos obtidos, de modo a permitir a identificação de sintenias, foi gerada uma visualização gráfica a partir a plataforma <http://mkweb.bcgsc.ca/tableviewer/>. Esta análise comparativa só é possível quando há disponibilidade do genoma sequenciado da espécie, ou marcadores comuns entre os diferentes mapas de ligação (THUMMA et al., 2010).

A avaliação da ordem dos marcadores nos mapas de ligação com a posição física dos marcadores no genoma foi estimada alinhando-se os grupos de ligação com os pseudocromossomos de laranja doce utilizando o programa MapChart 2.3.

#### **4.2. Local de Experimentação**

O trabalho foi desenvolvido no Centro APTA Citros Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo (IAC), Cordeirópolis/SP. As plantas fizeram parte de outro trabalho do nosso grupo de pesquisa (BOAVA et al., 2017), foram estabelecidas em casa de vegetação em 2013 e a coleta de folhas para o presente trabalho se deu em junho de 2015.

#### **4.3. Material Genético**

Os indivíduos empregados no experimento fazem parte de uma população de híbridos F<sub>1</sub> obtidos do cruzamento entre os genitores *C. sunki* e *P. trifoliata*, os quais foram utilizados em hibridação controlada como genitores feminino (suscetível ao HLB) e masculino (considerado mais tolerante ao HLB), respectivamente, originando 314 híbridos.

O experimento constituiu-se de genótipos de *C. sunki*, *P. trifoliata* e 79 híbridos que foram multiplicados por borbulhas enxertadas em limão Cravo (*C. limonia* Osb.). Após seis meses da enxertia, as plantas foram inoculadas com borbulhas de plantas infectadas por CLas que foram enxertados em lados opostos

da haste primária das plantas híbridas. Essas borbulhas infectadas foram coletadas a partir de plantas de laranja Pera HLB-sintomáticas.

Todas as plantas foram mantidas em estufa com delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis repetições biológicas para cada genótipo, sendo 3 plantas inoculadas com borbulhas infectadas e 3 plantas inoculadas com borbulhas saudáveis (Figura 6). Folhas e pecíolos foram coletados aos 24 meses após a inoculação para quantificação de bactéria e amido.



**Figura 6.** Foto da casa de vegetação com a população de híbridos em delineamento inteiramente casualizado.

#### **4.4. Avaliação Fenotípica**

As avaliações fenotípicas foram realizadas a partir da quantificação da bactéria e acúmulo de amido nos 79 híbridos e genitores com três repetições de cada genótipo, de plantas infectadas e não infectadas, após dois anos da inoculação do patógeno.

#### 4.4.1. Detecção e Quantificação da Bactéria por qPCR

A detecção e quantificação da bactéria foram realizadas a partir de amostras de DNA total dos pecíolos e nervuras centrais das folhas das plantas.

##### 4.4.1.1. Extração de DNA

Folhas da mesma idade e posição foram coletadas a partir dos quatro lados das plantas. Pecíolos de oito folhas foram combinados, e 200 mg foram triturados com duas esferas (3 mm de diâmetro) em microtubos de 2 ml a 30 Hz durante 120 segundos, usando TissueLyser II (Qiagen). A extração de DNA foi realizada utilizando o método de CTAB (MURRAY; THOMPSON, 1980). O DNA precipitado foi dissolvido em 50  $\mu$ L de água isenta de DNase. A qualidade das amostras de DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%. As concentrações de DNA foram determinadas em NanoDrop™ 8000 spectrophotometer (Thermo Scientific), e ajustada a 100 ng/ $\mu$ L.

##### 4.4.1.2. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

As amplificações foram realizadas em *duplex* (Tabela 2) utilizando 14  $\mu$ L de reação contendo 6,25  $\mu$ L de 1X TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystem) 216 nM de cada um dos iniciadores e 135 nM de cada uma das sondas (HLBp) em termociclador "ABI Prism 7500 Sequence Detection System" (Applied Biosystem) (LI et al., 2006). GAPDH foi usado como um gene de controle interno com 270 nM de cada iniciador e 135 nM de cada sonda (BOAVA et al., 2015). Foi adicionada água para levar o volume a 11  $\mu$ L, e 3  $\mu$ L de DNA foram utilizados por reação. Todas as reações foram realizadas em duplicata. Cada placa de PCR de 96 poços continha os seguintes controles: dois poços com água como controles negativos de PCR e dois poços contendo amostras CLas positivas. As condições dos ciclos de PCR foram: 95°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 30s e 58°C durante 45s. As emissões foram medidas em cada um dos 40 passos de extensão. Foi utilizado o valor limiar de 34 Ct (*cycle threshold* - limiar de ciclo) (BOAVA et al., 2015). A otimização das concentrações dos reagentes, incluindo iniciadores e sondas, foi realizada usando DNA HLB positivos e negativos conhecidos.

**Tabela 2.** Sequências dos iniciadores utilizados para quantificação de CLas.

Genes	Sigla	Sequências 5'- 3'	Referências
16S rDNA	HLBas	TCGAGCGCGTATGCAATACG	(LI et al., 2006)
	HLBr	GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG	
	HLBp	AAGACGGGTGAGTAACGCG	
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDHf	GGTCAGTGGAAGCACAACGA	(BOAVA et al., 2015)
	GAPDhr	GAGTACTAAAATGTACCTGAATCCGAAA	
	GAPDHp	TCCTCTTCGGTGAGAAGCCAGTCGCT	

#### 4.4.1.3. Obtenção da Curva Padrão

Com a curva padrão foi possível calcular o título da bactéria. O fragmento alvo de CLas foi amplificado pelo conjunto de iniciadores 16S de DNA ribossomal (rDNA) da bactéria como descrito por Li et al. (2006). O fragmento alvo esperado foi separado por eletroforese em gel de agarose *low melting* 2% e isolado *in situ* e purificada com Qiaquick *gel extraction kit* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi eluído e utilizado para ligação com o vetor pGEM®-T (Promega). A solução plasmídeo recombinante foi usada para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . O plasmídeo recombinante foi extraído com Pure Yield TM Plasmid Miniprep System (Promega) seguindo as instruções do fabricante, e foi sequenciado e alinhado usando BLASTN. A solução padrão plasmídeo original foi quantificada com NanoDrop™ 8000 spectrophotometer (Thermo Scientific), e, em seguida, diluída em diluições seriadas de 10 vezes, a partir da solução original de DNA alvo a 10<sup>-10</sup>, sendo as diluições utilizadas para gerar uma curva padrão (dsDNA = 6,6 × 10<sup>5</sup> g mol<sup>-1</sup> kb<sup>-1</sup>), de acordo com Wang et al. (2006). A quantificação CLas (número de cópias [CN] de 16S rDNA por  $\mu$ L) foi baseada na fórmula

$$CN = \frac{M \times N}{L \times D}$$

onde M = concentração mínima de ácido nucleico detectado (g/mL); N = de n<sup>o</sup> de Avogadro (6, 022 × 10<sup>23</sup> moléculas<sup>-1</sup>); L = comprimento do ácido nucleico em kpb (comprimento total do plasmídeo de inserção); D = factor de conversão a partir de 1 kb de ácido nucleico para Daltons (WANG et al., 2006).



#### 4.4.2. Quantificação de Amido

A quantificação do amido foi realizada pelo método enzimático a partir de 10 mg de folhas secas de acordo com a metodologia descrita por Amaral et al. (2007). Para a retirada dos açúcares, pigmentos, fenóis e outras substâncias solúveis foram realizadas quatro extrações com 500  $\mu\text{L}$  de etanol 80% a 80°C por 20 min, totalizando 2 mL de extrato etanólico. Após remoção da fração etanólica, o precipitado foi seco à temperatura ambiente durante 12 horas, até a completa evaporação do etanol. A seguir, foram adicionados 0,5 mL (120 U mL<sup>-1</sup>) de  $\alpha$ -amilase termoestável de *Bacillus licheniformis* (EC 3.3.1.1; Megazyme®, Irlanda) diluída em tampão MOPS 10 mM pH 6,5. As amostras foram incubadas a 75° C por 30 min. Este procedimento foi repetido mais uma vez totalizando 120 unidades de enzima. As amostras foram resfriadas até 50°C, e então, adicionou-se 0,5 mL de uma solução contendo 30 U mL<sup>-1</sup> de amiloglicosidase de *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.3; Megazyme®, Irlanda) em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5. As amostras foram incubadas a 50°C por 30 min. Este procedimento foi repetido mais uma vez.

Após as incubações descritas acima, foram acrescentados 100  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico 0,8 M para parar a reação e precipitar proteínas. Após centrifugação (2 min a 10.000 g), procedeu-se à dosagem de amido nos extratos, através de quantificação da glucose liberada no processo de hidrólise. Para tal foram retiradas alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  de extrato, às quais foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  do Reagente Glucose PAP Liquiform (CENTERLAB, Brasil), contendo as enzimas glucose-oxidase (~11000 U mL<sup>-1</sup>) e peroxidase (~700 U mL<sup>-1</sup>), 290  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de 4-aminoantipirina e 50 mM de fenol pH 7,5. Neste sistema, a glucose oxidase catalisa a oxidação da glucose. O peróxido de hidrogênio formado na reação reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glucose na amostra. Após incubação por 15 min a 37 °C, o teor de glucose foi determinado no espectrofotômetro com comprimento de onda 490 nm. Para a confecção da curva padrão foi utilizada solução de glucose (SIGMA), nas concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 4.4.3. Análises dos dados fenotípicos

Para as análises de quantificação da bactéria e amido, como durante a coleta houve perda de algumas repetições dos genótipos, por morte da planta ou pela mesma não apresentar folhas na data da coleta, optou-se pela análise dos dados por modelo linear misto.

Um ajuste com os dados de quantificação de CLas foi realizado, levando-se em consideração a presença ou não da bactéria nas repetições de cada híbrido. Se uma ou duas das repetições apresentaram a bactéria e a outra não, foi considerada apenas a presença da mesma, utilizando o valor limiar de 34 Ct (BOAVA et al., 2015).

Para inferir a quantidade de CLas nas amostras, levaram-se em consideração dois parâmetros: os valores de Ct (resultado do qPCR) e o número (nº) de cópias do fragmento 16S de CLas, obtidas pela curva padrão dos iniciadores do HLB, transformado em logaritmo na base 10 (log). Para a quantificação de amido foram levados em consideração dois grupos, indivíduos sem inoculação com CLas (Controle) e com inoculação (Inoculado).

O modelo estatístico utilizado para a análise foi:

$$y = Xr + Zg + e$$

onde  $y$  é o vetor de dados;  $r$  é o vetor de efeitos das repetições (assumido como fixo) adicionado à média geral;  $g$  é o vetor dos efeitos genotípicos individuais (cada híbrido) (assumido como aleatório); e  $e$  é o vetor de erros ou resíduos (aleatório). As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência dos ditos efeitos.

As análises foram realizadas com o programa R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)), e foram estimadas as predições de valores genotípicos (BLUPs - *Best Linear Unbiased Prediction* – “Melhor predição linear imparcial”). A herdabilidade para cada característica foi estimada com base nos componentes da variância da análise fenotípica, por meio das fórmulas apresentadas abaixo.

$$h^2 = \frac{Vg}{Vf} \quad Vf = Vg + Ve \quad CVg = 100 * \frac{\sqrt{Vg}}{m\u00e9dia} \quad CVr = 100 * \frac{\sqrt{Ve}}{m\u00e9dia}$$

$Vg$  = variação genotípica;  
 $Ve$  = variação ambiental;  
 $Vf$  = variação fenotípica;

$h^2$  = herdabilidade;  
 $CVr$  = coeficiente de variação do resíduo;  
 $CVg$  = coeficiente de variação do genótipo.

Foi realizada Análise de Componentes Principais (ACP) ou *Principal Component Analysis (PCA)*, com quatro caracteres fenotípicos, dois para inferir a quantificação de CLas (Ct e log) e dois para inferir amido (Inoculado e Inoculado corrigido pelo Controle). A ACP é uma técnica estatística multivariada que transforma um conjunto de dados em outro de mesma dimensão, os componentes principais (PC), sendo que cada PC é uma combinação linear de todas as variáveis originais (HONGYU et al., 2015).

As correlações genéticas entre cada par de características foram obtidas usando o coeficiente de correlações de Spearman. Essas correlações foram testadas assumindo nível de significância global de 0,01. As análises foram feitas usando o programa R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

#### **4.5. Avaliação da Expressão Gênica**

Para quantificação de expressão gênica, foram utilizados 72 híbridos da população e foi realizada análise de RT-qPCR para avaliar a expressão de 14 genes envolvidos em metabolismo de açúcares e carboidratos, genes de degradação de amido e genes envolvidos com a funcionalidade de floema. Os genes FBOX e GAPC2 foram usados como controles endógenos (Tabela 3). Alguns genes envolvidos no metabolismo de açúcares e carboidratos foram obtidos a partir de um estudo de RNA-seq realizado previamente por nosso grupo baseado na expressão diferencial de transcritos durante a comparação entre plantas infectadas com CLas e plantas controle de *P. trifoliata*, *C. sunki* e seus híbridos (BOAVA, dados não publicados). Genes de degradação de amido foram baseados no trabalho apresentado por Fan et al. (2010), os quais são os principais genes envolvidos na via de degradação transitória do amido em folhas. Os genes envolvidos com a funcionalidade do floema foram baseados no estudo de transcriptoma de genótipos de citros suscetíveis realizado por Mafra et al. (2013).

**Tabela 3.** Sequências de iniciadores utilizados em qPCR para análises de expressão gênica.

Sigla	Descrição	Função	ID <sup>1</sup>	Forward/ Reverse 5'- 3'	Origem
UDP	UDP-glucose	Transferase activity, transferring hexosyl groups, metabolic process	Cs2g23750	CGCTTGGAACACAAAGGAATAAA/ AATTGAATTGGAGCTTGATGGA	Desenho próprio
T6PP	Trehalose-6-phosphate synthase	Catalytic activity, trehalose biosynthetic process, metabolic process	Cs3g09800	TTTGCATAGTCCATTTCCCTTCA/ AAAGCCAATCAAGTCCGAAT	Desenho próprio
CARBOX	Carboxylesterase-Related	Hydrolase activity, metabolic process	Cs9g06500	ACAAGAAGCGTTTGGAAATATTTGA/ AACTCGGCTTACCTGAACCA	Desenho próprio
PAE	Pectin Acetylerase	Hydrolase activity, cell wall organization	Cs3g10420	TTCACCTTCAGAGGAGCAAGG/ AGCGGAACAACCAGTAAGTA	Desenho próprio
GLUC	Beta-glucosidase	Catalytic activity, hydrolase activity, carbohydrate metabolic process	Cs6g17840	CGACTGCCCAAATTCACAAA/ GATGTTACTTCCTCTGCATAATCT	Desenho próprio
GALAC	Beta-galactosidase	Catalytic activity, hydrolase activity, carbohydrate metabolic process	Cs4g14090	GTTCAATCACAAATGTCTGGGTT/ TTCACCTGGGTCAATCTTAACA	Desenho próprio
BAM3	Beta-Amylase	Polysaccharide catabolic process, catalytic activity, carbohydrate metabolic process	Cs5g07550	CCATGGGTGCTTGAAGAAAT/ GTTCTTCCTCTGAGCAACGG	(FAN et al., 2010)
MEX1	Maltose exporter	Maltose transport	Cs7g15380	CATGTGGATGCCAGTTTCAC/ CGTGGGATCAGAAGTCCATT	(FAN et al., 2010)
BAC2	Mitochondrial arginine transporter BAC2	Mitochondrial carrier protein, transmembrane transport	Cs1g14950	ACAAGATCCAAACAAGCAGAT/ ACAGTGATACTAAGTCTCGATAT	Desenho próprio
NRAMP	Metal Transporter Nramp	Natural resistance-associated macrophage protein, metal ion transporter, metal ion (Mn <sup>2+</sup> /Fe <sup>2+</sup> )	Cs3g19960	TTTCACTTCTTGGTGCTATGGTTA/ TCCTTGATGCTCCTAACAGAT	Desenho próprio
EREB	Ethylene responsive element binding protein	Sequence-specific DNA binding transcription factor activity, regulation of transcription	Cs9g10650	GACTAATAGCAGAAGCCACACC/ TTTCTCTGTTGTTGAACTCACC	Desenho próprio
NAC2	NAC domain protein NAC2	DNA binding, regulation of transcription, DNA-dependent	Cs3g19890	CGCCGAAATCGATCTTTACA/ TTTGGATACTTCCGATCCCTA	Desenho próprio
PP2B15	Phloem-protein B15	Protein binding	Cs3g14740	AGATTAGTGTTGCCGCTGGT/ GAAGGAAGGGTTTCCAGGTC	(MAFRA et al., 2013)
PP2B10	Phloem-protein B10	Protein binding	Cs6g02680	AGATTAGTGTTGCCGCTGGT/ GAAGGAAGGGTTTCCAGGTC	(MAFRA et al., 2013)
FBOX	F-box family protein	Controle endógeno		GGCTGAGAGGTTTCGAGTGTT/ GGCTGTTGCATGACTGAAGA	(MAFRA et al., 2012)
GAPC2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehidrogenase C2	Controle endógeno		TCTTGCCCTGCTTTGAATGGA/ TGTGAGGTCAACCACTGCGACAT	(MAFRA et al., 2012)

<sup>1</sup>Identificação dos genes obtidos no banco de dados disponível em: <http://citrus.hzau.edu.cn/cgi-bin/orange/search>.

#### 4.5.1. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído com Cloreto de Lítio (LiCl), usando o protocolo descrito por Chang et al. (1993) e adaptado por Porto et al. (2010). As extrações foram realizadas em 72 híbridos mais genitores com três repetições biológicas inoculadas e três repetições biológicas não inoculadas de cada genótipo, dois anos após a inoculação. Vestígios de DNA genômico foram eliminados usando DNase. E para remoção de proteínas e de nucleotídeos livres, foi realizada a purificação com fenol-clorofórmio e precipitação de RNA transcritos com etanol.

A qualidade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese, após a separação num gel de agarose com formaldeído (desnaturante). A concentração de RNA total foi determinada utilizando um espectrofotômetro NanoDrop ND-8000 (Thermo Scientific). Os cDNAs foram sintetizados a partir de 1,0 µg de RNA total utilizando Superscript III (200 U/mL) (Invitrogen) com um iniciador oligo (dT) (dT12-18, Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

Posteriormente, o cDNA obtido foi diluído em água livre de RNase na proporção de 1:25. As três repetições biológicas de cDNA (25 µL cada) foram reunidas e formaram um *pool* de amostras para cada genótipo a ser analisado nos ensaios de expressão gênica e mapeamento de eQTLs.

#### 4.5.2. Análise da Expressão Gênica

Os iniciadores que flanqueiam as regiões gênicas foram sintetizados usando o software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems), e checados quanto à especificidade por meio da ferramenta Primer-BLAST no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Para a validação dos iniciadores sintetizados, foi feita a PCR convencional, com o intuito de avaliar as sequências amplificadas a partir de cDNA. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose a 2%, preparado com TAE 1X e brometo de etídio. As reações para cada par de iniciadores incluíram sempre um branco (amostra sem cDNA) com o objetivo de detectar possíveis amplificações inespecíficas e contaminações.

Após a validação dos iniciadores por PCR convencional, as amplificações por qPCR para os ensaios de expressão gênica foram realizadas com o uso de 7,5

$\mu\text{L}$  de GoTaq qPCR Master Mix (Promega), 3  $\mu\text{L}$  de cDNA (diluição de 1:25), sendo retirado do *pool* gênico formado pelas três repetições biológicas existentes de cada genótipo, 200 nM de cada iniciador e água para um volume final de 15  $\mu\text{L}$ .

O equipamento utilizado foi o 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) e o ciclo de: 50°C por 2 min; 95°C por 10 min; 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Para cada reação foi realizada uma curva de dissociação para verificação de possíveis contaminações e reações inespecíficas, sendo consideradas as reações que possuíam apenas um pico na curva. Além disso, as reações para cada par de iniciador foram feitas em duplicatas, utilizando sempre um controle para detectar possíveis contaminações.

Todas as placas foram pipetadas utilizando o sistema automatizado epMotion da Eppendorf, com o objetivo eliminar erros de pipetagem manual e maximizar a reprodutibilidade dos ensaios.

#### **4.5.3. Normalização dos dados de qPCR e análises de expressão gênica**

A estabilidade de expressão para cada gene de referência foi avaliada pelo uso do software GenEx v.6 (DE SPIEGELAERE et al., 2015). Para a detecção das quantidades relativas, dos níveis de expressão, dos valores *Foldchange* e da estabilidade dos genes endógenos, foram considerados dois tratamentos no estudo: plantas inoculadas com CLas (grupo infectado) e plantas não inoculadas (grupo controle).

A eficiência de amplificação e os dados de Ct foram calculados para cada reação de qPCR por meio do software Real-time PCR Miner (ZHAO; FERNALD, 2005), que utiliza um algoritmo normalizador dos dados brutos de fluorescência em função dos ciclos da PCR. Para cada gene foi calculada a eficiência média de todas as PCR feitas. A média dos valores de Ct das duas repetições técnicas de cada genótipo analisado também foi estimada. Com esses dados obtidos, a quantificação relativa, determinada pelo método  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  entre as condições de qPCR (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e que serve de parâmetro para o cálculo dos níveis de expressão de cada amostra, foi aplicada.

Para tanto, uma metodologia derivada desse procedimento foi estabelecida, que não considera o valor de eficiência (E) do gene igual a 100%, incluindo o valor real de E nos cálculos das quantidades relativas (Q) de cada amostra pela fórmula Q

=  $E\Delta CT$ . Dessa forma, os valores das quantidades relativas de cada genótipo tanto para os 14 genes-alvo quanto para os dois genes endógenos (F-BOX e GAPC2) são estimados a partir dos valores de Ct e eficiência do gene, de modo que a amostra com menor Ct (maior expressão) ficar com o valor de  $Q = 1$ , o valor de  $E = 2$  compreendendo 100% de eficiência e a variável  $\Delta CT$  ser calculada pela diferença entre o menor Ct com o Ct da amostra em questão.

Os níveis de expressão de cada genótipo foram calculados por intermédio de um fator de normalização, dado pela média geométrica das quantidades relativas estimadas para os dois genes de referência. Para tanto, o cálculo dos níveis de expressão em cada amostra é feito pela razão entre o valor da quantidade relativa encontrada no gene-alvo e o fator de normalização daquele genótipo em análise.

Por fim, foram calculados os valores de *Foldchange* de cada indivíduo inoculado em relação ao não inoculado, pela razão dos níveis de expressão do grupo infectado sobre o grupo controle. Tais medidas permitem afirmar quais genes foram induzidos ou reprimidos em cada genótipo após a inoculação, determinando quantas vezes um gene-alvo é expresso individualmente nos genótipos inoculados em relação ao grupo controle. Dessa forma, os valores de *Foldchange* maior que 1 indicam um aumento da expressão gênica (o gene foi induzido), enquanto os valores menores que 1 indicam diminuição da expressão gênica (o gene foi reprimido).

#### **4.5.4. Análises dos dados de expressão gênica**

Para as análises de expressão, foram utilizadas quatro placas de qPCR para cada gene analisado, sendo que em metade da placa havia 18 genótipos e os dois genitores do grupo infectado, enquanto na outra metade os mesmos 18 genótipos e os dois genitores do grupo controle (Figura 7). Para a comparação entre as quatro placas para um gene utilizou-se o modelo linear misto, utilizando o pacote “nlme” do programa R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Foram considerados os genitores e a placa como variáveis fixas e os diferentes genótipos variáveis aleatórias. Assim, foram obtidas as variâncias genótípicas e residuais e os BLUPs, com as médias de expressões ajustadas. Com as fórmulas mostradas acima, foram calculados: as variâncias, os coeficientes de variação e a herdabilidade.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6
B	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	12	12
C	13	13	14	14	15	15	16	16	17	17	18	18
D	Trif	Trif	Sunki	Sunki								
E	1 cont	1 cont	2 cont	2 cont	3 cont	3 cont	4 cont	4 cont	5 cont	5 cont	6 cont	6 cont
F	7 cont	7 cont	8 cont	8 cont	9 cont	9 cont	10 cont	10 cont	11 cont	11 cont	12 cont	12 cont
G	13 cont	13 cont	14 cont	14 cont	15 cont	15 cont	16 cont	16 cont	17 cont	17 cont	18 cont	18 cont
H	Trif cont	Trif cont	Sunki cont	Sunki cont							H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O

**Figura 7.** Esquema da montagem da placa para RT-qPCR para a análise de expressão gênica dos 14 genes. Numeração de 1 a 18 representa os híbridos inoculados, e de 1 a 18 cont os respectivos híbridos controles. Trif representa o genitor *P. trifoliata* e Sunki o genitor *C. sunki*. Quatro placas para cada gene foram utilizadas para a população de 72 híbridos.

Para a obtenção do perfil de expressão gênica global do experimento, pela análise comparativa dos 14 genes candidatos com os 72 híbridos mais os dois genitores os valores de o *Foldchange* transformado em log na base 2 (*Log<sub>2</sub>Foldchange*) serviram de entrada para o programa MeV (*Multi Experiment Viewer*) v. 4.9 ([www.tm4.org](http://www.tm4.org)).

Assim, foi possível agrupar tanto os genes quanto as amostras pelo teste de agrupamento hierárquico (HCL – *Hierarchical clustering*), utilizando a correlação de Pearson como distância métrica, o que resultou na ordenação dos genes com expressões mais próximas e a separação dos genótipos em grupos (clusters), sendo esses parâmetros visualizados em uma representação gráfica chamada de *heatmap*, como em Lima (2016).



#### 4.6. Mapeamento de QTLs e eQTLs

Para o mapeamento de QTLs e eQTLs, foram utilizados os mapas descrito acima para *C. sunki* e *P. trifoliata*, sendo que os valores de quantificação da bactéria, acúmulo de amido e de expressão dos genes foram analisados via mapeamento por intervalo composto (CIM) (ZENG, 1993) por meio do pacote *FallsibQTL* do programa R (GAZAFFI et al., 2014), utilizando os mapas de ligação de *C. sunki* e *P. trifoliata* (apresentados acima). Para realizar a análise da CIM, cofatores foram incluídos no modelo para controlar os QTLs localizados fora do intervalo de mapeamento. Foi utilizado um máximo de 20 cofatores para evitar o excesso de parametrização do modelo. O valor limite para evidenciar QTLs foi obtido utilizando um nível de significância de 5% e 1.000 permutações (CHURCHILL; DOERGE, 1994), de acordo com a modificação proposta por Chen; Storey (2006).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Análises comparativas entre os mapas de ligação e o genoma de referência

Foi realizada uma análise comparativa entre as sequências dos marcadores dos mapas com o genoma de *C. sinensis*. Esses dados foram utilizados para nomear os grupos de ligação, ou seja, cada grupo de ligação passou a receber o nome do pseudocromossomo de *C. sinensis* correspondente.

A partir da visualização gráfica dos resultados do BLASTN (Figuras 8 e 10), foi possível verificar que, basicamente, todos os grupos de ligação apresentaram sintonia com um pseudocromossomo do genoma de referência utilizado, com exceção do grupo de ligação 10 do mapa da *C. sunki* e de marcadores que foram localizados no cromossomo Un (Chr *unassigned*) ou aqueles que não estavam presentes no genoma de *C. sinensis* (Chr N).

Dentre as sequências para o *P. trifoliata*, 13,3% foram localizadas no Chr Un, e 39,8% das sequências dos marcadores não foram encontradas no genoma de referência utilizado (Chr N). Para *C. sunki*, 13,1% foram localizadas no Chr Un e 28,9% no Chr N, o que revela que os mapas de ligação construídos possuem sequências que, anteriormente, não estavam posicionadas no genoma de referência. E mostra, também, que *C. sunki* é mais semelhante a *C. sinensis* do que o *P. trifoliata*, como esperado, por se tratarem de espécies do mesmo gênero.

Na tabela 4, observamos os grupos de ligação e a porcentagem de marcadores dos mesmos que se mostraram sintênicos com o cromossomo do genoma de *C. sinensis*. Para o *P. trifoliata*, essa porcentagem variou de 27,27 (TLG 4) a 52,27% (TLG 8a). Para o mapa de *C. sunki*, esta porcentagem variou de 35,50 (SLG 5) a 80,85% (SLG 7).

Uma vez observada a sintonia entre os mapas com o genoma, foi possível analisar a colinearidade entre as sequências presentes no genoma da laranja doce e os mapas de ligação utilizados no presente trabalho (Figuras 9 e 11).

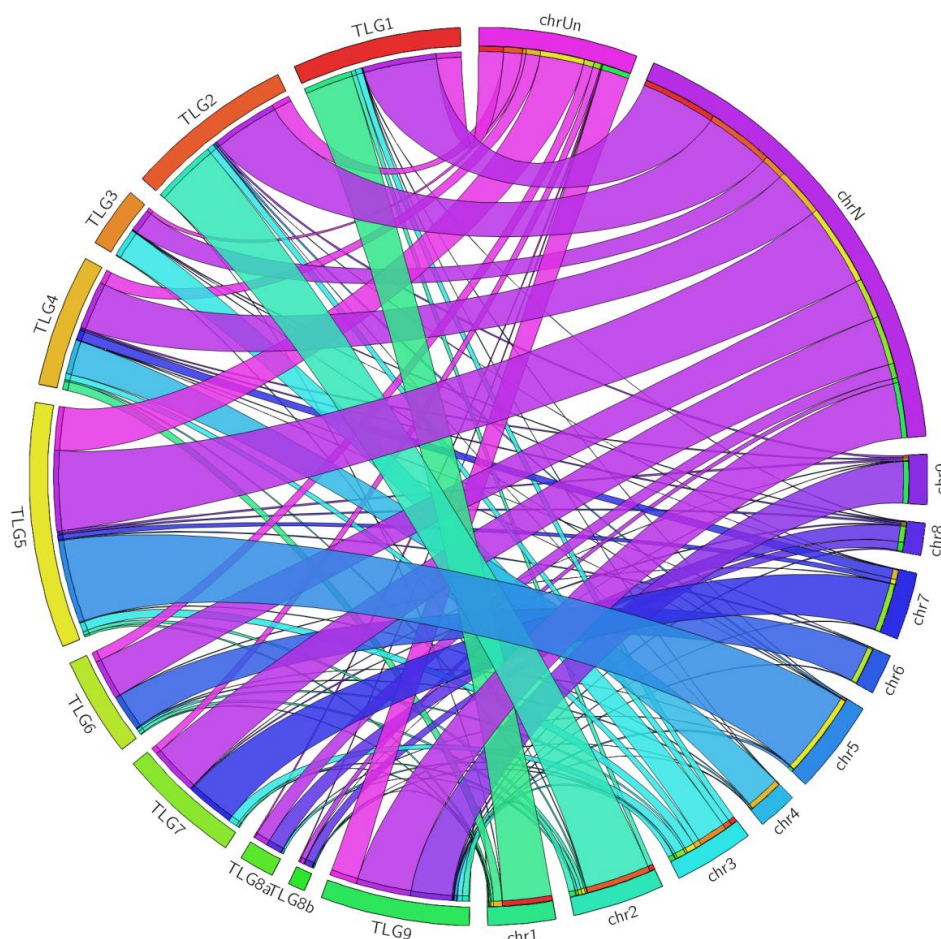
**Tabela 4.** Sintonia dos grupos de ligação com o pseudocromossomo correspondente.

Mapa de ligação <i>P. trifoliata</i>		Mapa de ligação <i>C. sunki</i>	
Grupos de ligação	Sintonia com o cromossomo correspondente (%)	Grupos de ligação	Sintonia com o cromossomo correspondente (%)
TLG 1	30,65	SLG 1	53,52
TLG 2	40,23	SLG 2	56,31
TLG 3	49,68	SLG 3	49,84
TLG 4	27,27	SLG 4	58,54
TLG 5	35,77	SLG 5	35,50
TLG 6	38,28	SLG 6	65,79
TLG 7	41,14	SLG 7	80,85
TLG 8a	46,15	SLG 8	42,28
TLG 8b	52,27	SLG 9	40,97
TLG 9	29,24	SLG 10	-

As análises comparativas do genoma de *C. sinensis* e os mapas de ligação mostraram colinearidade. No entanto, evidenciam-se eventos de rearranjo cromossômico, regiões onde ocorreram inversões e mudança na ordem dos marcadores, possivelmente devido à recombinação ocorrida nos gametas dos genitores da população.

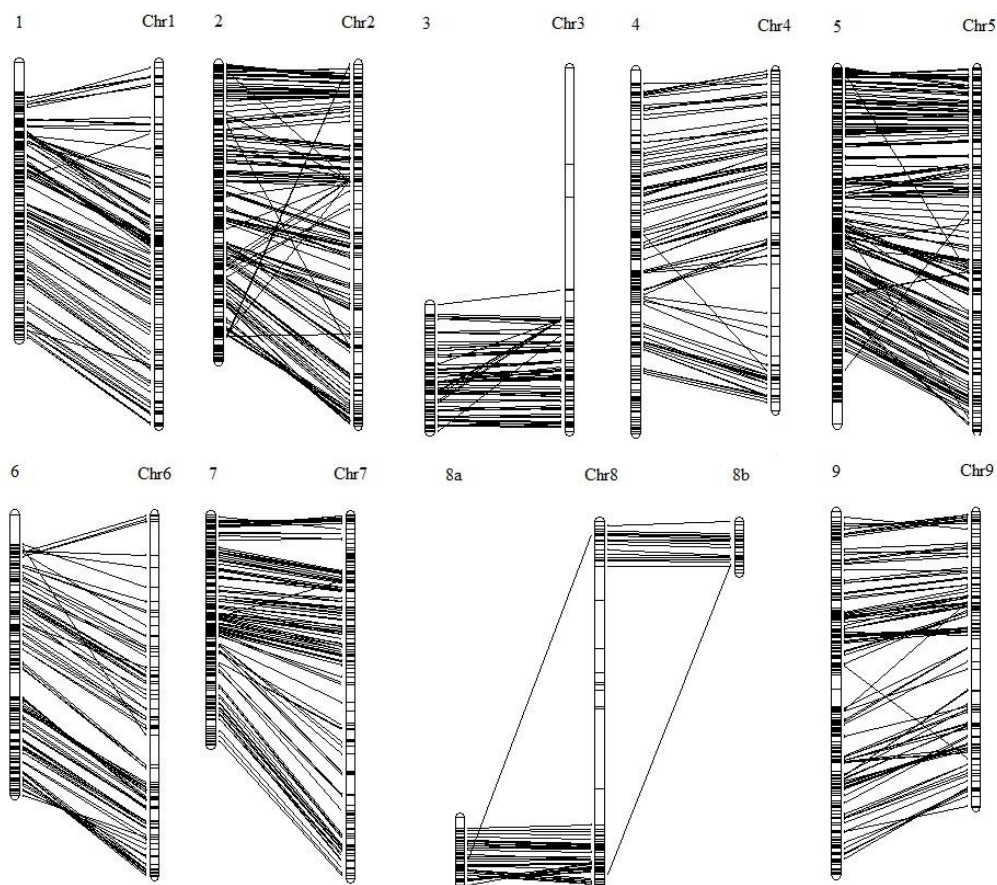
Para o mapa do *P. trifoliata*, os grupos de ligação 8a e 8b apresentaram sintonia com o mesmo pseudocromossomo (Chr 8) e colinearidade em extremidades

diferentes do cromossomo, o que pode evidenciar que os marcadores utilizados não saturaram a região central desse cromossomo dividindo em dois distintos grupos (Figura 9), e por esse motivo recebem o nome de 8a e 8b.

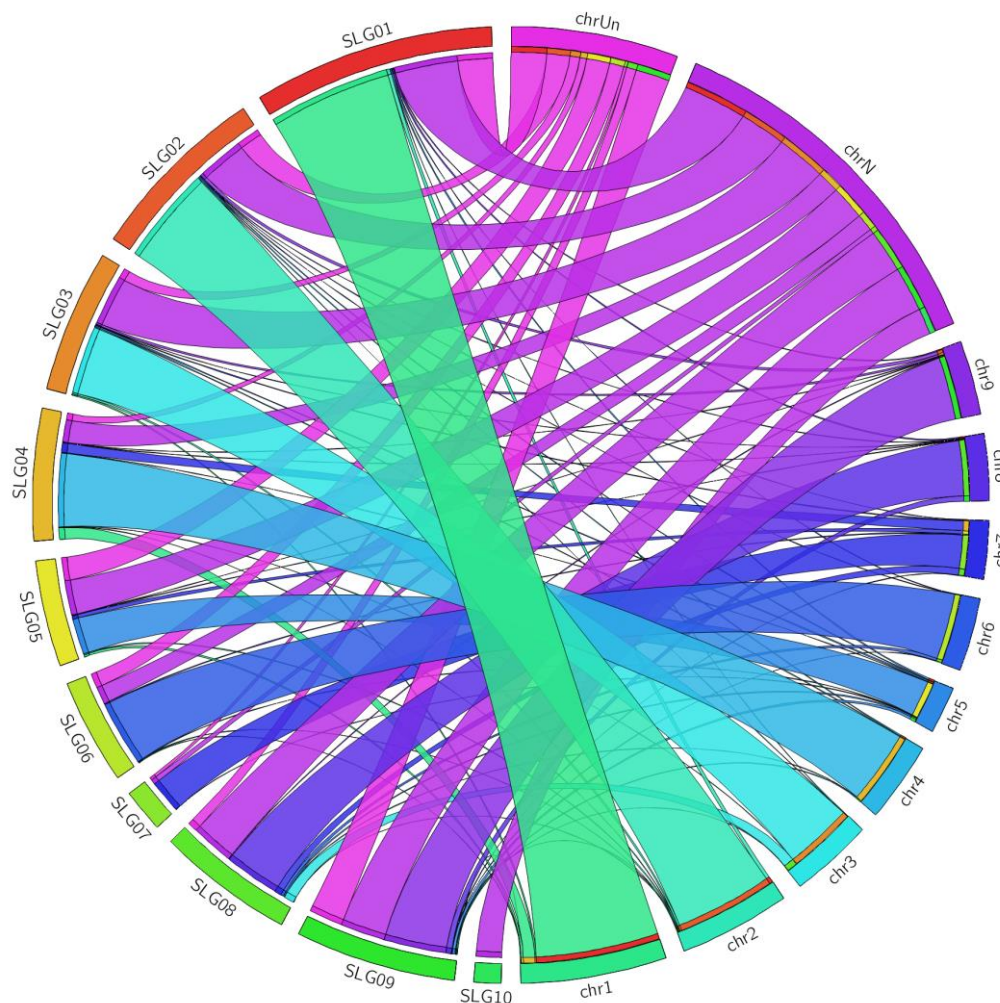


**Figura 8.** Comparação dos grupos de ligação construídos com o genoma de *C. sinensis*, disponível em: <http://citrus.hzau.edu.cn/orange/>. À esquerda as siglas TLG (TLG1, TLG2, TLG3, TLG4, TLG5, TLG6, TLG7, TLG8a, TLG8b e TLG9) representam os grupos de ligação construídos para o mapa de *P. trifoliata*. Já as abreviações Chr (Chr1, Chr2, Chr3, Chr4, Chr5, Chr6, Chr7, Chr8 e Chr9), à direita, ilustram os cromossomos do genoma de referência utilizado, sendo que Chr *Un* (Chr *unassigned*) é um segmento do genoma onde estão todas as seqüências que não foram posicionadas nos pseudocromossomos. E o Chr N representa todas as seqüências que não foram alinhadas no genoma de referência.

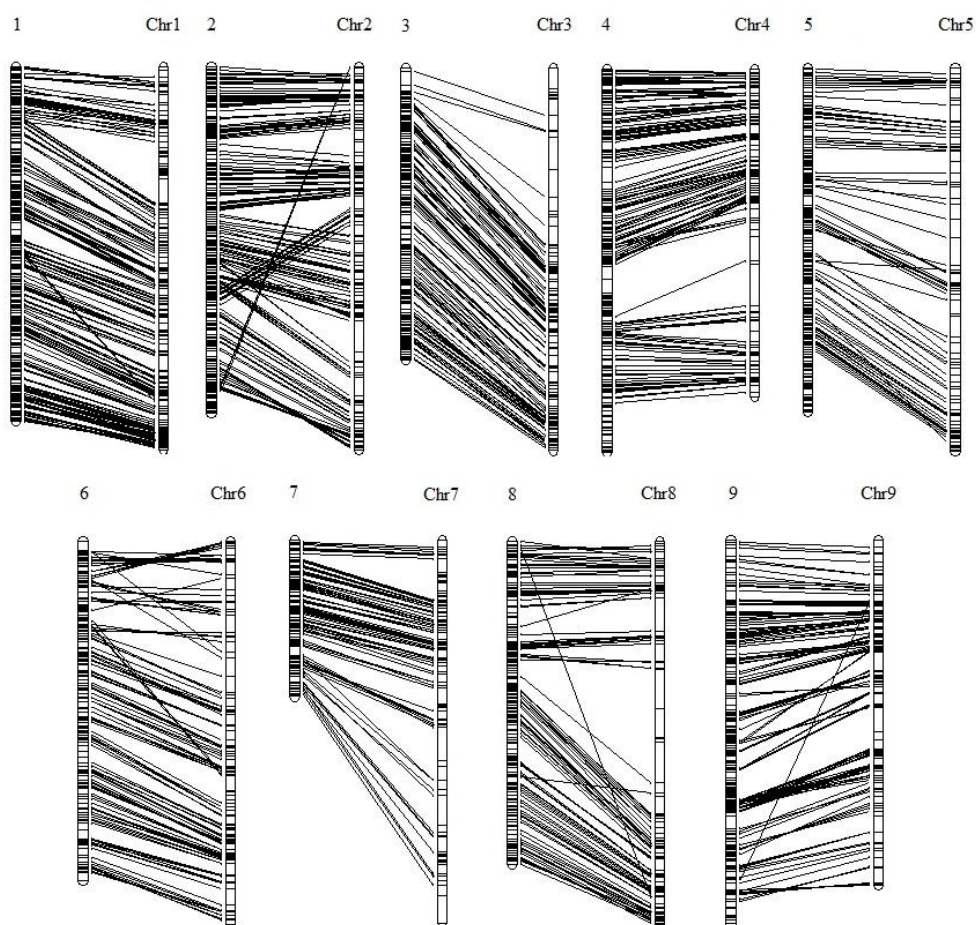
O grupo de ligação 10 do mapa da *C. sunki*, foi o único que não apresentou sintenia com nenhum cromossomo, verifica-se que esse grupo é bem pequeno (59 marcadores em 30,98 cM), logo, esses marcadores estão muito próximos entre si. Assim, podemos considerá-lo um grupo distinto, porém provavelmente ele faça parte de algum outro grupo.



**Figura 9.** Comparação entre as posições dos marcadores dispostos nos grupos de ligação do mapa de ligação de *P. trifoliata* e dos pseudocromossomos de *C. sinensis* (Chr). Os grupos de ligações estão representados por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8a, 8b e 9, enquanto os Chr1, Chr2, Chr3, Chr4, Chr5, Chr6, Chr7, Chr8 e Chr9 representam os cromossomos do genoma de *C. sinensis*. As linhas na horizontal que ligam os grupos e os cromossomos representam a ordenação e colinearidade dos marcadores ancorados no mapa com as sequências do genoma.



**Figura 10.** Comparação dos grupos de ligação construídos com o genoma de *C. sinensis*, disponível em: <http://citrus.hzau.edu.cn/orange/>. À esquerda as siglas SLG (SLG1, SLG2, SLG3, SLG4, SLG5, SLG6, SLG7, SLG8, SLG9 e SLG10) representam os grupos de ligação construídos para o mapa de *C. sunki*. Já as abreviações Chr (Chr1, Chr2, Chr3, Chr4, Chr5, Chr6, Chr7, Chr8 e Chr9), à direita, ilustram os cromossomos do genoma de referência utilizado, sendo que Chr *Un* (Chr *unassigned*) é um segmento do genoma onde estão todas as sequências que não foram posicionadas nos pseudocromossomos. E o Chr N representa todas as sequências que não foram alinhadas no genoma de referência.



**Figura 11.** Comparação entre as posições dos marcadores dispostos nos grupos de ligação do mapa de ligação de *C. sunki* e dos pseudocromossomos de *C. sinensis* (Chr). Os grupos de ligações estão representados por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, enquanto os Chr1, Chr2, Chr3, Chr4, Chr5, Chr6, Chr7, Chr8 e Chr9 representam os cromossomos do genoma de *C. sinensis*. As linhas na horizontal que ligam os grupos e os cromossomos representam a ordenação e colinearidade dos marcadores ancorados no mapa com as sequências do genoma.

## 5.2. Quantificação da Bactéria (CLas) e de Amido

Como mencionado no item material e métodos, para inferir a quantidade de CLas nas amostras, foram levados em consideração dois parâmetros: os valores de Ct e o log n<sup>o</sup> de cópias de 16S. A quantificação da bactéria foi realizada nas amostras controle, e nenhuma apresentou a bactéria, como esperado. A quantificação de amido foi avaliada nos dois grupos, nos indivíduos sem inoculação

(Controles) e com inoculação (Inoculados) e o resultado é apresentado em mg de Glicose/g de peso seco.

Com esses resultados foi possível realizar a estimativa dos parâmetros genéticos (herdabilidade, variâncias e coeficientes de variação) para as variáveis mensuradas (quantificação da bactéria e quantificação de amido) dois anos após a inoculação (Tabela 5).

No grupo inoculado, em relação à quantificação de amido e bactéria foram observados valores elevados de herdabilidade ( $h^2$ ) de 84% para amido, 62% para o Ct, 55% para log e a variabilidade genotípica ( $Vg$ ) observada foi de 23,8 para o Ct, 2,1 para log e 829,5 para amido, expressa pelo coeficiente de variação genotípica ( $CV$ ) que foi de 19% para os valores de Ct, 29% para log e 61% para amido.

Para a quantificação de amido, observou-se que no controle, a  $Vg$  é baixa, assim como o  $CVg$  e a  $h^2$ , significando que sob ausência de doença não é expressa uma variabilidade genotípica para acúmulo de amido. Entretanto, quando esses mesmos indivíduos são inoculados com a bactéria CLas observa-se uma grande variação na quantificação de amido entre os indivíduos.

A análise de dados indicou que os experimentos foram bem conduzidos. Essa confiabilidade é especialmente evidente nos valores do coeficiente de variação que foram de 15,05 a 26,93% (Tabela 5).

As estimativas das variâncias genéticas para a progênie foram superiores às variâncias de ambiente para os dados em estudo. Elevados valores de herdabilidade e variabilidade genotípica indicam que a seleção de plantas resistentes na progênie pode ser realizada com sucesso, isto é, os híbridos apresentam variabilidade genética adequada para seleção.

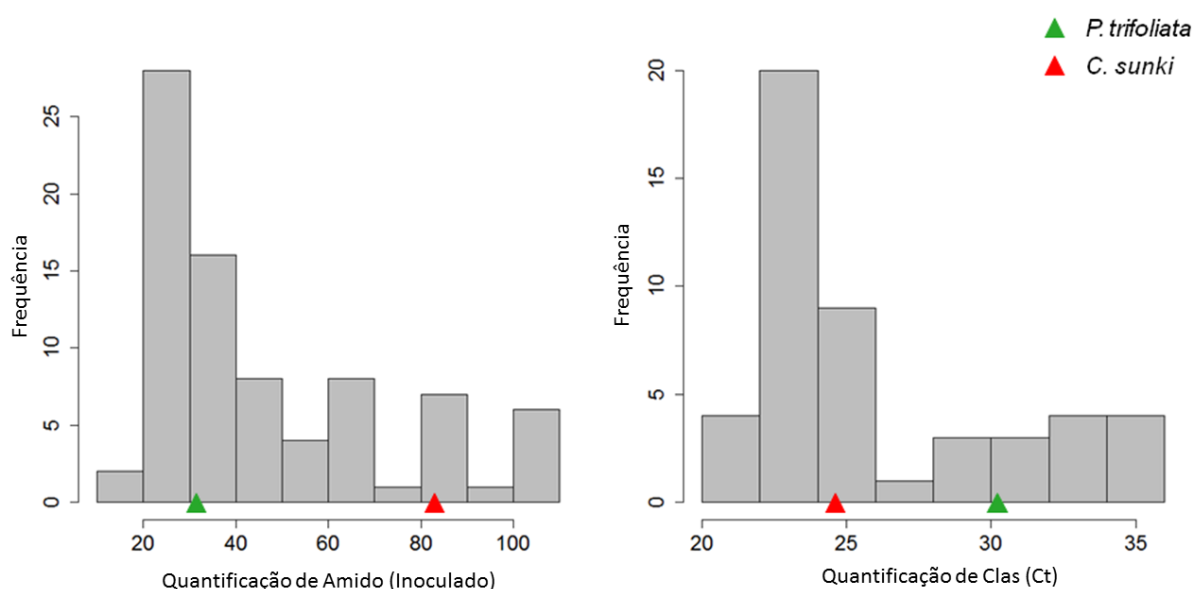


**Tabela 5.** Estimativas das variâncias, herdabilidade, coeficientes de variação e médias ajustadas para a quantificação da bactéria (valor de Ct e log do nº de moléculas 16S) e quantificação de amido (grupo controle e inoculado).

Características		Média	Vg	Ve	Vf	h <sup>2</sup> (%)	CVg (%)	CVr (%)
Quant. CLas	Ct	25,36	23,77	14,56	38,33	62,01	19,22	15,05
	log	5,0428	2,157	1,771	3,93	54,91	29,12	26,39
Quant. Amido	Con.	18,03	5,84	30,85	36,69	15,91	13,40	30,81
	Inoc.	46,92	829,50	159,70	989,20	83,86	61,38	26,93

Vg = variação genotípica; Ve = variação ambiental; Vf = variância fenotípica; h<sup>2</sup>= herdabilidade; CVr = coeficiente de variação do resíduo; CVg = coeficiente de variação do genótipo.

Os histogramas de distribuição das médias para a quantificação de CLas (valores de Ct) e quantificação de amido (grupo inoculado) estão apresentados na figura 12. Observa-se que, para as duas características, têm-se híbridos superiores e inferiores às médias dos genitores. Entre os genitores, o que apresentou menor valor de quantificação de amido foi o *P. trifoliata*, com um valor de Ct mais alto do que no genitor *C. sunki*, que tem maior concentração de amido e menor valor de Ct.

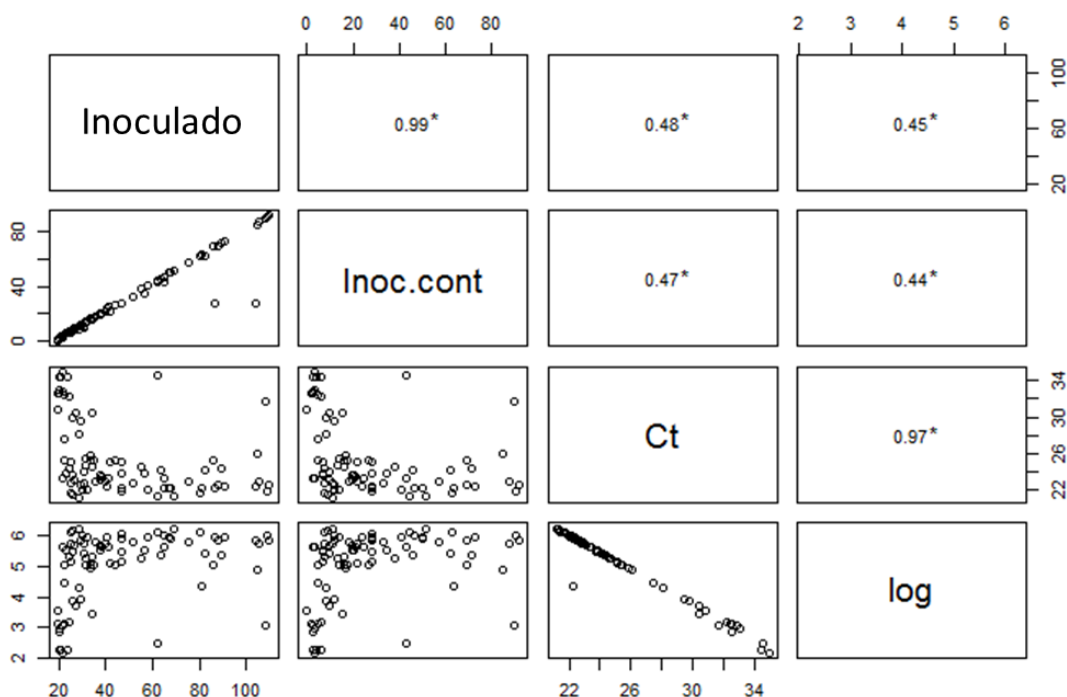


**Figura 12.** Histogramas das médias: à esquerda, quantificação de amido no grupo inoculado (mg de glicose/g de peso seco) e à direita, quantificação de CLas (valores de Ct). Em vermelho, o genitor feminino (*C. sunki*) e em verde, o genitor masculino (*P. trifoliata*).

Na figura 13, são apresentadas as correlações de Spearman e a dispersão dos dados, quantificação de CLas (valores de Ct e log do nº de cópias do 16S) e quantificação de amido no grupo inoculado e no inoculado corrigido pelo controle. A correlação de Spearman é uma versão alternativa à usual correlação de Pearson, utilizada para dados não paramétricos, que não pressupõem distribuição normal nem relações lineares (NOGARA NETO et al., 2011).

Observa-se uma correlação muito próxima entre a quantificação de amido no grupo inoculado, e no mesmo corrigido pelo controle, mostrando que a quantificação de amido no grupo controle não apresenta variações entre os híbridos, o que é corroborado quando se observa o baixo valor de  $V_g$  (Tabela 5).

Para a quantificação de CLas os valores de Ct são inversamente proporcionais ao log (Figura 13), ou seja, quanto maior o valor de Ct menor o título da bactéria na planta. E a quantificação de amido e bactéria tem correlações significativas para as quatro variáveis analisadas variando de 0,44 a 0,48.



**Figura 13.** Coeficientes de correlação e dispersão dos dados fenotípicos para a quantificação de bactérias (Ct e log) e quantificação de amido (Inoculado e Inoc.cont) (\* valor de  $p < 0,001$ ).

Na figura 14, apresenta-se o resultado da Análise de Componentes Principais (ACP) ou *Principal Component Analysis (PCA)*, os dois primeiros PC, apresentados na figura 14, explicam aproximadamente 98% da variação total dos dados, em que PC1 foi responsável por 66% e o segundo, PC2, por 32% da variação dos dados. Assim, foi possível reduzir o número de variáveis e dividir a população em grupos.

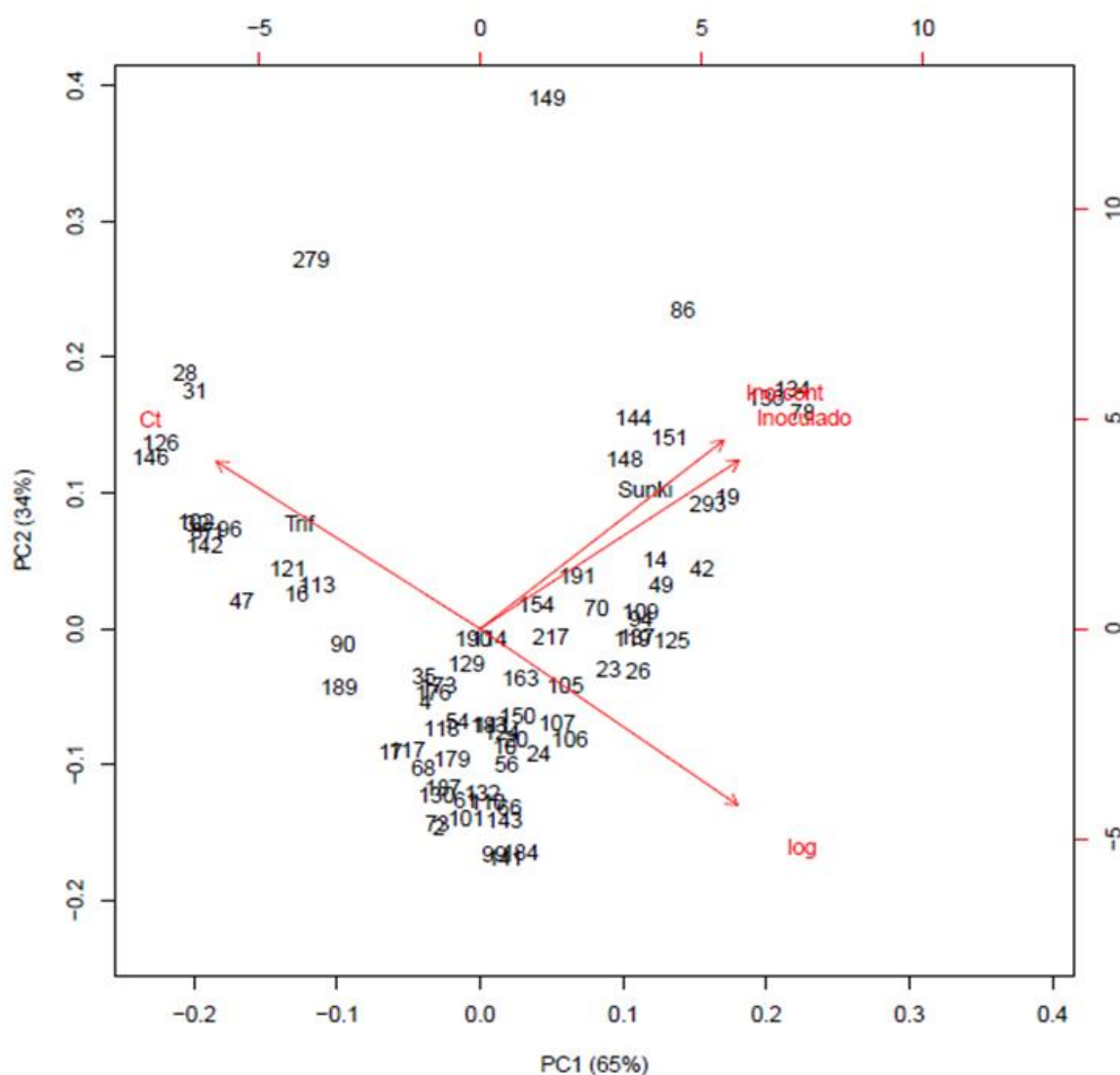
Os 79 híbridos foram divididos em três grupos levando-se em consideração o resultado do ACP, que está relacionado à quantificação da bactéria e à alteração do amido frente à inoculação da bactéria (Apêndice 1). Sendo eles:

- Grupo resistente (R) composto por 14 híbridos e o genitor *P. trifoliata*: H1, H16, H28, H31, H32, H47, H87, H96, H102, H113, H121, H126, H142 e H146 (Apêndice 1) que estão próximas ao vetor Ct (Figura 14), o que significa que apresentam valores elevados de Ct, sendo que o mesmo é inversamente proporcional à quantidade de bactéria na planta.

- Grupo tolerante (T) composto por 40 híbridos: H2, H4, H10, H17, H20, H24, H35, H54, H56, H61, H66, H68, H73, H90, H99, H101, H105, H106, H107, H110, H111, H114, H117, H118, H124, H129, H130, H132, H141, H143, H150, H163, H173, H176, H179, H183, H184, H187, H189 e H190 (Apêndice 1). Estas estão abaixo do vetor Ct - log (Figura 14) e distantes dos vetores de quantificação de amido. Isto significa que estas amostras apresentam a bactéria, mas não apresentam ou apresentam baixa alteração na quantidade de amido entre o controle e o inoculado.

- Grupo suscetível (S) composto por 23 híbridos e o genitor *C. sunki*: H14, H19, H23, H26, H42, H49, H70, H78, H86, H94, H105, H109, H119, H125, H134, H136, H137, H144, H148, H151, H154, H191, H217 e H293 (Apêndice 1). Estas se encontram acima dos vetores Ct - log e próximas dos vetores de quantificação de amido. Isto significa que estas plantas têm altas concentrações de CLAs e grande alteração na quantificação de amido.

Os indivíduos 149 e 279, não se enquadram em nenhum grupo, tendo altos valores de Ct e grande alteração de amido.



**Figura 14.** Biplot dos componentes principais (PC). Para a quantificação de CLas têm-se os valores de Ct (Ct) e o log do nº de cópias do 16S de CLas (log). Para a quantificação de amido mostra-se o grupo inoculado (Inoculado) e o grupo Inoculado corrigido pelo controle (Ino-cont).

As concentrações de CLas mais elevadas foram observadas em *C. sunki* em relação a *P. trifoliata*. Além disso, pode-se observar uma grande variação no título da bactéria entre os 79 diferentes híbridos. Resultado consistente com o que foi observado em outros trabalhos, em que o *P. trifoliata* e alguns de seus híbridos aparecem como mais tolerantes/resistentes à infecção por CLas (FOLIMONOVA et al., 2009; BOSCARIOL-CAMARGO et al., 2010; ALBRECHT; BOWMAN, 2012; BOAVA et al., 2015, 2017). Sendo que os híbridos H1, H28, H31, H32, H47, H87, H96, H102, H121, H126, H142 e H146 apresentam-se superiores ao genitor *P.*

*trifoliata*, com valores de bactéria e de amido inferiores a tal genitor. Mostrando segregação transgressiva nestes híbridos em comparação com a resposta de *P. trifoliata*.

Boava et al. (2017) realizaram um estudo com 15 híbridos dessa população aos 18 meses de inoculação com a bactéria, e classificaram-nos nos mesmos três grupos com relação à quantificação de bactéria e de amido, resistente (H31, H90 e H118), tolerante (H66 e H102) e suscetível (H4, H19, H24, H35, H54, H111, H117, H119, H124 e H217). Após os dois anos de inoculação com o patógeno, o híbrido H31 mostrou-se resistente confirmando o resultado encontrado por Boava et al. (2017), outros dois híbridos (H90 e H118), que aos 18 meses de inoculação eram resistentes, passaram a ser tolerantes. O híbrido H66 permaneceu como tolerante e o H102 que antes era tolerante, no presente trabalho foi classificado com resistente, o que pode ser explicado de duas formas: a planta está respondendo frente ao patógeno e/ou a bactéria não foi detectada, pois tem distribuição irregular na planta. Segundo Teixeira et al. (2008), CLas não tem uma distribuição uniforme em plantas de citros, o que dificulta detecção da bactéria nos tecidos das plantas. Sete híbridos (H4, H24, H35, H54, H111, H117 e H124), que aos 18 meses foram classificados como suscetível, aos 24 meses foram classificados como tolerante, mostrando que esses híbridos estão respondendo frente ao patógeno, e os outros três (H19, H119 e H217) permaneceram como suscetíveis.

Boava et al. (2015) estudaram os híbridos da mesma população desse trabalho, em condições de campo, onde, também, diferenças foram observadas na multiplicação de CLas em ambos os genitores e na progênie. Porém as evidências não conseguiam responder se a tolerância de *P. trifoliata* e seus híbridos eram em relação à bactéria e/ou ao psílideo, visto que alguns estudos mostram que os psílideos apresentam menor preferência a *P. trifoliata*, o que resulta em plantas expostas a menor quantidade de inóculo (RICHARDSON; HALL, 2014; HALL et al., 2015). Com estudos em casa de vegetação, onde a fonte de inóculo é uma borbulha infectada prova-se que essa tolerância, é devida, também, à bactéria, o que torna os híbridos de *C. sunki* e *P. trifoliata*, que apresentam resultados superiores aos do genitor tolerante, interessantes para estudo em campo, o que pode levar ao desenvolvimento de novas variedades comerciais de citros com tolerância ao HLB.

Os maiores valores para a quantificação de CLas e concentração de amido foram encontrados em *C. sunki* e nos híbridos do grupo suscetível, quando

comparadas as plantas inoculadas com o controle. Os altos valores de acúmulo de amido no parênquima foliar sugere que a função do floema, nestes genótipos, foi afetada pela infecção de CLas e que a mobilização de açúcares a partir de tecidos fotossintetizantes estavam alterados, confirmando resultados obtidos por outros autores que relataram que a indução de acúmulo de amido por CLas ocorreu em folhas de genótipos suscetíveis (KIM et al., 2009; FAN et al., 2010; KOH et al., 2012; ARITUA et al., 2013; BOAVA et al., 2015, 2017).

Segundo Westbrook et al. (2011), caracterizar o mecanismo pelo qual os agentes patogênicos se manifestam em diferentes genótipos da planta hospedeira é importante para auxiliar no controle da doença. Com tal finalidade, pode-se utilizar os resultados fenotípicos relacionados às respostas à infecção de CLas nos híbridos, tais como; a quantificação da bactérias e amido nas folhas, e associá-los a estudos moleculares, propiciando a obtenção de resultados que podem auxiliar na compreensão da base do controle/infecção do HLB. Uma forma de correlacionar estes resultados seria através do mapeamento de regiões que estatisticamente estariam relacionadas com o controle da doença em citros, os QTLs.

### **5.3. Expressão Gênica**

Os BLUPs dos *Foldchange* para os 14 genes candidatos, se encontram no Apêndice 2. Com esses resultados foi possível realizar a estimativa dos parâmetros genéticos: herdabilidade, variâncias e coeficientes de variação (Tabela 6) utilizando-se da metodologia de modelos mistos.

Foram observados valores elevados de herdabilidade ( $h^2$ ) variando entre 0,50 a 0,99. A variabilidade genotípica ( $V_g$ ) observada foi de 0,66 a 1101,5, expressa pelo coeficiente de variação genotípica (CV) que foi de 67% a 244%.

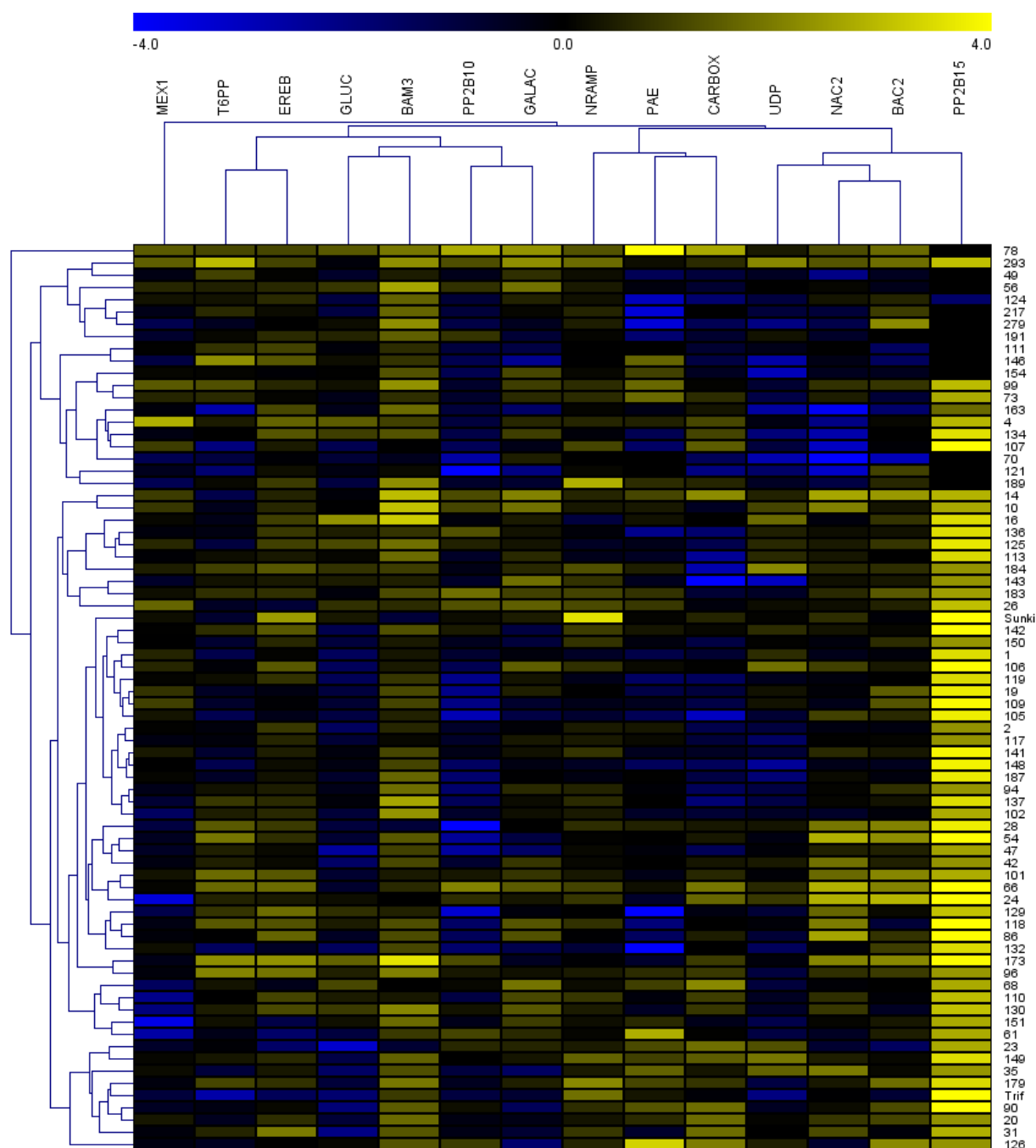
**Tabela 6.** Estimativas das variâncias genóticas e fenotípicas, herdabilidade e coeficientes de variação para a expressão gênica.

<b>Genes</b>	<b>Vg</b>	<b>Vf</b>	<b>h<sup>2</sup> (%)</b>	<b>CVr (%)</b>	<b>CVg (%)</b>
UDP	0,93	0,96	96,62	17,08	91,36
T6PP	1,64	1,69	97,32	14,87	89,60
CARBOX	1,69	1,70	99,46	7,36	99,66
PAE	6,41	6,47	99,04	17,08	173,52
GLUC	0,66	0,71	93,77	21,08	81,77
GALAC	1,20	1,22	98,23	9,90	73,86
BAM3	4,34	4,41	98,41	9,41	73,94
MEX1	0,88	0,91	96,19	16,66	83,66
BAC2	1,97	1,98	99,07	7,65	79,12
NRAMP	4,79	9,57	50,01	131,39	131,41
EREB	1,41	2,06	68,63	45,93	67,93
NAC2	2,77	2,78	99,66	5,63	95,71
PP2B15	1101,50	1699,00	64,83	180,26	244,76
PP2B10	1,10	1,13	97,56	16,64	105,23

Vg = variância genotípica; Vf = variância fenotípica; h<sup>2</sup>= herdabilidade; CVr = coeficiente de variação do resíduo; CVg = coeficiente de variação do genótipo.

O *heatmap* (Figura 15), a partir da análise comparativa feita pelo teste de agrupamento hierárquico (HCL – Hierarchical clustering), utilizando o *Foldchange* transformado em log na base 2 (*Log<sub>2</sub>Foldchange*) dos 14 genes-alvo avaliados com os 74 genótipos selecionados (72 híbridos e seus dois genitores), permitiu a ordenação dos genes e amostras mais relacionadas, isto é, com perfis de expressão gênica similares, utilizando a correlação de Pearson como distância métrica para a obtenção do melhor agrupamento intra e intervariáveis possível.

Os dados de *Log<sub>2</sub>Foldchange* variaram de -6,27 a 7,39, os genes com um padrão global de expressão predominantemente amarelo, como o PP2B15, EREB e o BAM3, foram mais expressos na população do experimento, ou seja, induzidos. Por outro lado, os genes com um padrão global de expressão predominantemente azul significa que a grande maioria dos genótipos analisados tem o gene reprimido. Pode-se observar que os genes que se enquadraram nessa categoria, foram os PP2B10, UDP e GLUC.



**Figura 15.** *Heatmap* do perfil de expressão gênica global pela análise de agrupamento entre os 14 genes-alvo avaliados com os 74 genótipos selecionados (72 híbridos, mais os genitores: *P. trifoliata* (Trif) e *C. sunki* (Sunki)).

Com relação aos genes, o MEX1 ficou isolado, esse gene está envolvido na degradação de amido e é importante no transporte de maltose. Os genes EREB e T6PP formaram um grupo e são genes envolvidos em processos metabólicos, o primeiro do etileno e o segundo da trealose. Foi formado outro grupo com os genes GALAC, BAM3, GLUC e PP2B10, os três primeiros estão relacionados ao processo



metabólico de carboidrato, enquanto o último com a funcionalidade do floema. Os genes CARBOX, PAE e NRAMP, formaram também um grupo, sendo que o CARBOX e o PAE são genes envolvidos em atividade de hidrolase e o NRAMP em transporte de íons de metais. E o último grupo foi formado pelos genes UDP, NAC2, BAC2 e PP2B15, o gene UDP é relacionado aos processos metabólicos de glicose, enquanto a BAC2 de transporte transmembrana, a NAC2 e PP2B15, são fatores de transcrição, sendo esse último envolvido na funcionalidade do floema.

Em relação aos genótipos, constatou-se que a *C. sunki*, descrita na literatura como suscetível ao HLB, ficou em um grupo afastado do *P. trifoliata* (tolerante ao HLB). Além disso, o *P. trifoliata* formou um grupo com os híbridos considerados como tolerantes H20, H35, H90 e H179 e com os híbridos H31 e H126 que foram considerados resistentes. E os híbridos considerados como suscetíveis H19, H94, H105, H109, H119, H137 e H148 estão no mesmo grupo que o genitor *C. sunki*.

Na tabela 7, são apresentados os resultados das análises de correlação linear de Pearson por agrupamento para cada gene-alvo avaliado, na tentativa de observar o grau de envolvimento entre os dados fenotípicos de lesão e os valores de expressão gênica e, assim, inferir sobre quais genes podem apresentar maior papel na resposta de defesa frente ao patossistema HLB-citros.

As correlações que mostraram valor de p significativo com valor de r (Pearson) positivo permitem concluir que há uma relação linear positiva entre os dados fenotípicos (amido e/ou CLas) e os valores de *Foldchange*, ou seja, são diretamente proporcionais (quanto maior for o valor da expressão relativa para um dado gene, maior será o valor do fenótipo). Já as correlações que apresentaram um valor de p significativo com um valor de r (Pearson) negativo indicam uma relação linear negativa, demonstrando uma força atrativa inversamente proporcional (quanto maior for o valor da expressão relativa para um dado gene, menor será o valor do dado fenotípico) (LIMA, 2016).

O valor r (Pearson) sugere a força da relação entre as variáveis, variando de -1 a 1, sendo que, quanto mais próximo de 1 for o valor de r (Pearson), maior é a dependência estatística observada pela relação linear entre as variáveis (MOORE et al., 2010).

**Tabela 7.** Correlações de Pearson para os grupos R (resistente), T (tolerante) e S (suscetível) para os 14 genes candidatos avaliados com os dados fenotípicos, quantificação de CLas (Ct) e quantificação de amido no grupo inoculado.

Genes	Grupo R		Grupo T		Grupo S	
	Amido	CLas	Amido	CLas	Amido	CLas
T6PP	0,120	0,122	-0,086	-0,175	0,228	-0,060
UDP	-0,079	-0,084	0,096	-0,038	0,050	-0,274
GLUC	0,685	-0,014	-0,221	0,176	0,375	-0,138
GALAC	0,142	-0,842**	-0,089	-0,421**	0,374	-0,055
BAM3	0,034	-0,550	-0,105	0,204	0,138	-0,075
MEX1	0,194	-0,432	0,071	-0,116	0,043	-0,406*
PP2B15	-0,350	-0,292	0,188	-0,054	0,174	0,367
PP2B10	0,404	-0,237	0,027	-0,230	0,324	-0,224
EREB	-0,182	0,007	0,198	-0,160	0,387	0,301
CARBOX	0,401	0,425	0,090	-0,115	0,287	-0,102
PAE	0,535	0,407	-0,322*	-0,039	0,296	-0,179
NRAMP	-0,355	0,251	-0,083	0,064	0,084	0,185
NAC2	-0,067	0,463	0,170	-0,212	0,220	0,271
BAC2	0,545	0,477	0,097	-0,108	0,157	-0,126

\* valor de  $p < 0,05$ ; \*\* valor de  $p < 0,01$ .

O gene GALAC apresentou um valor de  $p$  significativo e um valor de  $r$  (Pearson) negativo para os grupos R e T na característica CLas (Ct), o que corrobora para o fato de que quanto menor for o valor da expressão relativa (*Foldchange*) nos genótipos resistentes/tolerante, maior será o valor de Ct, ou seja, menor a quantificação da bactéria. Isso leva a inferir, que a baixa expressão relativa desse gene tem relação com a baixa quantidade de CLas nas plantas. Sendo que o valor  $r$  (Pearson) foi maior no grupo R, -0,842, o que evidencia uma correlação forte (Tabela 7). Como um gene de processo catabólico de celulose, a  $\beta$ -galactosidase (GALAC) também pode desempenhar um papel durante a abscisão e processos de crescimento e desenvolvimento em flores e frutos (WU; BURNS, 2004).

O gene PAE apresentou um valor de  $r$  (Pearson) negativo e um valor de  $p$  significativo para amido no grupo tolerante, ou seja, quanto maior sua expressão menor a quantidade de amido na planta frente à inoculação com a bactéria. O gene PAE desempenha um papel no controle das propriedades mecânicas da parede celular (PHILIPPE et al., 2017). E tem contribuição potencial para o controle de interações planta-patógeno em resposta a uma variedade de estresses bióticos,

incluindo a penetração de fungos biotróficos e necrótrofos, desempenhando um papel importante na defesa da planta (PHILIPPE et al., 2017).

O gene MEX1 teve uma correlação negativa significativa com a quantificação de CLas (Ct) no grupo S. E segundo Fan et al. (2010), a abundância de transcrições para MEX1 são menores em folhas infectadas do que em folhas não infectadas e juntamente com a redução da maltose, sugere-se que o comprometimento da degradação do amido pode contribuir para a acumulação de amido nas folhas infectadas.

#### 5.4. Mapeamento de QTLs

Os dados fenotípicos foram utilizados para o mapeamento de QTLs. Sendo que para inferir sobre a multiplicação da bactéria utilizamos os valores de Ct e para a quantificação de amido utilizamos os dados dos dois grupos controle e inoculado, nos mapas de *C. sunki* e *P. trifoliata*.

No mapa do *P. trifoliata*, foram localizados oito QTLs para os valores de Ct e três para a quantificação de amido no grupo controle e seis no grupo inoculado (Tabela 8 e Figura 16). Enquanto no mapa de *C. sunki*, foram localizados quatro QTLs para amido no grupo controle, dois no grupo inoculado e três para CLas (Ct) (Tabela 9 e Figura 17).

Para a quantificação de amido, os QTLs encontrados no grupo controle foram em resposta aos fenótipos da população e não têm o efeito da infecção com a bactéria. Observa-se, também, que os QTLs no grupo controle são totalmente diferentes daqueles encontrados no grupo inoculado, o que pode ser justificado, devido à maior variabilidade dos resultados frente à inoculação com a bactéria.

Foram considerados QTLs robustos aqueles com LOD acima do LOD-score crítico, calculado por meio do teste de permutação para cada característica mapeada, sendo que no mapa de *P. trifoliata* variou de 2,44 a 2,60 e para a *C. sunki* variou de 2,66 a 2,99. O intervalo de confiança adotado para evidenciar a presença de QTLs foi o de 95%. No mapa de *P. trifoliata*, os *LOD-Scores* dos QTLs detectados variaram de 2,70 a 11,16, os valores de variação fenotípica ( $R^2$ ) explicada pelos marcadores variaram de 1,19 a 15,69% (Tabela 8). E no mapa de *C. sunki* os *LOD-Scores* variaram de 3,54 a 11,18 e o  $R^2$  de 0,46 a 11,62% (Tabela 9), evidenciando regiões consistentes.

No mapa de *P. trifoliata*, foram encontrados oito QTLs para quantificação de CLas (Ct), localizados nos grupos de ligação 1 (56,11 cM), 2 (120,08 cM), 4 (257,93 cM), 6 (160,72 cM), 7 (137,28 cM), 8 (2,92 cM), 9 (39,58 cM) e 10 (215,88 cM), quando analisados em conjunto explicam 55,01% da variação fenotípica. Para a quantificação de amido, no grupo controle foram encontrados três QTLs nos grupos de ligação 2 (267,25 cM), 6 (28,95 cM) e 7 (177,00 cM), que explicam 11,38% da variação fenotípica. E, no grupo inoculado foram detectados seis QTLs nos GL 1 (122,00 cM), 2 (149,59 cM), 3 (85,61 cM), 5 (381,53), 6 (209,35 cM) e 10 (95,30 cM), com  $R^2$  de 41,49% (Tabela 8). No grupo de ligação 2, sobrepõem-se QTLs para as 3 características e no GL 6 há outra região onde se sobrepõem QTLs de quantificação de CLas (Ct) e amido no grupo inoculado.

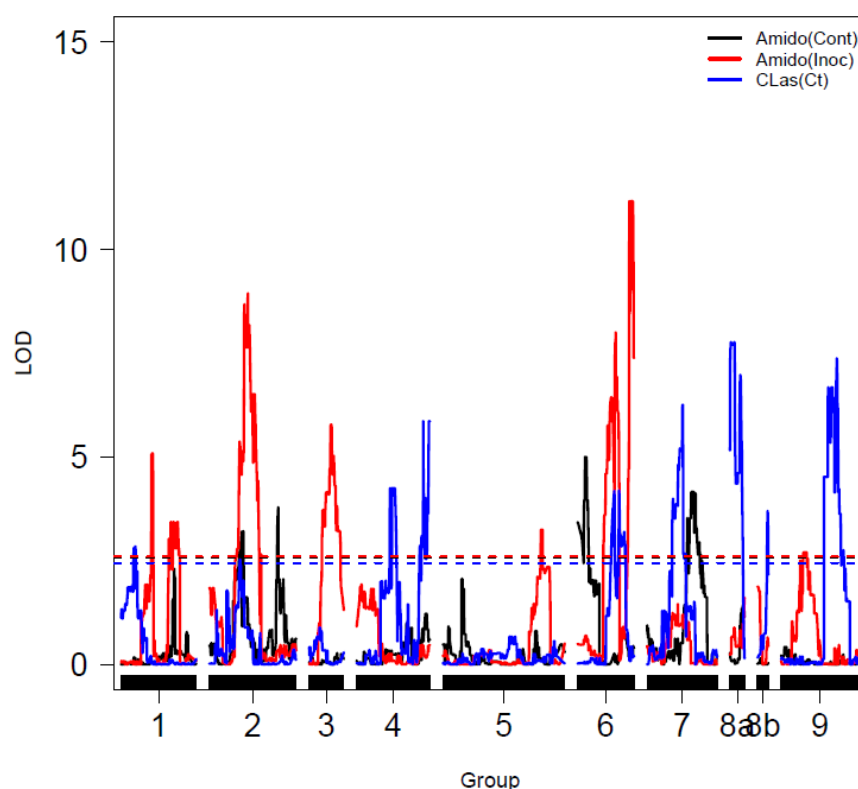
No mapa de *C. sunki*, foram encontrados três QTLs para quantificação de CLas (Ct), localizados nos grupos de ligação 5 (412,07 cM), 6 (13,48 cM) e 7 (105,12 cM), quando analisados em conjunto explicam 23,45% da variação fenotípica. Para a quantificação de amido, no grupo controle foram encontrados quatro QTLs nos grupos de ligação 5 (323,29 cM), 6 (171,36 cM), 7 (171,44 cM) e 8 (34,00 cM) que explicam 23,69% da variação fenotípica. E no grupo inoculado foram detectados dois QTLs nos GL 3 (127,39 cM) e 4 (0,84 cM), com  $R^2$  de 14,91% (Tabela 9).

Os QTLs de menor efeito são geralmente identificados em estudos onde a herança é poligênica e são responsáveis por menos de 10% da variação fenotípica (MARENGO, 2009). QTLs considerados de efeito moderado estariam na faixa de 10 a 30% da variação fenotípica (ASINS et al., 2004). QTLs de maior efeito são responsáveis por mais de 45% da variação fenotípica (BUDAHN et al., 2009). Sendo assim, todos os QTLs detectados nos mapas de *C. sunki* e *P. trifoliata* são de pequeno e moderado efeito.

**Tabela 8.** QTLs identificados a partir da quantificação de amido nos grupos controle (Cont.) e inoculado (Inoc.) e da quantificação de CLas (Ct) no mapa do *P. trifoliata*.

Características	Marcadores flanqueadores	GL	cM	LOD score	p	R <sup>2</sup>
Amido (Cont.)	100046231 F 0	2	267,25	4,54	-0,29	2,92
Amido (Cont.)	100041038 F 0	6	28,95	5,80	0,25	1,63
Amido (Cont.)	100063185 F 0-100033220 F 0	7	177,00	4,93	-0,23	6,83
Amido (Inoc.)	100032204 F 0-100035034 F 0	1	122,00	5,09	2,12	1,19
Amido (Inoc.)	100043207 F 0	2	149,59	8,94	-10,82	8,34
Amido (Inoc.)	100068766 F 0	3	85,61	5,78	9,92	10,30
Amido (Inoc.)	100066277 F 0	5	381,53	3,25	7,25	2,93
Amido (Inoc.)	100043581 F 0	6	209,35	11,16	-12,82	15,69
Amido (Inoc.)	100048556 F 0	10	95,30	2,70	6,28	3,04
CLas (Ct)	100036184 F 0	1	56,11	3,61	-0,92	1,25
CLas (Ct)	100079987 F 0	2	120,08	4,78	1,31	10,39
CLas (Ct)	100034430 F 0	4	257,93	4,13	-1,20	6,77
CLas (Ct)	100043664 F 0	6	160,72	5,00	-1,06	1,73
CLas (Ct)	100048658 F 0	7	137,28	7,12	1,41	7,60
CLas (Ct)	100125184 F 0	8	2,92	8,71	1,79	13,41
CLas (Ct)	100035369 F 0	9	39,58	4,47	-1,15	4,31
CLas (Ct)	100034525 F 0	10	215,88	8,27	-1,50	9,55

GL= grupo de ligação, cM= posição de início em *centimorgan* dos QTLs identificados, p= efeito dos QTLs no genitor *P. trifoliata*, R<sup>2</sup>= variação fenotípica explicada e expressa em percentual.

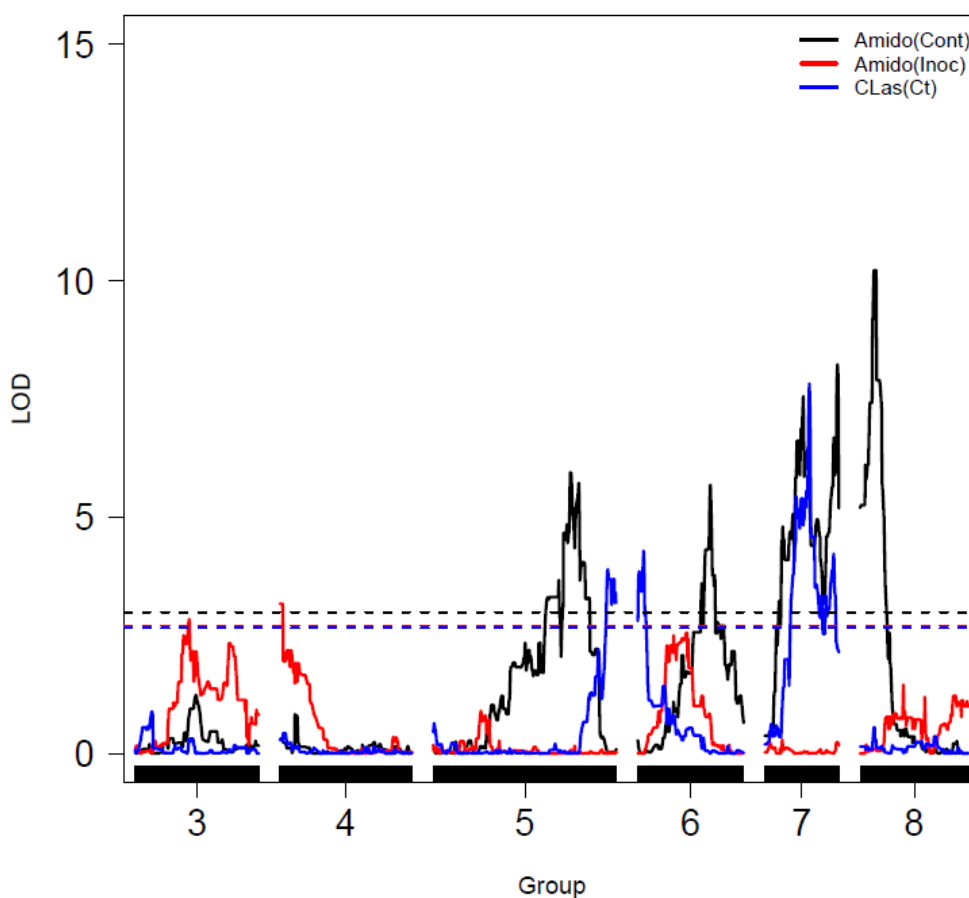


**Figura 16.** Em azul, QTLs associados à quantificação da bactéria (Ct), em vermelho, QTLs associado à quantificação de amido no grupo inoculado e em preto no grupo controle. No eixo Y estão os valores de LOD e no X os grupos de ligação do mapa de *P. trifoliata* (TLG1, TLG2, TLG3, TLG4, TLG5, TLG6, TLG7, TLG8a, TLG8b e TLG9). As linhas horizontais são os valores de LOD definidos pelo teste de permutação com 5% de significância.

**Tabela 9.** QTLs identificados a partir da quantificação de amido nos grupos controle (Cont.) e inoculado (Inoc.) e da quantificação de CLas (Ct) no mapa da *C. sunki*.

Características	Marcadores flanqueadores	GL	cM	LOD score	q	R <sup>2</sup>
Amido (Cont.)	100033230 F 0	5	323,29	6,79	-0,28	4,44
Amido (Cont.)	100173875 F 0	6	171,36	6,51	0,25	0,46
Amido (Cont.)	100009568 F 0	7	171,44	9,16	0,52	11,62
Amido (Cont.)	100197417 F 0	8	34,00	11,18	0,37	7,17
Amido (Inoc.)	100014756 F 0	3	127,39	3,54	-8,22	5,06
Amido (Inoc.)	100009269 F 0	4	0,84	3,88	-8,50	9,85
CLas (Ct)	100019677 F 0	5	412,07	4,65	1,21	7,97
CLas (Ct)	100047667 F 0	6	13,48	5,06	0,98	5,39
CLas (Ct)	100010739 F 0	7	105,12	8,73	-1,72	10,09

GL= grupo de ligação, cM= posição em *centimorgan* dos QTLs identificados, q= efeito dos QTLs no genitor *C. sunki*, R<sup>2</sup>= variação fenotípica explicada e expressa em percentual.



**Figura 17.** Em azul, QTLs associados à quantificação da bactéria (Ct), em vermelho, QTLs associado à quantificação de amido no grupo inoculado e em preto no grupo controle. No eixo Y estão os valores de LOD e no X os grupos de ligação do mapa de *C. sunki* (SLG3, SLG4, SLG5, SLG6, SLG7 e SLG8). As linhas horizontais são os valores de LOD definidos pelo teste de permutação com 5% de significância.

### 5.5. Mapeamento de eQTLs

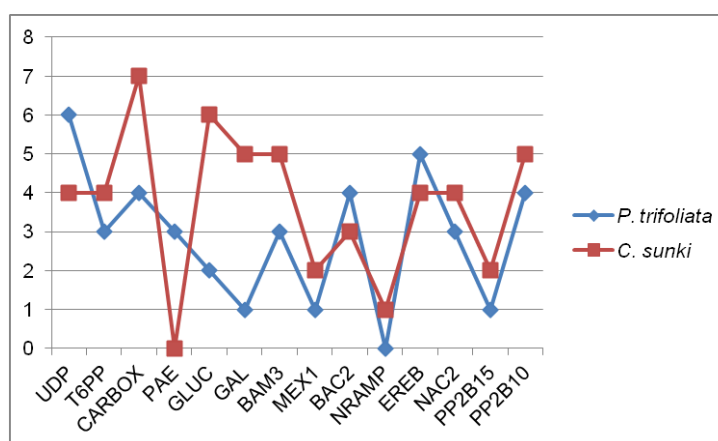
Assim como para o mapeamento de QTLs, a detecção de possíveis eQTLs foi feita para ambos os genitores em seus respectivos mapas, devido ao uso da estratégia *pseudo-testcross*. De acordo com a metodologia do mapeamento por intervalo composto (CIM), foi detectado um total de 92 eQTLs e com resultado significativo por meio do teste de 1000 permutações, sendo 40 para o mapa de *P. trifoliata*, com média de, aproximadamente, três eQTLs por gene; e 52 para o mapa de *C. sunki*, com média de, aproximadamente, quatro eQTLs por gene. O que se mostra consistente com Lima (2016), que também encontrou uma média maior de

eQTLs por gene para *C. sunki* (cinco) do que *P. trifoliata* (quatro). Apenas o gene NRAMP não apresentou eQTLs para o *P. trifoliata*, e o gene PAE para a *C. sunki*.

Segundo Shi et al. (2007), um alto poder de detecção de eQTLs pode ser encontrado mesmo em pequenas populações. Além disso, como a metodologia estabelecida pelo software para o mapeamento de QTLs é similar ao mapeamento de eQTLs, um tamanho populacional maior que 50 já é suficiente para proporcionar alta resolução à prática de mapear e detectar QTLs/eQTLs de pequeno efeito. Quanto maior for o tamanho da população, a saturação do mapa genético de ligação e a herdabilidade do carácter fenotípico, maior será a informação genômica relacionada ao mapeamento (YOUNG, 1994; CRUZ, 2006; YAN et al., 2009).

Como foi observada herdabilidade alta para as características fenotípicas, uma alta saturação dos mapas de cada genitor e sendo a população de híbridos selecionados para o mapeamento de eQTLs igual a 72, era de se esperar um grande número de eQTLs a partir dos perfis de expressão gênica diferencial para cada gene candidato. O gene UDP foi o que apresentou um maior número de eQTLs (seis) no mapa do genitor *P. trifoliata*, enquanto no mapa de *C. sunki* foi o gene CARBOX com sete eQTLs (Figura 18).

Os genes que apresentaram apenas um eQTL no mapa do *P. trifoliata* foram o GALAC, o MEX1 e o PP2B15, e para a *C. sunki* foi apenas o gene NRAMP.



**Figura 18.** Distribuição do número de eQTLs detectados para cada gene candidato com relação aos mapas dos genitores.

Nas tabelas 10 e 11, observam-se os resultados do mapeamento de eQTLs obtidos para os dois mapas dos genitores.



**Tabela 10.** eQTLs identificados a partir dos valores de expressão para os genes em estudo no mapa do *P. trifoliata*.

Genes	GL	Marcadores flanqueadores	cM	LOD score	q	R <sup>2</sup>
UDP	1	100035177 F 0	203,34	7,03	-0,45	16,48
UDP	3	100093859 F 0	122,92	3,57	-0,34	5,11
UDP	4	100053681 F 0	235,24	5,01	-0,38	7,89
UDP	5	100021313 F 0	389,57	5,03	0,32	5,91
UDP	8a	100050766 F 0	45,31	3,35	0,29	4,91
UDP	9	100038391 F 0	35,97	3,19	0,30	2,32
T6PP	3	100020866 F 0	122,19	4,50	0,35	6,15
T6PP	5	100031383 F 0	221,64	4,77	0,33	4,76
T6PP	7	100028454 F 0	55,31	3,33	0,27	1,90
CARBOX	2	100036881 F 0-100027763 F 0	136,00	3,30	-0,23	0,02
CARBOX	5	100044221 F 0	298,14	3,60	-0,52	18,85
CARBOX	7	100015910 F 0	142,39	9,77	0,44	0,08
CARBOX	8b	100035369 F 0	39,58	6,87	0,44	4,74
PAE	3	100057532 F 0	26,36	8,25	-0,55	2,81
PAE	4	100161318 F 0-100051462 F 0	243,00	5,25	-0,41	2,08
PAE	9	100058156 F 0	224,34	4,69	0,40	1,78
GLUC	5	100089610 F 0	439,67	3,99	0,18	5,49
GLUC	7	100049762 F 0	1,11	8,43	0,38	18,16
GALAC	8a	100056835 F 0	37,63	4,69	-0,35	4,06
BAM3	3	100029311 F 0-100036111 F 0	37,00	3,47	-0,42	0,10
BAM3	5	100046237 F 0	142,38	7,45	-0,64	0,19
BAM3	6	100076894 F 0-100039672 F 0	124,00	5,23	0,45	2,94
MEX1	2	100051584 F 0	56,37	5,25	-0,24	0,10
BAC2	2	100178691 F 0	282,10	5,66	0,53	8,36
BAC2	5	100033599 F 0	440,40	7,34	0,50	6,71
BAC2	6	100084313 F 0	186,33	4,98	-0,34	6,06
BAC2	9	100069113 F 0	301,90	17,61	0,74	12,59
EREB	2	100026276 F 0-100042757 F 0	250,00	3,01	0,19	1,36
EREB	4	100025526 F 0	213,62	4,40	-0,26	2,19
EREB	5	100045322 F 0	343,47	5,48	0,29	4,65
EREB	6	100032182 F 0	0,00	4,04	-0,29	1,55
EREB	7	100057022 F 0	108,45	6,91	0,39	5,76
NAC2	5	100183597 F 0	9,38	3,90	0,36	3,11
NAC2	7	100196998 F 0	1,11	3,44	-0,45	5,58
NAC2	9	100061705 F 0	43,66	3,59	-0,38	5,75
PP2B15	5	100080169 F 0	405,31	3,55	2,76	1,02
PP2B10	1	100056564 F 0	83,90	5,70	-0,31	7,36
PP2B10	5	100068714 F 0	385,75	5,96	-0,30	3,30
PP2B10	7	100044511 F 0	151,17	9,33	-0,31	4,62
PP2B10	9	100043903 F 0	42,56	4,25	0,20	2,16

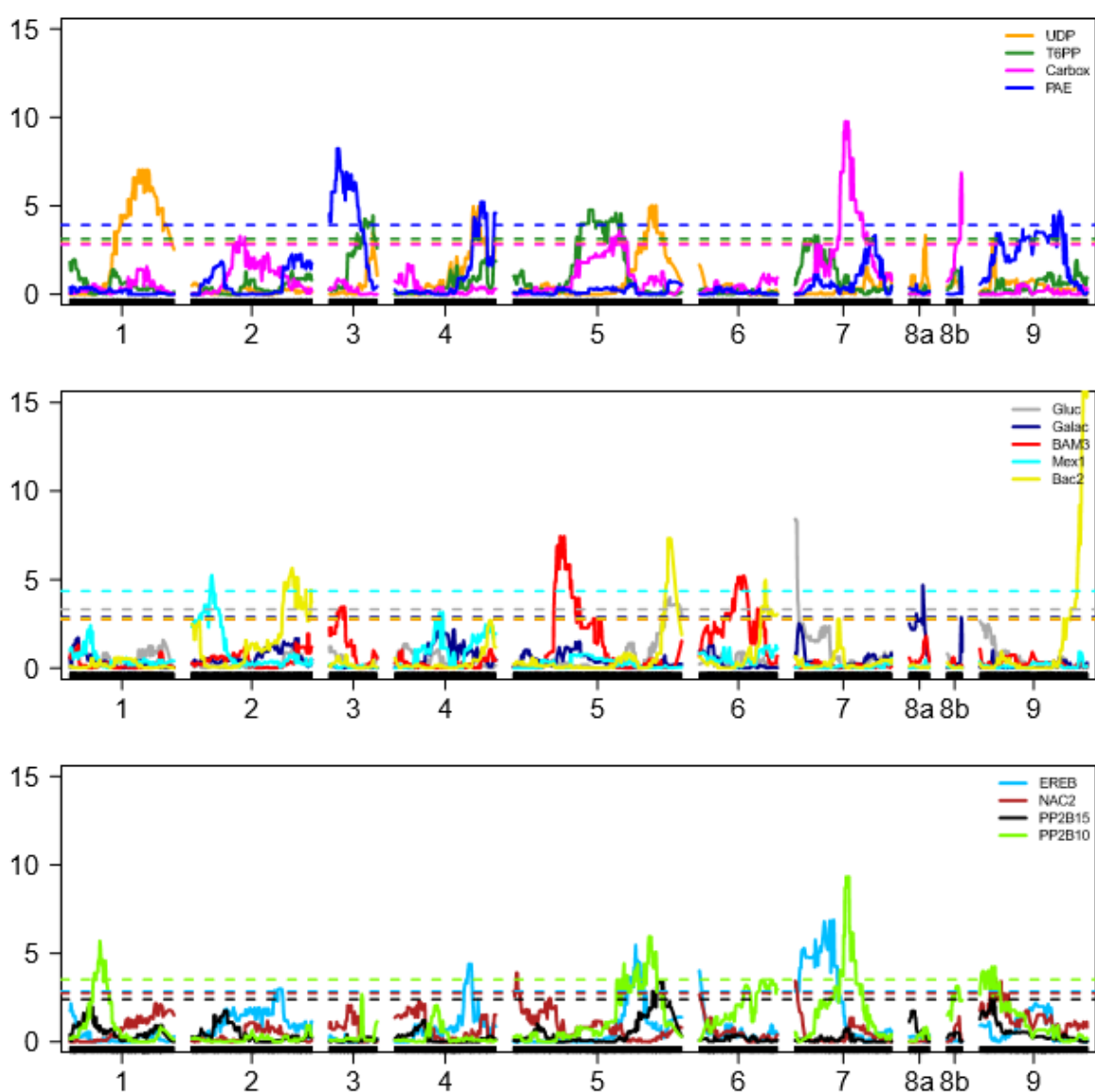
GL= grupo de ligação, cM= posição de início em *centimorgan* dos QTLs identificados, p= efeito dos QTLs no genitor *P. trifoliata*, R<sup>2</sup>= variação fenotípica explicada e expressa em percentual.

**Tabela 11.** eQTLs identificados a partir dos valores de expressão para os genes em estudo no mapa da *C. sunki*.

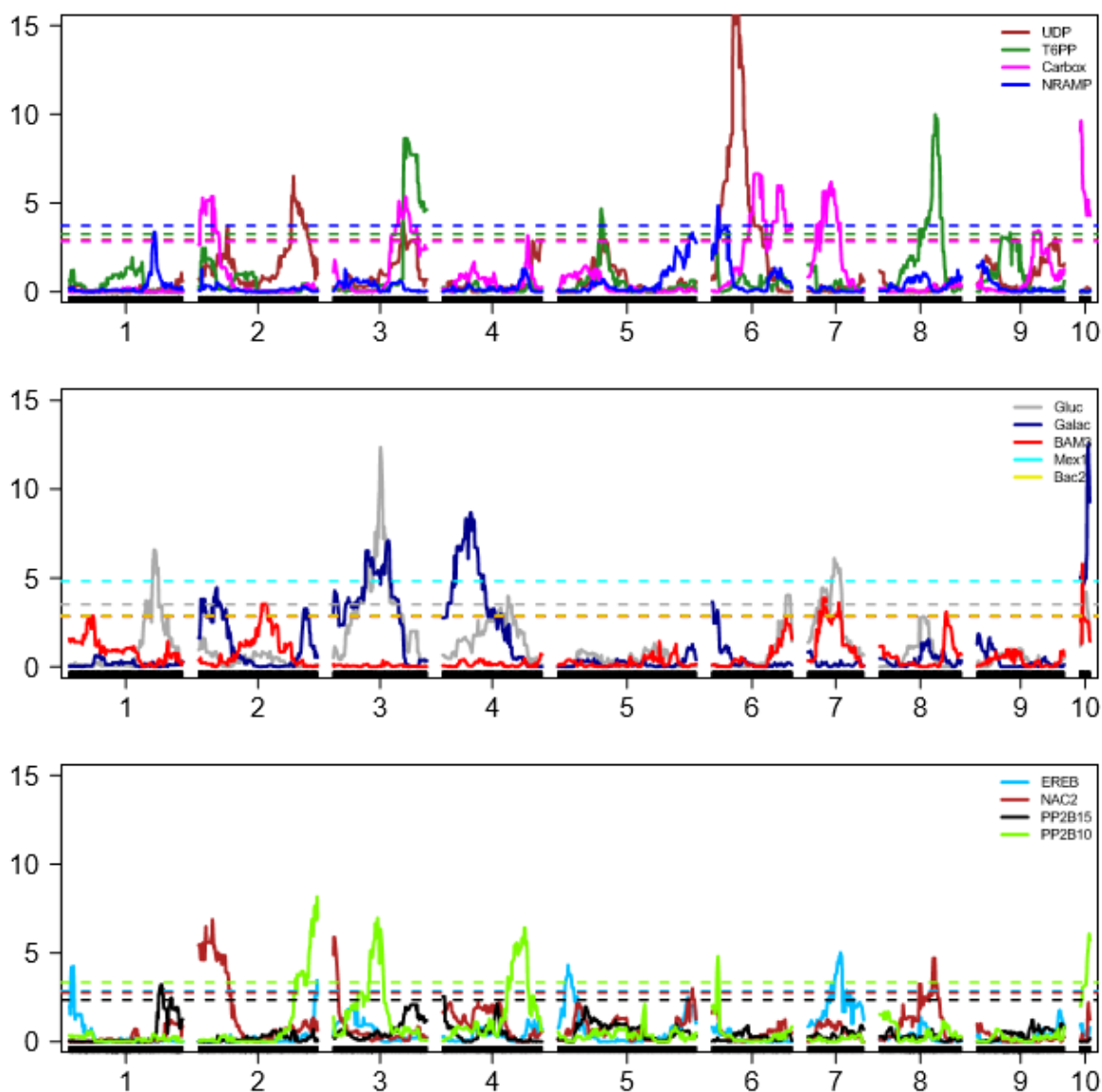
Genes	GL	Marcadores flanqueadores	cM	LOD score	q	R <sup>2</sup>
UDP	2	100016633 F 0	296,76	6,54	-0,37	10,72
UDP	3	100021476 F 0-100048216 F 0	217,00	3,91	-0,24	3,79
UDP	6	100197254 F 0	79,37	16,65	-0,59	20,34
UDP	9	100010814 F 0	244,35	3,04	0,23	3,71
T6PP	3	100011342 F 0	230,51	8,65	0,42	7,91
T6PP	5	100029469 F 0	135,55	4,69	-0,27	6,45
T6PP	8	100019860 F 0-100126693 F 0	174,00	10,01	0,39	5,09
T6PP	9	100063546 F 0	103,59	3,33	0,19	0,25
CARBOX	2	100005257 F 0	40,62	5,38	-0,43	6,92
CARBOX	3	100013218 F 0	227,02	5,34	-0,42	5,70
CARBOX	4	100005540 F 0	266,50	3,17	0,29	3,42
CARBOX	6	100034742 F 0-100046449 F 0	146,00	6,65	0,52	5,13
CARBOX	7	100026011 F 0	72,83	6,19	-0,43	9,38
CARBOX	9	100035814 F 0	191,91	3,47	-0,32	5,10
CARBOX	10	100201189 F 0-100137691 F 0	3,00	9,67	0,61	20,31
GLUC	1	100043790 F 0	266,68	6,58	0,21	5,41
GLUC	3	100043261 F 0	147,27	12,36	0,33	11,31
GLUC	4	100037909 F 0	205,99	3,98	-0,20	4,22
GLUC	6	100036283 F 0	243,14	4,03	0,17	7,52
GLUC	7	100013734 F 0	82,56	6,11	-0,19	7,63
GLUC	10	100202826 F 0	18,28	4,23	0,23	6,44
GALAC	2	100037187 F 0	56,77	4,46	-0,37	6,69
GALAC	3	100053032 F 0	172,53	7,12	0,57	13,10
GALAC	4	100031971 F 0-100043688 F 0	88,00	8,70	-0,47	5,32
GALAC	6	100181892 F 0	0,00	3,66	-0,27	4,61
GALAC	10	100171869 F 0	25,47	12,58	0,71	25,41
BAM3	1	100058307 F 0-100061132 F 0	74,00	2,90	-0,40	1,10
BAM3	2	100028862 F 0	206,52	3,53	-0,40	1,12
BAM3	7	100012855 F 0	49,01	3,88	-0,77	10,89
BAM3	8	100047420 F 0	208,85	3,12	0,53	3,43
BAM3	10	100156188 F 0	6,58	5,86	0,96	8,03
MEX1	6	100047667 F 0	13,48	10,11	-0,26	5,81
MEX1	9	100048503 F 0	160,22	4,85	0,17	2,32
BAC2	2	100022861 F 0	6,80	8,64	-0,45	8,00
BAC2	3	100026361 F 0	17,54	3,79	-0,30	2,65
BAC2	7	100040736 F 0	8,51	3,16	-0,24	2,04
NRAMP	6	100030612 F 0	18,09	4,85	-0,20	4,84
EREB	1	100186532 F 0	13,02	4,26	-0,28	9,19
EREB	2	100201571 F 0	370,59	3,46	-0,25	7,18
EREB	5	100188422 F 0	31,33	4,33	-0,26	6,77
EREB	7	100055682 F 0	102,13	5,02	-0,26	7,80
NAC2	2	100028817 F 0	42,76	6,89	-0,44	7,13
NAC2	3	100002208 F 0-100027934 F 0	2,00	6,00	-0,54	3,90
NAC2	5	100048739 F 0	420,98	3,01	-0,41	3,19
NAC2	8	100029816 F 0	170,12	4,71	0,37	2,89

PP2B15	1	100072566 F 0	288,66	3,22	-2,34	1,10
PP2B15	4	100063037 F 0	3,42	2,55	-3,53	1,43
PP2B10	2	100201571 F 0	370,59	8,17	0,36	6,17
PP2B10	3	100040067 F 0	138,01	6,99	0,37	4,84
PP2B10	4	100050457 F 0	257,33	6,44	-0,33	3,95
PP2B10	6	100030612 F 0	18,09	4,81	-0,38	13,66
PP2B10	10	100163575 F 0-100163311 F 0	28,00	6,09	0,32	7,43

GL= grupo de ligação, cM= posição de início em *centimorgan* dos QTLs identificados, q= efeito dos QTLs no genitor *C. sunki*, R<sup>2</sup>= variação fenotípica explicada e expressa em percentual.



**Figura 19.** Distribuição dos eQTLs no mapa genético de *P. trifoliata* relacionados ao processo de expressão gênica dos genes estudados. No eixo y encontram-se os valores de LOD e no eixo x o mapa de ligação de *P. trifoliata*.



**Figura 20.** Distribuição dos eQTLs no mapa genético de *C. sunki* relacionados ao processo de expressão gênica dos genes estudados. No eixo y encontram-se os valores de LOD e no eixo x o mapa de ligação de *C. sunki*.

Para os eQTLs encontrados no mapa do *P. trifoliata*, o LOD-Score crítico, variou de 2,65 a 4,35, enquanto os LOD-Score dos eQTLs detectados variaram de 3,01 a 17,61, e os valores de variação fenotípica explicada ( $R^2$ ) pelos marcadores variaram de 0,01 a 18,85% (Tabela 10 e Figura 19). Para a *C. sunki*, o LOD-score crítico variou de 2,35 a 4,82, enquanto o LOD-score foi de 2,55 a 16,65, evidenciando regiões consistentes, e o  $R^2$  variou de 0,25 a 25,41% (Tabela 11 e Figura 20). De maneira equivalente aos valores de variação fenotípica explicados

por QTLs em estudos de mapeamento, a maioria dos eQTLs no presente estudo são constituídos por locos com efeitos baixos ( $R^2$  menor que 10%) (ANDERSON et al., 2007).

Estudos com eQTLs possibilitam a identificação de regiões cromossômicas que afetam a expressão de múltiplos genes, com muitos locos próximos e fortemente ligados controlando a quantificação de vários transcritos gênicos, os chamados *hotspots* (“zonas quentes”). Tal fenômeno pode ser constatado por uma série de eQTLs sobrepostos nos grupos de ligação dos mapas genéticos, e sua consequência pode ser atribuída a regiões do genoma ricas em genes estreitamente ligados, identificando eQTLs próximos; ou a uma única região genômica reguladora dos níveis de transcrição de um grande número de genes, a partir da detecção de eQTLs distantes (HUBNER et al., 2005; WEST et al., 2007). De qualquer forma, é relatado na literatura que muitos *hotspots* controlam a expressão de genes que codificam enzimas participantes das inúmeras vias metabólicas, sendo até possível alguns *hotspots* regulando a via como um todo (KIRST et al., 2004; ROSA, 2007).

Dessa forma, no presente trabalho foi identificado um total de 11 *hotspots* no mapa do genitor *P. trifoliata*, bem como 12 no mapa da *C. sunki*, apresentando uma média de aproximadamente um *hotspots* por grupo de ligação. Os genes que possuíram eQTLs sobrepostos e localizados em *hotspots* variaram desde dois até cinco nos mapas genéticos (Tabela 12).

**Tabela 12.** Relação dos genes que apresentaram eQTLs sobrepostos e localizados em *hotspots* para cada grupo de ligação nos dois mapas genéticos construídos para cada genitor.

GL	Mapa <i>C. sunki</i>	Mapa <i>P. trifoliata</i>
1	GLUC e PP2B15	
2	CARBOX, GALAC, BAC2 e NAC2 UDP, EREB e PP2B10	BAC2 e EREB
3	UDP, T6PP E CARBOX GLUC, GALAC e PP2B10 BAC2 e NAC2	UDP e T6PP PAE e BAM3
4	CARBOX, GLUC e PP2B10	UDP, PAE e EREB
5		UDP, GLUC, EREB, PP2B15 e PP2B10 T6PP e CARBOX
6	GALAC, MEX1, NRAMP e PP2B10	BAM3 e BAC2
7	CARBOX, GLUC, BAM3 e EREB	CARBOX e PP2B10 GLUC e NAC2
8	T6PP e NAC2	UDP e GALAC
9	CARBOX e MEX1	NAC2 e PP2B10
10	CARBOX, GLUC, GALAC, BAM3 e PP2B10	–

Os eQTLs contribuem com os fenótipos e tal contribuição pode ser evidenciada por sobreposições destes com os QTLs (SUGIYAMA et al., 2014). O que corrobora para uma forte associação entre os níveis de transcritos gênicos e os dados fenotípicos em uma progênie segregante (GION et al., 2000; BROWN et al., 2003; CUBILLOS et al., 2012).

Nesse sentido, foram constatados *hotspots* sobrepostos aos QTLs detectados, no presente estudo (Tabela 13). No mapa do genitor *C. sunki* foram localizadas três sobreposições com QTLs de quantificação de CLas nos GL 5, 6 e 7, e uma com amido. E no mapa de *P. trifoliata* foram observadas duas sobreposições com QTLs de amido e quatro com CLas.

Observa-se que há uma interposição entre um eQTL proveniente do gene CARBOX e um QTL de quantificação de amido na mesma posição genômica exatamente no marcador 100035369|F|0 no GL 8b do mapa do *P. trifoliata* a

aproximadamente 40 cM, indicando uma complexa rede que regula tanto a expressão gênica quanto o fenótipo. O gene Carboxylesterase foi estudado em trabalhos de *Arabidopsis* sob infecção com *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* e foi observado que podem afetar drasticamente a capacidade da planta em controlar o crescimento bacteriano (CUNNAC et al., 2007).

Observa-se que alguns genes tiveram mais de um eQTL relacionado ao fenótipo, como o gene PP2B10 que apresentou dois eQTLs associados no mapa da *C. sunki*, sendo um relacionado com amido no GL 3 e o outro com CLas no GL 6, e três eQTLs no mapa de *P. trifoliata*, dois relacionados com amido, GL 1 e 5, e um relacionado com CLas no GL 7. Em estudos de transcriptomas, esse gene foi encontrado altamente induzido em genótipos de *Citrus* susceptíveis ao HLB frente à inoculação com a bactéria (MAFRA et al., 2013; ZHONG et al., 2015; FU et al., 2016). As PP2, além de se envolverem na diferenciação do tecido vascular, têm várias funções, incluindo diferenciação de células dos elementos crivados, respostas de defesa do hospedeiro, como tamponar os poros do elemento crivado para prevenir a colonização de insetos e patógenos, interação com plasmodesmata do mesófilo para aumentar o tamanho do limite de exclusão e o tráfego de célula para célula (DINANT et al., 2003).

Com exceção dos genes T6PP e BAC2, para todos os outros genes foram co-localizados eQTLs com QTLs independente do mapa e da característica fenotípica (CLas ou amido). O que mostra a que esses genes são responsivos ao patógeno e possuem relação com o fenótipo observado.

**Tabela 13.** Relação dos genes que apresentaram eQTLs sobrepostos à QTLs para cada grupo de ligação nos dois mapas genéticos construídos para o mapa de cada genitor. Entre parênteses a posição de início em cM.

<b>GL</b>	<b>Mapa <i>C. sunki</i></b>	<b>Mapa <i>P. trifoliata</i></b>
1		PP2B10 (84) e Amido (122)
3	GLUC (147), GALAC (173), PP2B10 (138) e Amido (127)	
4		UDP (235), PAE (243), EREB (214) e CLas (258)
5	NAC2 (420) e CLas (412)	UDP (390), GLUC (440), EREB (343), PP2B15 (405), PP2B10 (386) e Amido (382)
6	GALAC (0), MEX1 (13), NRAMP (18) e PP2B10 (18) e CLas (13)	
7	CARBOX (72), GLUC (82), BAM3 (49), EREB (102) e CLas (105)	CARBOX (142), PP2B10 (151) e CLas (137)
8b		CARBOX (40) e CLas (40)
9		PAE (224) e CLas (215)



## 6. CONCLUSÕES

1. Os mapas mostraram-se consistentes e possuem sintonia e colinearidade com o genoma de referência utilizado (*C.sinensis*).
2. Os fatores genéticos do genitor *P. trifoliata* podem ter influência nas diferentes respostas dos híbridos frente à infecção por CLas. As estimativas dos parâmetros genéticos revelaram um grande potencial de seleção da população, e assim, propõe-se a validação desses dados em campo, com destaque para os híbridos que obtiveram resultados superiores ao genitor *P. trifoliata*.
3. O perfil de expressão gênica global do experimento permitiu estabelecer análises consistentes de agrupamento entre os genótipos selecionados e os genes candidatos. Alguns genes apresentaram maior expressão frente à infecção com CLas nos diferentes genótipos.
4. Alguns eQTLs nos dois mapas estavam fortemente sobrepostos, havendo a detecção de consistentes *hotspots* (“zonas quentes”) de eQTLs relacionados aos genes-alvos. A sobreposição de eQTLs, para a maioria dos genes, com QTLs indica que estes têm relação com o fenótipo e que provavelmente são responsivos ao patógeno.

## 7. LITERATURA CITADA

ACKERMANN, M.; SIKORA-WOHLFELD, W.; BEYER, A. Impact of Natural Genetic Variation on Gene Expression Dynamics. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 6, 2013.

ALBRECHT, U.; BOWMAN, K. D. Tolerance of the trifoliolate citrus hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco × *poncirus trifoliata* L. Raf.) to huanglongbing. **HortScience**, v. 46, n. 1, p. 16–22, 2011.

ALBRECHT, U.; BOWMAN, K. D. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Plant Science**, v. 185–186, p. 118–130, 2012.

AMARAL, L. I. V. et al. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v. 34, n. 4, p. 425–431, 2007.

ANDERSON, J. A.; CHAO, S.; LIU, S. Molecular Breeding Using a Major QTL for *Fusarium* Head Blight Resistance in Wheat. **Crop Science**, v. 47, n. Supplement\_3, p. S-112, 2007.

ARITUA, V. et al. Transcriptional and Microscopic Analyses of Citrus Stem and Root Responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* Infection. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 4–8, 2013.

ASINS, M. J. et al. QTL analysis of citrus tristeza virus-citradia interaction. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, n. 4, p. 603–611, 2004.

BASTIANEL, M. et al. Caracterização de genótipos de Citrus spp. através de marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 763–768, 2001.

BASTIANEL, M. et al. Quantitative trait loci analysis of citrus leprosis resistance in an interspecific backcross family of (*Citrus reticulata* Blanco × *C. sinensis* L. Osbeck) × *C. sinensis* L. Osb. **Euphytica**, v. 169, n. 1, p. 101–111, 2009.

BERED, F. E. AL. Marcadores Moleculares e sua Aplicação no Melhoramento Genético de Plantas. **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 513–520, 1997.

BOAVA, L. P. et al. Global gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica*. **BMC genomics**, v. 12, n. 39, p. 1–13, 2011.

BOAVA, L. P. et al. Incidence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”-infected plants among citrandarins as rootstock and scion under field conditions. **Phytopathology**, v. 105, n. 4, p. 518–524, abr. 2015.

BOAVA, L. P.; CRISTOFANI-YALY, M.; MACHADO, M. A. Physiologic, anatomic, and gene expression changes in *Citrus sunki*, *Poncirus trifoliata* and their hybrids after *Liberibacter asiaticus* infection. **Phytopathology**, v. 107, n. 5, p. PHYTO-02-16-0077-R, maio 2017.

BOSCARIOL-CAMARGO, R. L. et al. Avaliação de diferentes genótipos de citros à infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus* Evaluation of different genotypes of citrus to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 1, p. 85–90, 2010.

BOVÉ, J. M. Huanglongbing: a Destructive, Newly-Emerging, Century-Old Disease of Citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, n. 1, p. 7–37, 2006.

BRLANSKY, R. H. et al. Florida Citrus Pest Management Guide: Blight 1. **Extension Digital Information Source (EDIS)**:, v. PP-225 Dep, p. 2–3, 2009.

BROWN, G. R. et al. Identification of quantitative trait loci influencing wood property traits in Loblolly pine (*Pinus taeda* L.). III. QTL verification and candidate gene mapping. **Genetics**, v. 164, n. 4, p. 1537–1546, 2003.

BRUN, M.; JOHNSON, C. D.; RAMOS, K. S. Clustering: Revealing intrinsic dependencies in microarray data. In: **Eurasip Book Series on Signal Processing and Communications**. [s.l: s.n.]. p. 129–162.

BUDAHN, H. et al. Molecular mapping in oil radish (*Raphanus sativus* L.) and QTL analysis of resistance against beet cyst nematode (*Heterodera schachtii*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, n. 4, p. 775–782, 3 fev. 2009.

CAI, Q.; GUY, C. L.; MOORE, G. A. Extension of the linkage map in Citrus using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, n. 5, p. 606–614, 1994.

CAMERON, S. W.; FROST, H. B. Genetic, breeding and nucellar mbryony. In: **The Citrus Industry**. Berkeley: University of California: [s.n.]. v. 2p. 325–89.

CARLOS, E. F. et al. **Quantitative real time PCR based on Taqman probes to molecular detection of “Candidatus Liberibacter asiaticus” and “Ca. Americanus”**. Huanglongbing Greening International Workshop. **Anais...Ribeirão Preto**: 2006

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, n. 2, p. 113–116, 1993.

CHEN, L.; STOREY, J. D. Relaxed significance criteria for linkage analysis. **Genetics**, v. 173, n. 4, p. 2371–2381, 2006.

CHEN, X. et al. An eQTL analysis of partial resistance to Puccinia hordei in barley. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, 2010.

CHURCHILL, G. A.; DOERGE, R. W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, v. 138, n. 3, p. 963–971, 1994.

COLETTA-FILHO, H. D. et al. First Report of the Causal Agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease**, v. 88, n. 12, p. 1382–1382, 6 dez. 2004.

COLLARD, B. C. Y. et al. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, v. 142, n. 1–2, p. 169–196, 2005.

CRISTOFANI, M. et al. Programa de melhoramento de citros via hibridação controlada no Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC no período de 1997 a 2005. **Laranja**, v. 26, n. 1, p. 121–134, 2005.

CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of Citrus sunki Hort. ex. Tan. and Poncirus trifoliata (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. **Euphytica**, v. 109, n. 1, p. 25–32, 1999.

CRUZ, E. M. **EFEITO DA SATURAÇÃO E DO TAMANHO DE POPULAÇÕES F2 E DE RETROCRUZAMENTO SOBRE A ACURÁCIA DO MAPEAMENTO GENÉTICO**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa - UFV, 2006.

CUBILLOS, F. A.; COUSTHAM, V.; LOUDET, O. Lessons from eQTL mapping studies: Non-coding regions and their role behind natural phenotypic variation in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 2, p. 192–198, 2012.

CUNHA, A. P.; SAMPAIO, O.; SOARES, W. Cultivares porta-enxerto. In: **Cultura dos citros**. [s.l: s.n.]. v. 1p. 233–292.

CUNNAC, S. et al. A conserved carboxylesterase is a SUPPRESSOR OF AVRBS1-ELICITED RESISTANCE in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 19, n. 2, p. 688–705, 2007.

CURTOLO, M. et al. QTL mapping for fruit quality in Citrus using DArTseq markers. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 289, 2017.

DA GRAÇA, J. V. et al. Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 58, n. 4, p. 373–387, 1 abr. 2016.

DALIO, R. J. D. et al. PAMPs, PRRs, effectors and R-genes associated with citrus-pathogen interactions. **Annals of Botany**, v. 119, n. 5, p. 749–774, 2017.

DALKILIC, Z.; TIMMER, L. W.; GMITTER JR, F. G. Linkage of an Alternaria disease resistance gene in mandarin hybrids with RAPD fragments. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 130, n. 2, p. 191–195, 2005.

DANAN, S.; VEYRIERAS, J.-B.; LEFEBVRE, V. Construction of a potato consensus map and QTL meta-analysis offer new insights into the genetic architecture of late blight resistance and plant maturity traits. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 16, 2011.

DE SPIEGELAERE, W. et al. Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2015.

DENG, Z. et al. Development and characterization of SCAR markers linked to the citrus tristeza virus resistance gene from Poncirus trifoliata. v. 704, p. 697–704, 1997.

DINANT, S. et al. Diversity of the superfamily of phloem lectins (phloem protein 2) in angiosperms. **Plant physiology**, v. 131, n. 1, p. 114–28, 2003.

DROST, D. R. et al. Diversification in the genetic architecture of gene expression and transcriptional networks in organ differentiation of Populus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 18, p. 8492–8497, 2010.

DRUKA, A. et al. Expression quantitative trait loci analysis in plants. **Plant**

**Biotechnology Journal**, v. 8, n. 1, p. 10–27, 2010.

DUAN, Y. et al. Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, “Candidatus Liberibacter asiaticus” obtained through metagenomics.

**Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 22, n. 8, p. 1011–1020, 2009.

EMBRAPA. SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS E MELHORAMENTO DE PLANTAS PARA O NORDESTE DO BRASIL. In: **Variabilidade genética e melhoramento dos citros**. Petrolina, Pe: [s.n.]. p. 23 p.

FAN, J. et al. Changes in carbohydrate metabolism in *Citrus sinensis* infected with “Candidatus Liberibacter asiaticus”. **Plant Pathology**, v. 59, n. 6, p. 1037–1043, 2010.

FAN, J. et al. Comparative transcriptional and anatomical analyses of tolerant rough lemon and susceptible sweet orange in response to “Candidatus Liberibacter asiaticus” infection. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 25, n. 11, p. 1396–407, 2012.

FAN, J. et al. Differential anatomical responses of tolerant and susceptible citrus species to the infection of “Candidatus Liberibacter asiaticus”. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 83, p. 69–74, 2013.

FANG, D. Q.; FEDERICI, C. T.; ROOSE, M. L. A high-resolution linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Genetics**, v. 150, n. 2, p. 883–890, 1998.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 31 jul. 2017.

FLEITES, L. A. et al. “Candidatus Liberibacter asiaticus” prophage late genes may limit host range and culturability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 19, p. 6023–6030, 2014.

FOLIMONOVA, S. Y. S. et al. Examination of the responses of different genotypes of citrus to huanglongbing (citrus greening) under different conditions. **Phytopathology**, v. 99, n. 23, p. 1346–1354, dez. 2009.

FU, S. et al. Transcriptome analysis of sweet orange trees infected with “Candidatus Liberibacter asiaticus” and two strains of Citrus Tristeza Virus. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–18, 2016.

FUNDECITRUS. **Fundecitrus**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/>>. Acesso em: 31 jul. 2017.

GARCÍA, M. R.; ASÍNS, M. J.; CARBONELL, E. A. QTL analysis of yield and

seed number in Citrus. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, n. 3, p. 487–493, 2000.

GARCÍA, R. et al. Genetic analysis of apomixis in Citrus and Poncirus by molecular markers. **Theor Appl Genet**, v. 99, p. 511–518, 1999.

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J. M. **The greening organism is a Gram negative bacterium**. Proceedings of 9th Conference of International Organization of Citrus Virologists. **Anais...Riverside**: 1984

GAZAFFI, R. et al. A model for quantitative trait loci mapping, linkage phase, and segregation pattern estimation for a full-sib progeny. **Tree Genetics and Genomes**, v. 10, n. 4, p. 791–801, 2014.

GHOSH, D. K. D. K. et al. Genetic Diversity of the Indian Populations of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” Based on the Tandem Repeat Variability in a Genomic Locus. **Phytopathology**, v. 105, n. 8, p. PHYTO09140253R, 2015.

GION, J. M. et al. Mapping candidate genes in Eucalyptus with emphasis on lignification genes. **Molecular Breeding**, v. 6, n. 5, p. 441–449, 2000.

GMITTER, F. G. et al. A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region. **TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik**, v. 92, n. 6, p. 688–95, 1996.

GOTTWALD, T.; DA GRAÇA, J. V.; BASSANEZI, R. B. 2007. Citrus Huanglongbing: The Pathogen and Its Impact. **Plant Health Progress**, 2007.

HALBERT, S. **The discovery of huanglongbing in Florida**. Proceedings of the 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop. **Anais...Orlando Florida, USA**: 2005

HALBERT, S. S. E. S.; MANJUNATH, K. K. L. Asian Citrus Psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and Greening Disease of Citrus: a Literature Review and Assessment of Risk in Florida. **Florida Entomologist**, v. 87, n. 3, p. 330–353, 2 set. 2004.

HALL, D. G.; GEORGE, J.; LAPOINTE, S. L. Further investigations on colonization of Poncirus trifoliata by the Asian citrus psyllid. **Crop Protection**, v. 72, p. 112–118, 2015.

HANSEN, B. G. et al. A novel 2-oxoacid-dependent dioxygenase involved in the formation of the goiterogenic 2-hydroxybut-3-enyl glucosinolate and generalist insect resistance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 148, n. 4, p. 2096–2108, 2008.

HOLLOWAY, B. et al. Genome-wide expression quantitative trait loci (eQTL) analysis in maize. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 336, 2011.

HONGYU, K.; JORGE, G.; JUNIOR, D. O. Análise de Componentes Principais: resumo teórico , aplicação e interpretação. **E&S - Engineering and Science**, v. 5, n. 1, p. 83–90, 2015.

HUBNER, N. et al. Integrated transcriptional profiling and linkage analysis for identification of genes underlying disease. **Nature Genetics**, v. 37, n. 3, p. 243–253, 2005.

JANSEN, R. C.; NAP, J. P. Genetical genomics: The added value from segregation. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 7, p. 388–391, 1 jul. 2001.

KHAN, I. A. **Citrus genetics, breeding and biotechnology**. 1. ed. Cambridge: CABI Publishing, 2007.

KIM, J.-S. et al. Response of sweet Orange ( *Citrus sinensis* ) to “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” infection: microscopy and microarray analyses. **Phytopathology**, v. 99, n. 1, p. 50–57, 2009.

KIRST, M. et al. Genetic architecture of transcript-level variation in differentiating xylem of a eucalyptus hybrid. **Genetics**, v. 169, n. 4, p. 2295–2303, 2005.

KIRST, M. E. et al. Coordinated Genetic Regulation of Growth and Lignin Revealed by Quantitative Trait Locus Analysis of cDNA Microarray Data in an Interspecific Backcross of Eucalyptus 1. **Society**, v. 135, n. August, p. 2368–2378, 2004.

KOH, E. J. et al. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. **Protoplasma**, v. 249, n. 3, p. 687–697, 2012.

KUJUR, A. et al. Integrated genomics and molecular breeding approaches for dissecting the complex quantitative traits in crop plants. **Journal of Biosciences**, v. 38, n. 5, p. 971–987, 2013.

LI, W.; HARTUNG, J. S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n. 1, p. 104–115, 2006.

LIMA, R. P. M. **Mapeamento de QTLs e eQTLs relacionados à resistência à *Phytophthora parasitica* (agente causador da gomose dos citros) em citrandarins**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2016.



LIU, B.-H. **Statistical genomics : linkage, mapping, and QTL analysis**. [s.l.] CRC Press, 1997.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LOPES, S. A. et al. Graft transmission efficiencies and multiplication of “Candidatus Liberibacter americanus” and “ca. Liberibacter asiaticus” in citrus plants. **Phytopathology**, v. 99, n. 3, p. 301–306, 2009.

MACHADO, M; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A. . Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. **Campinas: IAC Fundag, 2005.**, p. 243–246, 2005.

MACHADO, M. A.; LOCALI-FABRIS, E. C.; COLETTA-FILHO, H. DELLA. Candidatus Liberibacter spp., agentes do huanglongbing dos citros. **Citrus Research & Technology**, v. 31, p. 25–35, 2010.

MACKAY, T. F. C. Q&A: Genetic analysis of quantitative traits. **Journal of biology**, v. 8, p. 23, 2009.

MAFRA, V. et al. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

MAFRA, V. et al. Candidatus Liberibacter americanus induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 247, 2013.

MARENGO, S. Mapeamento genético de tangerina Sunki e Poncirus trifoliata para resistência ao Huanglongbing (greening) dos citros). p. 75, 2009.

MARTINELLI, F. et al. Gene Regulatory Networks Elucidating Huanglongbing Disease Mechanisms. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.

MAURICIO, F. N. **Análise da expressão de genes relacionados à defesa em novos híbridos de citros resistentes à Clorose Variegada dos Citros e mapeamento de eQTL**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2013.

MAZZINI, R. B.; PIO, R. M. Caracterização Morfológica De Seis Variedades Cítricas Com Potencial Ornamental 1 Morphological Characterization of Six Citrus Varieties With Ornamental Potential. **Rev. Bras. Frutic**, v. 32, n. 2, p. 463–470, 2010.

MOORE et al. **The Practice of Statistics for Business and Economics**. 3. ed. New York, NY: [s.n.].

MOORE, G. A.; WEBER, T.; GUY, C. L. Mapping quantitative trait loci for salt tolerance and cold tolerance in *Citrus grandis*. **Acta Hort.**, v. 535, n. ISHS, p. 37–45, 2000.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 19, p. 4321–4326, 1980.

NISHIURA, M. Natural mutation and its utilization in the selection of citrus fruits. **Gamma Field Symposia**, n. 4, p. 27–38, 1965.

NOGARA NETO, F. et al. Atributos de solo e cultura espacialmente distribuídos relacionados ao rendimento do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 3, p. 1025–1036, 2011.

OLIVEIRA, R. P. Porta-enxertos para citros. **Embrapa**, v. 22, n. 1, p. 1–5, 2008.

PASQUAL, M. et al. Concentrações do meio MS e da Sacarose/In Vitro Culture da “Poncã” Mandarin Immature Embryos: Ms Medium And Sucrose Concentrations. **Ceres**, v. 49, n. 282, 2015.

PATT, J. M.; SÉTAMOU, M. Responses of the Asian citrus psyllid to volatiles emitted by the flushing shoots of its rutaceous host plants. **Environmental entomology**, v. 39, n. 2, p. 618–624, 2010.

PHILIPPE, F.; PELLOUX, J.; RAYON, C. Plant pectin acetyltransferase structure and function: new insights from bioinformatic analysis. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 456, 2017.

POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER, S. Híbridos de trifoliata como porta-enxertos para laranjeira pêra. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 1, p. 9–14, 2014.

PORTO, B. N. et al. OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE RNA EM DIFERENTES TECIDOS DE MILHO. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 9, n. 2, p. 189–200, 2010.

QUEIROZ, M. A. DE; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Arido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. [s.n.].

RAGA, V. et al. Segregation and linkage analyses in two complex populations derived from the citrus rootstock Cleopatra mandarin. Inheritance of seed reproductive traits. **Tree Genetics and Genomes**, v. 8, n. 5, p. 1061–1071, 2012.

RAWAT, N. et al. Comprehensive meta-analysis, co-expression, and miRNA nested network analysis identifies gene candidates in citrus against Huanglongbing disease. **BMC plant biology**, v. 15, n. 1, p. 184, 2015.

RICHARDSON, M.L.; HALL, D. G. Resistance of Poncirus and Citrus x Poncirus Germplasm to the Asian Citrus Psyllid. **Journal of Citrus Pathology**, v. 1, n. 1, 2014.

ROCHA, R. B. et al. O Mapeamento Genético no Melhoramento de Plantas. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p. 6, 2003.

ROSA, G. J. D. M. Delineamento de experimentos em genética genômica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 211–218, 2007.

SCHAAD, N. W.; FREDERICK, R. D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, n. 3, p. 250–258, 2002.

SCHADT, E. E. et al. Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. **Nature**, v. 422, n. 6929, p. 297–302, 2003.

SCHINOR, E. H. et al. Caracterização agronômica e molecular de acessos de Citrus sunki do Banco de Germoplasma de Citros do Centro APTA Citros Sylvio Moreira. **Citrus Research & Technology**, v. 32, n. 1, p. 27–37, 2011.

SHI, C. et al. Identification of candidate genes associated with cell wall digestibility and eQTL (expression quantitative trait loci) analysis in a Flint x Flint maize recombinant inbred line population. **BMC genomics**, v. 8, p. 22, 2007.

SHOKROLLAH, H. et al. Differential reaction of citrus species in malaysia to huanglongbing (hlb) disease using grafting method. **American Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 4, n. 1, p. 32–38, 1 jan. 2009.

SIVIERO, A. et al. Identification of QTLs associated with citrus resistance to Phytophthora gummosis. **Journal of applied genetics**, v. 47, n. 1, p. 23–28, 2006.

SOUZA, L. M. et al. QTL Mapping of Growth-Related Traits in a Full-Sib Family of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*) Evaluated in a Sub-Tropical Climate. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

SOUZA, A. A. et al. Biotecnologia em Citros. In: CANÇADO, G. M. DE A.; LONDE, L. N. (Eds.). **Biotecnologia Aplicada a Agropecuária**. 22. ed. Caldas: Epamig, 2012.

STOVER, E. et al. Conventional citrus of some scion/ rootstock combinations show field tolerance under high huanglongbing disease pressure. **HortScience**, v.

51, n. 2, p. 127–132, 2016.

SUGIYAMA, A. et al. Expression Quantitative Trait Loci Analysis of Carotenoid Metabolism-related Genes in Citrus. **J. Japan. Soc. Hort. Sci.**, v. 83, n. 1, p. 32–43, 2014.

TADEO, F. R. et al. Molecular Physiology of Development and Quality of Citrus. **Advances in Botanical Research**, v. 47, n. 8, p. 147–223, 2008.

THUMMA, B. R. et al. Quantitative trait locus (QTL) analysis of growth and vegetative propagation traits in Eucalyptus nitens full-sib families. **Tree Genetics and Genomes**, v. 6, n. 6, p. 877–889, 2010.

TOLEDO, E. R. DE et al. Mapeamento de QTLS: uma abordagem Bayesiana. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 26, p. 107–114, 2008.

USDA. **Citrus: World Markets and Trade**. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2017.

VALLE, M. G. DO. Impactos na citricultura paulista decorrentes da implantação de técnicas de implantação de borbulhas e mudas sadias de citros. **Laranja**, v. 23, n. 2, p. 271–280, 2002.

WANG, N. et al. Liberibacter – Host Interface : Insights into Pathogenesis Mechanisms and Disease Control. n. June, p. 1–32, 2017.

WANG, Y. et al. Expression quantitative trait loci infer the regulation of isoflavone accumulation in soybean (*Glycine max* L. Merr.) seed. **BMC genomics**, v. 15, p. 680, 2014.

WANG, Z. et al. Development and application of molecular-based diagnosis for “Candidatus Liberibacter asiaticus”, the causal pathogen of citrus huanglongbing. **Plant Pathology**, v. 55, n. 5, p. 630–638, 2006.

WEST, M. A. L. et al. Global eQTL mapping reveals the complex genetic architecture of transcript-level variation in Arabidopsis. **Genetics**, v. 175, n. 3, p. 1441–1450, 2007.

WESTBROOK, C. J. et al. Colonization of Citrus and Citrus related germplasm by *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **HortScience**, v. 46, n. 7, p. 997–1005, 2011.

WIT, E.; MCCLURE, J. **Statistics for Microarrays**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2004.

WU, G. A. et al. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. **Nature**

**biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 656–662, 2014.

WU, Z.; BURNS, J. K. A  $\beta$ -galactosidase gene is expressed during mature fruit abscission of “Valencia” orange (*Citrus sinensis*). **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 402, p. 1483–1490, 2004.

XU, Q. et al. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). **Nature genetics**, v. 45, n. 1, p. 59–66, 2012.

YAN, A. et al. A General Method for QTL Mapping in Multiple Related Populations Derived from Multiple Parents. **Rice Science**, v. 16, n. 1, p. 45–50, 2009.

YOUNG, N. D. Construction a plant genetic linkage map with DNA markers. In: PHILIPS, P. L.; VASIL, I. K. (Eds.). . **DNA-based markers in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1994. p. 39–57.

ZENG, Z. B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 23, p. 10972–6, 1993.

ZHAO, S.; FERNALD, R. D. Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. **J Comput Biol**, v. 12, n. 8, p. 1047–1064, 2005.

ZHONG, Y. et al. Comparative transcriptome and iTRAQ proteome analyses of citrus root responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–21, 2015.

## 8. APÊNDICE

**Apêndice 1.** Divisão dos híbridos e dos genitores em grupos com relação aos valores de quantificação de amido nos grupos Controle e Inoculado, e quantificação de CLas em Ct e log do nº de cópias do 16S (log).

Híbridos	Quantificação de Amido		Quantificação de CLas		Grupos
	Controle	Inoculado	Ct	Log	
H28	18,031	21,665	34,952	2,149	Grupo R
H31	18,031	20,441	34,439	2,274	
H146	17,270	21,036	34,439	2,274	
H126	17,796	24,013	34,439	2,274	
H32	17,490	20,441	33,050	2,997	
H87	18,993	21,363	32,827	3,057	
H102	17,582	20,400	32,582	2,839	
H142	17,600	19,316	32,548	3,132	
H1	17,694	22,343	32,455	3,158	
H96	18,033	24,331	32,269	3,208	
H47	19,370	19,366	30,899	3,577	
H121	17,515	27,503	30,427	3,705	
<i>P. trifoliata</i>	19,071	34,379	30,398	3,436	
H16	17,581	26,114	29,838	3,865	
H113	17,553	29,604	29,491	3,917	
H90	20,487	28,503	28,096	4,336	Grupo T
H189	17,412	22,064	27,513	4,494	
H141	17,437	26,067	21,441	6,192	
H184	17,575	28,631	21,204	6,259	
H35	16,903	33,643	25,862	4,942	
H4	17,563	31,663	25,466	5,058	

H17	17,451	22,244	25,363	5,043
H176	17,428	33,489	25,363	5,043
H117	18,321	24,808	25,120	5,158
H118	18,486	31,474	24,691	5,256
H54	17,691	33,862	24,516	5,332
H68	17,122	24,567	24,468	5,316
H179	21,000	30,988	24,044	5,457
H130	16,605	23,270	23,814	5,521
H187	18,871	26,004	23,749	5,510
H73	18,605	21,565	23,321	5,626
H2	19,204	21,677	23,282	5,672
H61	16,884	26,634	23,137	5,712
H132	19,150	30,538	22,825	5,760
H101	17,611	25,141	22,769	5,775
H110	17,601	29,547	22,662	5,848
H143	17,766	29,936	22,031	6,026
H66	17,804	31,807	22,012	5,980
H99	17,242	24,925	21,717	6,115
H173	17,404	34,883	25,363	5,043
H56	17,352	35,648	22,869	5,807
H10	17,769	37,327	23,060	5,697
H183	17,455	37,420	23,736	5,514
H111	17,739	37,978	23,722	5,547
H124	17,623	38,383	23,456	5,638
H20	18,370	39,849	23,003	5,750
H24	17,054	40,641	22,368	5,952
H150	16,518	41,360	23,354	5,668
H129	19,594	41,661	25,163	5,129
H190	17,487	44,059	25,363	5,043
H114	18,031	46,924	25,088	5,149
H163	18,031	46,924	23,811	5,494
H107	18,031	46,924	22,316	5,898
H106	18,031	46,924	21,889	6,065
H105	18,844	51,777	22,815	5,803
<hr/>				
H154	17,289	55,305	24,586	5,285
H217	22,390	56,707	23,882	5,515
H23	16,900	57,786	22,050	5,969
H26	17,515	61,772	21,411	6,143
H191	17,501	63,591	24,228	5,405
H119	18,264	64,641	22,163	6,012
H70	22,092	65,185	23,373	5,662
H94	17,176	67,172	22,245	5,965
H109	17,314	67,792	22,260	5,912
H125	17,300	68,923	21,277	6,239
H14	18,404	75,616	22,886	5,803
H42	17,509	80,213	21,784	6,121

Grupo S

H148	17,336	80,891	22,223	4,386	
<i>C. sunki</i>	20,010	82,292	24,143	5,439	
H144	16,521	86,006	25,363	5,043	
H137	18,031	86,349	22,188	5,981	
H293	17,910	87,622	22,593	5,866	
H151	17,736	89,177	24,396	5,356	
H19	18,058	90,882	22,340	5,960	
H49	18,031	103,590	22,440	5,864	
H86	19,623	104,707	26,049	4,888	
H136	17,753	105,402	22,912	5,737	
H78	18,118	108,974	21,926	6,002	
H134	17,612	109,693	22,502	5,848	
H279	18,927	62,251	34,535	2,490	Não
H149	18,017	107,767	31,724	3,087	agrupado*

\*Não correspondem os requisitos de nenhum grupo.

**Apêndice 2.** Valores de *Foldchange* corrigido para os 14 genes candidatos na população de híbridos e nos genitores *C. sunki* (Sun) e *P. trifoliata* (Trif). Valores menores que um é reprimido e maiores que um induzido.

	T6PP	UDP	GLUC	GALAC	BAM3	MEX1	PP2B15	PP2B10	EREB	CARBOX	PAE	NRAMP	NAC2	BAC2
1	0,44	1,64	0,37	0,87	1,28	1,51	11,07	0,59	1,05	0,58	0,46	0,66	0,76	0,88
10	0,74	2,14	0,98	3,52	8,28	1,85	6,33	2,15	1,56	0,69	1,32	1,30	4,17	1,26
101	3,25	0,93	0,59	1,80	1,34	1,24	6,58	1,28	2,61	1,55	0,78	1,30	3,18	4,35
102	1,40	0,66	0,54	1,18	5,09	0,35	6,62	0,62	1,57	0,57	0,65	1,34	0,64	0,90
105	0,42	0,57	0,48	0,47	1,46	1,26	13,56	0,14	0,76	0,12	0,40	0,60	2,06	1,58
106	0,92	3,44	0,37	2,81	1,34	1,54	28,28	0,41	2,65	1,03	1,12	1,72	2,04	1,32
107	0,26	0,51	0,42	0,78	0,97	1,96	28,32	0,39	1,35	2,76	0,33	2,16	0,12	0,94
109	0,63	1,24	0,58	0,61	2,12	2,03	15,65	0,24	0,95	0,47	0,72	0,76	0,76	2,53
110	1,02	0,69	1,36	2,22	1,30	0,22	8,01	0,48	2,13	2,00	0,89	1,83	1,67	0,92
111	1,75	0,77	0,90	0,48	1,65	1,03	-2,43	0,51	2,08	0,59	-0,16	1,02	0,99	0,36
113	1,17	1,58	1,08	1,59	3,25	0,94	11,05	0,65	1,33	0,20	0,68	0,75	1,29	1,02
117	0,89	0,34	0,56	1,31	1,10	0,83	5,00	0,63	1,52	0,53	1,12	1,34	1,03	1,06
118	2,65	0,92	1,37	2,56	2,38	0,81	22,33	0,34	2,48	-0,04	0,27	1,73	3,97	0,54
119	1,17	0,73	0,39	1,24	1,84	1,06	11,03	0,22	1,75	0,36	0,35	0,76	0,86	1,01
121	0,30	0,32	0,83	0,25	1,13	0,72	-3,24	0,04	1,18	0,25	-0,19	1,10	0,11	2,09
124	1,24	0,51	0,50	1,47	2,94	1,24	0,32	0,56	1,60	0,30	0,13	1,21	1,26	1,51
125	0,51	1,57	2,25	1,25	3,45	1,56	12,66	1,46	2,04	0,43	0,75	0,67	1,33	1,81
126	0,71	1,40	1,10	0,30	2,49	0,83	5,00	1,96	1,03	3,92	10,00	1,51	0,61	4,53
129	1,79	0,55	1,69	0,88	1,46	0,45	8,38	0,10	3,33	0,83	0,01	0,98	3,08	1,12
130	1,36	0,64	1,90	2,62	4,36	0,26	8,37	1,24	2,26	1,85	0,68	1,36	1,85	0,68
132	0,37	0,37	0,37	0,43	2,17	1,18	10,96	0,31	0,67	-0,04	0,06	0,56	0,91	1,98
134	1,01	0,27	1,99	2,00	2,50	0,83	11,72	0,46	2,55	2,13	0,41	0,90	0,16	1,00
136	0,83	1,42	1,39	1,23	1,79	0,87	11,36	2,46	1,87	0,31	0,22	0,91	1,18	1,22
137	1,87	0,47	0,91	1,14	6,21	0,57	11,35	0,38	1,61	0,28	-0,11	1,61	1,07	1,23
14	0,45	1,47	0,90	4,20	7,93	1,94	7,09	2,29	1,48	4,67	2,18	1,53	6,19	5,37
141	0,60	0,54	0,86	1,23	2,18	1,32	14,89	0,79	1,39	0,68	0,72	1,78	1,58	1,30
142	1,67	1,64	0,43	0,50	2,43	1,02	19,49	1,34	2,65	1,10	1,28	1,97	1,24	1,09
143	1,23	0,12	1,36	3,40	1,43	0,63	5,04	0,64	1,33	0,02	0,71	1,76	1,20	1,31



146	4,75	0,16	1,17	0,21	1,76	0,49	-3,19	0,42	2,62	0,49	3,03	0,98	0,79	0,36
148	0,43	0,19	0,83	0,82	2,13	1,01	14,23	0,35	1,16	0,37	0,37	0,68	0,76	0,72
149	1,29	3,66	0,46	1,28	2,88	1,09	11,31	1,01	1,57	2,77	2,04	2,95	1,40	1,11
150	0,59	1,03	0,52	0,52	1,33	1,00	5,11	0,72	1,56	0,48	0,85	1,77	0,87	1,64
151	1,21	0,44	1,21	1,98	3,25	0,08	6,46	0,76	0,46	0,76	1,59	1,18	1,07	1,31
154	1,06	0,14	1,03	2,21	2,47	1,08	-1,71	0,41	0,94	0,70	2,05	1,10	0,72	0,72
16	0,77	3,22	4,96	1,35	9,38	1,10	11,09	0,87	2,01	-0,17	1,22	0,51	0,87	1,77
163	0,16	0,17	0,76	0,33	3,25	0,89	3,21	0,53	2,20	1,27	0,79	1,06	0,07	0,31
173	4,84	0,89	2,96	0,69	12,16	0,78	15,81	2,30	4,97	1,93	0,62	0,95	4,31	4,45
179	2,14	0,49	0,54	1,43	3,68	0,87	10,90	0,71	1,72	1,79	2,16	4,44	1,31	3,31
183	1,69	0,66	0,88	2,05	2,27	1,19	5,65	3,40	1,71	0,56	1,76	2,11	1,58	2,69
184	2,04	4,44	1,75	1,57	1,98	1,39	5,03	0,79	2,61	0,15	1,41	2,40	1,58	1,66
187	0,65	0,28	0,62	0,98	3,05	1,08	13,05	0,30	1,22	0,48	1,03	0,82	1,13	0,86
189	1,11	0,67	0,50	0,60	4,76	0,41	-3,09	0,62	1,94	1,52	1,64	6,81	0,48	1,55
19	0,67	1,22	0,51	1,42	2,25	1,77	13,21	0,23	0,83	0,52	0,47	0,98	0,92	2,81
191	1,10	1,23	1,49	0,56	2,86	0,61	-3,23	1,80	1,60	0,60	0,30	1,08	0,64	0,99
2	0,88	0,51	0,36	0,92	1,54	1,04	4,99	0,63	1,87	0,44	1,29	1,35	0,84	0,84
20	0,72	1,07	0,55	0,79	3,20	1,30	4,99	0,83	1,68	3,29	1,61	1,24	1,82	2,13
217	1,59	0,53	0,49	1,09	3,03	0,78	-2,82	0,53	1,14	0,97	0,10	1,51	0,53	1,96
23	0,94	2,42	0,11	1,50	0,58	0,64	6,50	1,55	0,33	3,39	2,27	1,35	0,59	0,36
24	1,48	1,86	1,17	1,27	1,01	0,09	97,97	1,67	1,34	3,08	0,62	1,84	6,95	7,39
26	0,67	1,16	1,72	2,85	1,62	3,06	8,15	2,45	0,55	0,88	1,87	2,27	1,18	1,46
279	0,70	0,24	1,16	0,71	4,83	0,42	-2,54	0,47	0,99	0,40	0,10	1,39	0,44	4,62
28	2,68	1,26	0,52	-0,28	0,54	0,49	13,56	0,03	1,92	1,31	1,46	1,67	3,66	4,19
293	7,76	4,42	0,89	4,79	4,87	2,85	8,22	2,38	2,10	1,62	1,17	3,25	2,55	3,35
31	1,50	1,02	0,24	0,58	2,60	0,88	6,97	0,79	3,83	3,33	0,62	1,85	2,27	0,90
35	0,53	2,96	0,34	0,35	2,40	1,15	5,26	0,51	1,31	1,28	2,96	1,35	3,85	1,11
4	1,36	0,83	2,77	1,55	2,06	6,89	7,41	0,52	3,00	2,20	1,46	1,51	0,24	1,10
42	1,43	1,33	0,34	1,83	2,23	0,84	5,02	0,59	1,12	1,27	0,99	1,10	3,46	1,44
47	1,43	0,91	0,18	0,34	2,07	0,67	5,94	0,18	1,13	0,39	0,90	1,11	1,44	1,45
49	2,09	0,69	0,63	1,70	1,38	0,81	-3,20	0,75	1,04	0,52	0,40	1,17	0,23	0,71
54	3,68	0,83	0,58	0,50	2,63	0,71	167,58	0,19	1,67	1,31	-0,17	1,04	6,96	4,75
56	1,43	1,02	1,82	3,51	6,20	1,53	-3,26	1,73	1,57	0,59	0,85	1,34	1,08	0,76
61	0,78	0,49	0,51	1,59	1,89	0,17	6,44	2,13	0,32	1,04	6,71	1,07	0,68	1,39
66	3,14	1,57	0,61	2,72	1,58	1,06	20,30	4,18	3,25	3,67	1,19	2,11	7,07	4,21
68	1,25	0,52	2,19	3,57	1,00	0,36	6,46	1,10	0,76	4,51	2,01	1,15	0,93	0,99
70	0,50	0,15	0,56	1,40	0,73	0,42	-0,60	0,17	0,95	0,39	-0,11	1,01	0,02	0,13
73	1,60	0,47	0,76	1,61	1,68	1,51	6,52	0,62	1,06	1,64	3,23	1,63	1,39	0,55
78	2,20	1,33	2,65	5,02	3,70	2,71	-3,28	6,53	2,18	6,37	18,40	2,50	2,31	3,22
86	0,97	0,55	0,67	2,45	2,30	0,90	57,44	0,38	3,01	1,39	0,36	0,97	6,11	1,76
90	0,82	0,69	0,28	0,39	2,73	0,69	16,96	1,19	1,11	3,34	2,54	1,65	1,14	2,31
94	1,23	0,49	0,77	1,58	3,31	0,77	5,14	0,31	1,39	0,38	0,93	1,49	1,06	1,71
96	4,28	0,50	1,44	1,21	4,09	0,88	5,23	1,30	3,57	1,89	1,65	1,35	1,69	1,92
99	2,43	0,58	1,21	2,00	4,95	2,68	7,74	0,62	1,53	1,05	3,15	1,64	1,73	1,80
Sun	0,61	1,05	1,33	1,37	0,54	1,19	117,75	1,16	5,56	1,50	1,06	11,95	1,66	0,93
Trif	0,16	0,25	0,30	0,58	1,90	0,52	27,90	0,50	0,39	0,93	1,28	3,45	0,97	0,56