



Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Agrárias – *Campus* de Araras

Fernanda Nara Mauricio

**Análise da expressão de genes relacionados à defesa em
novos híbridos de citros resistentes à Clorose Variegada dos
Citros e mapeamento de eQTL**

Araras - SP

2013



Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Agrárias – *Campus* de Araras

Fernanda Nara Mauricio

**Análise da expressão de genes relacionados à defesa em
novos híbridos de citros resistentes à Clorose Variegada dos
Citros e mapeamento de eQTL**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de
Pós Graduação em
Agricultura e Ambiente, do
Centro de Ciências Agrárias,
da Universidade Federal de
São Carlos.

Orientadora: Dra. Ane Hackbart de Medeiros

Co-orientadora: Dra. Mariângela Cristofani –Yaly

Araras – SP

2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M455ae Mauricio, Fernanda Nara.
Análise da expressão de genes relacionados à defesa em novos híbridos de citros resistentes à Clorose Variegada dos Citros e mapeamento de eQTL / Fernanda Nara Mauricio. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
66 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Mapeamento genético. 2. Clorose Variegados Citros. 3. Melhoramento genético. I. Título.

CDD: 574.873223 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DE
FERNANDA NARA MAURÍCIO
APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA
E AMBIENTE, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM **29 DE**
AGOSTO DE 2013.

BANCA EXAMINADORA:



PROFA. DRA. ANE HACKBART DE MEDEIROS

ORIENTADORA

UFSCAR



DRA. MARIÂNGELA CRISTOFANI-YALY

CO-ORIENTADORA

IAC



DRA. ALESSANDRA ALVES DE SOUZA

IAC



PROFA. DRA. ROBERTA CORNÉLIO FERREIRA NOELLI

UFSCAR

*Dedico essa dissertação a minha mãe,
Arlete, que me apoiou de forma
irrestrita para que esse trabalho fosse
desenvolvido com empenho e acuidade,
que me motivou para o estudo e para a
busca de conhecimento desde os
primeiros anos escolares. Inspirou-me
com sua competência, dignidade e
honestidade.*

*Ofereço ao Daniel,
meu parceiro no laboratório e fora
dele, que me estimulou com o seu
pensamento científico, apoiou nos
momentos difíceis e garantiu
soluções viáveis para problemas que
eu já não sabia como resolver.*

Se não puderes ser um pinheiro, no topo de uma colina,
Sê um arbusto no vale, mas sê
O melhor arbusto à margem do regato.
Sê um ramo, se não puderes ser uma árvore.
Se não puderes ser um ramo, sê um pouco de relva
E dá alegria a algum caminho.

Se não puderes ser uma estrada,
Sê apenas uma senda,
Se não puderes ser o Sol, sê uma estrela.
Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...
Mas sê o melhor no que quer que sejas.

Pablo Neru

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ane Hackbart de Medeiros, pela orientação, pelo apoio e pelos ensinamentos;

À Dra. Mariângela Cristofani-Yaly, por toda paciência, apoio e carinho, por dedicar o seu escasso tempo a esse trabalho e principalmente, por todo o conhecimento que tive o privilégio de receber ao longo desses anos;

Ao Dr. Marcos Antônio Machado, pela oportunidade de estagiar no Centro de Citricultura Sylvio Moreira;

À Dra. Alessandra Alves de Souza, Dra. Carolina Munari Rodrigues e Dra. Simone Cristina Picchi, pela disponibilidade de sanar minhas dúvidas ao longo dos experimentos desse trabalho;

À Dra. Marinês Bastianel pelo apoio durante a coleta e no desenvolvimento do projeto;

Ao Dr. Leonardo Boava, por auxiliar o meu desenvolvimento acadêmico e científico;

Ao CNPq/INCT pela bolsa concedida;

Ao Daniel Castro, que auxiliou no desenvolvimento dos gráficos e na revisão da dissertação;

Aos meus colegas de laboratório Cíntia, Marcus, Salete e a todos que de maneira direta ou indireta influenciaram o meu trabalho;

Aos meus amigos da graduação, mestrado e aos que me acompanham desde a infância por aguçarem a minha ânsia pela ciência e por todas as palavras de incentivo;

À minha mãe, pelo apoio irrestrito e paciência nessa longa jornada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS	3
2.2. CONTROLE E RESISTÊNCIA	5
2.3. MAPAS GENÉTICOS	6
2.4. MARCADORES FUNCIONAIS	7
2.5. PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.....	8
3. OBJETIVOS	10
3.1. OBJETIVO GERAL	10
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1. IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS RESISTENTES, TOLERANTES E SUSCETÍVEIS A PARTIR DE ANÁLISE DE SINTOMA, DIAGNÓSTICO EM PCR CONVENCIONAL E EM TEMPO REAL	11
4.2. DESAFIO DOS HÍBRIDOS RESISTENTES COM AS RESPECTIVAS BROTAÇÕES SUSCETÍVEIS ORIGINADAS DOS RAMOS UTILIZADOS COMO INÓCULO DE <i>X. fastidiosa</i>	15
4.2.1. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA	15
4.2.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM DEFESA À CVC.....	16
4.3. PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.....	18
4.4. ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA PARA HÍBRIDOS DO CRUZAMENTO DE LARANJA PERA COM TANGOR MURCOTT COM GENES SELECIONADOS A PARTIR DE MICROARRANJO.....	20
4.5. MAPEAMENTO GENÉTICO ATRAVÉS DOS RESULTADOS DA ANÁLISE DE SINTOMA, DIAGNÓSTICO DE BACTÉRIA E EXPRESSÃO GÊNICA	20
4.5.1. IDENTIFICAÇÃO DE QTLs E eQTLs	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1. IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS A PARTIR DE ANÁLISE DE SINTOMA, DIAGNÓSTICO EM PCR CONVENCIONAL E EM TEMPO REAL.....	22

5.2. DESAFIO DOS HÍBRIDOS RESISTENTES COM AS RESPECTIVAS BROTAÇÕES SUSCETÍVEIS ORIGINADAS DOS RAMOS UTILIZADOS COMO INÓCULO DE <i>X. fastidiosa</i>	26
5.3. ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA PARA HÍBRIDOS DO CRUZAMENTO DE LARANJA PERA COM TANGOR MURCOTT COM GENES SELECIONADOS A PARTIR DE MICROARRANJO.....	33
5.3.1 ANÁLISE COMPARATIVA DOS GENES SELECIONADOS PELOS MICROARRANJO	33
5.3.2. ANÁLISE COMPARATIVA DOS GENES SELECIONADOS PELO MICROARRANJO COM OS HÍBRIDOS (RESISTENTES, TOLERANTES E SUSCETÍVEIS) E ANÁLISE DE CORRELAÇÃO CANÔNICA PARA OS HÍBRIDOS IDENTIFICADOS CONTRASTANTES (RESISTENTES E SUSCETÍVEIS)	35
5.3.3. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS HÍBRIDOS CONTRASTANTES (RESISTENTES E SUSCETÍVEIS) E DA CONCENTRAÇÃO DE BACTÉRIA E DA MENSURAÇÃO DE SINTOMAS NAS PLANTAS.	38
5.3.4. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS HÍBRIDOS TOLERANTES E DA CONCENTRAÇÃO DE BACTÉRIA E DA MENSURAÇÃO DE SINTOMAS NAS PLANTAS.....	42
5.4. MAPEAMENTO DE REGIÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA A CVC ATRAVÉS DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE QUANTIFICAÇÃO DE SINTOMAS, DE BACTÉRIA E DA EXPRESSÃO GÊNICA.	44
5.4.1. MAPEAMENTO DE QTLs E eQTLs.....	46
6. CONCLUSÕES	52
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXO I.....	62
ANEXO II.....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – “ <i>Primers</i> ” para diagnóstico convencional de CVC.....	14
TABELA 2 – “ <i>Primers</i> ” para diagnóstico em tempo real de CVC.....	15
TABELA 3 - Sequências dos “ <i>Primers</i> ” utilizados no qPCR.	19
TABELA 4 - Amostras diagnosticadas para <i>X. fastidiosa</i> em tempo real e em diagnóstico convencional e análise de sintomas.	24
TABELA 5 - Diagnóstico de <i>X. fastidiosa</i> para os híbridos assintomáticos e para as brotações dos inóculos.....	27
TABELA 6 - Correlação de Pearson para híbridos contrastantes, valor do coeficiente de determinação (R) e valor de p	39
TABELA 7 - Correlação de Pearson para híbridos tolerantes, valor do coeficiente de determinação (R) e valor de p	42
TABELA 8 - Grupos de ligação (GL), número de marcadores por grupo de ligação e a distância em centimorgan.....	46
TABELA 9 - Detalhes dos QTLs e eQTLs detectados nos grupos de ligação do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera pelo método Interval QTL Mapping associados às variáveis estudadas.....	51

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - A - Folhas com sintomas. B – Folhas sem sintomas de CVC.....	4
FIGURA2 - Vista do experimento estabelecido no Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios da Alta Mogiana.....	11
FIGURA3 - Descrição do híbrido provável resistente e respectivo inóculo.....	17
FIGURA 4 - Curva de quantificação de <i>X. fastidiosa</i> desenvolvida com base em 5 pontos com concentração conhecida de bactéria.....	23
FIGURA 5 - Gráfico de dispersão para análise de correlação de Pearson entre sintomas e quantificação de bactéria <i>X. fastidiosa</i> para os híbridos suscetíveis.....	25
FIGURA 6 - Correlação canônica para onze híbridos assintomáticos e inóculo suscetível para genes de resistência, quantificação de bactérias e sintomas.....	28
FIGURA 7 - Análise baseada no programa Rest 2009	30 e 31
FIGURA 8 - <i>Heatmap</i> da análise de correlação comparando genes selecionados pelo microarranjo.....	34
FIGURA 9 - <i>Heatmap</i> da expressão dos genes relacionados com resistência selecionados pelo microarranjo nos híbridos estudados nesse trabalho.....	36
FIGURA 10 - Análise de Correlação Canônica para híbridos resistentes e suscetíveis para o grupo de variável “genes” e o para o segundo grupo de variável “bactérias e sintomas”.....	38

FIGURA 11 - Gráficos de correlação de Pearson entre a expressão gênica dos híbridos contrastantes (resistentes e suscetíveis), concentração de bactéria e a mensuração de sintomas nas plantas.....	41
FIGURA 12- Correlação de Pearson para expressão gênica dos híbridos tolerantes, concentração de bactéria e mensuração de sintomas nas plantas A- Correlação de Pearson para o gene da PDRR B- Correlação de Pearson para o gene da Quitinase.....	43
FIGURA 13 - Mapa genético integrado de tangor Murcott e laranja Pera com nove grupos de ligação e 236 marcadores DArT.....	45
FIGURA 14 - Grupos de ligação (GL) do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera e QTLs associados à característica sintomas.....	47
FIGURA 15 - Grupos de ligação (GL) do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera e QTLs associados à característica concentração de bactérias..	47
FIGURA 16 - Grupos de ligação (GL) do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera e eQTL associado ao gene que expressa o Ácido Abscísico.....	48
FIGURA 17 - Grupos de ligação (GL) do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera e eQTL associado ao gene responsável pela expressão da Taumatina.....	48
FIGURA 18 - Grupos de ligação (GL) do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera e eQTL associado ao gene responsável pela expressão da <i>NBS-LRR-RGH1</i>	49
FIGURA 19 - Grupos de ligação (GL) do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera eeQTLs associados ao gene responsável pela expressão da Quinase <i>Xa21</i>	49
FIGURA 20 - Grupos de ligação (GL) do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera e eQTLs associados ao gene responsável pela expressão da Anquirina.....	50

ANÁLISE DE EXPRESSÃO GENES RELACIONADOS À DEFESA EM NOVOS HÍBRIDOS DE CITROS RESISTENTES A CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS E MAPEAMENTO DE eQTL

RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, mas não apresenta maior produtividade devido a problemas fitossanitários. Um dos principais problemas é a Clorose Variegada dos Citros (CVC) causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, que promove a obstrução do xilema, causando desordens fisiológicas na planta e em casos avançados, afetando os frutos. A CVC acomete as variedades de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, conhecidas como laranjas-doce, sobre diferentes porta-enxertos, todavia não são encontrados sintomas em tangerinas e híbridos comerciais. Neste estudo, os híbridos obtidos a partir de cruzamentos controlados entre tangor Murcott [*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck] com laranja Pera [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] foram avaliados através da análise dos sintomas, o diagnóstico por meio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) convencional e em tempo real, mostrando sete híbridos resistentes, vinte e quatro híbridos tolerantes e seis híbridos suscetíveis. As análises de expressões dos genes (*NBS-LRR – RGH1*, Ácido Abscísico, Taumatina, Quitinase, Quinase *Xa21*, Quinase *CHRK1*, Isoflavone Sintase, Proteína de Defesa Relacionada com Resistência - *PDRR*, Sem Produto Definido - *SPD*, Isoflavona Redutase, *HCr2-0A*, Anquirina e *GST22*) possibilitaram entender a relação entre a resistência a *X. fastidiosa* e a expressão gênica. Foram mapeados QTLs (*Quantitative Trait Loci*) através da quantificação de sintomas, concentração de bactérias. Baseados em um conjunto de resultados, foram detectados eQTLs (QTLs de expressão) de genes avaliados em trinta e sete híbridos.

Termos para Indexação: CVC, mapeamento genético, melhoramento genético

ANALYSIS OF DEFENSE-RELATED GENE EXPRESSION IN NEW CITRUS HYBRIDS RESISTANT TO CITRUS VARIEGATED CHLOROSIS AND eQTL MAPPING

ABSTRACT

Brazil is the largest producer of sweet orange, but the productivity is not the highest due to disease problems. A major problem is the Citrus Variegated Chlorosis (CVC) caused by the bacterium *Xylella fastidiosa*, which promotes obstruction of the xylem, causing physiological disorders in plant and in advanced cases, affecting fruits, leading to production losses. In this study, hybrids obtained from controlled crosses between Murcott tangor [*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck] and Pera sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] were evaluated by analysis of symptoms, diagnosis through conventional and real time PCR (Polymerase Chain Reaction) , showing seven resistant hybrids, twenty-four tolerant hybrids and six susceptible hybrids. The expressions of thirteen genes [*NBS-LRR - RGH1*, Abscisic Acid (*ABA*), Thaumatin, Chitinase, *Xa21* Kinase, Kinase *CHRK1*, Isoflavone Synthase, Protein Defense-Related Resistance - *DRRP*, No Product Set - *SPD*, Isoflavone Reductase, *HCr2-0A*, Ankyrin, Glutathione *GST-22* associated with resistance were evaluated, and it was possible to relate the resistance to *X. fastidiosa* with gene expression. QTL (Quantitative Trait Loci) were mapped through the quantification of symptoms and bacterial concentration and expression QTL (eQTL) of genes were carried out with the evaluation of thirty-seven hybrids.

Index Terms: CVC, genetic mapping, genetic breeding

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, na década de 80, se tornou o maior produtor mundial de laranjas pelo grande desenvolvimento da citricultura e por estabelecer uma indústria competitiva (SENHORAS et al., 2006). Atualmente, o Brasil é responsável por cerca de 50% da produção mundial de suco de laranja, exportando ao redor de 98%. São Paulo e Florida (EUA) respondem por cerca de 80% da produção mundial de suco de laranja e o Estado de São Paulo, isoladamente, é responsável por 53% do total. São claras as evidências da tamanha importância da citricultura no estado de São Paulo (NEVES; MÔNACO NETO, 2012).

Sabe-se que as condições climáticas favorecem a cultura dos citros no Brasil e o aumento da produção, mas ainda assim o principal problema enfrentado pela citricultura é o seu desempenho com produtividade média muito baixa quando comparada com outras regiões produtoras, devido principalmente a fatores de ordem fitossanitária (MACHADO et al., 2005). Um dos principais problemas é a Clorose Variegada dos Citros (CVC) causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, que promove a obstrução do xilema, causando desordens fisiológicas na planta e em casos avançados, afetando os frutos, o que leva a perdas na produção (MACHADO et al., 2006).

Uma das estratégias utilizadas para superar os problemas relacionados à fitopatógenos tem sido a utilização de variedades tolerantes ou resistentes (CAMPOS et al., 2010). Tal estratégia tem possibilitado a manutenção da citricultura em diferentes regiões no Brasil. O Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC vem realizando, desde 1997, um programa de melhoramento

genético de citros via cruzamentos dirigidos. Populações de híbridos obtidas de hibridações entre diversas variedades de citros, selecionadas por marcadores moleculares, foram estabelecidas em várias regiões do estado de São Paulo, constituindo-se em uma rede experimental de novos genótipos (CRISTOFANI-YALY et al., 2007). Dentre as novas combinações de copa, foram selecionados híbridos do cruzamento entre tangor Murcott (resistente a CVC) e laranja Pera (suscetível a CVC) (COLETTA FILHO et al., 2007).

Estudo de padrões globais de expressão gênica tem contribuído para identificação de genes envolvidos em diversas vias metabólicas. Jansen e Nap (2001) propuseram a genética genômica como uma técnica que engloba o mapeamento de loci quantitativos e análises de microarranjos 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 (eQTL), e cada vez mais resultados de mapeamento de eQTLs estão surgindo na literatura (BREM et al., 2002; SCHADT et al., 2003; MONKS et al., 2004; HUBNER et al., 2005, DROST et al., 2010).

A identificação de eQTL e dos genes cuja expressão eles regulam é de grande interesse para revelar os componentes chave da arquitetura genética que desencadeiam muitos fenômenos biológicos (SCHADT et al., 2003) e o entendimento genético de diferentes vias tem sido fundamental não só para a compreensão dos mecanismos biológicos estudados como para o desenvolvimento de novas estratégias para solucionar problemas da agricultura através da manipulação genética (BRUNO; WETZEL, 2004).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS

A Clorose Variegada dos Citros (CVC), doença conhecida como amarelinho, é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, sendo esta agente causal de doenças em aproximadamente 28 famílias de plantas (ALVES, 2003).

Os vetores de transmissão da *X. fastidiosa* são insetos de onze diferentes espécies todos pertencentes a ordem Hemiptera (FUNDECITRUS, 1999). Esses insetos apresentam a capacidade de inserir compostos químicos nas plantas hospedeiras, das quais se alimentam da seiva do xilema (MARUCCI et al., 2002; PINTO et al., 2008).

A doença se caracteriza pela obstrução dos vasos do xilema da planta, assim há uma deficiência na translocação de água nos vasos colonizados pela bactéria (PRIA JÚNIOR et al., 2003). As folhas das plantas com CVC apresentam sintomas de deficiência hídrica, há também decréscimos significativos nas taxas de assimilação de CO₂ e de transpiração, na condutância estomática e no potencial da água na folha (ALVES et al., 2004).

Esses sintomas estão relacionados com o aumento da resistência do fluxo de água no xilema. Na infecção prolongada por *X. fastidiosa* há também o aumento na concentração de compostos fenólicos na folha e na atividade de enzimas relacionadas aos mecanismos naturais de defesa contra patógenos (MEDINA, 2002). Manchas amarelas adaxiais na folha, que inicialmente não são muito extensas, são os primeiros sintomas de CVC, podendo ser confundidas com deficiência de zinco (SANTOS FILHO et al., 2010).

Surge também clorose na face inferior da folha correspondendo a manchas que variam entre o vermelho e o marrom. Com o passar do tempo áreas que apresentam essas lesões podem ficar cloróticas e necróticas (Figura 1). Posteriormente, ocorrem sintomas nos frutos que estão presentes nos ramos sintomáticos (ROSSETTI; DE NEGRI, 1990). Frutos sintomáticos só aparecem em ramos já afetados, o que altera suas características físicas e químicas, tornando-os pequenos, endurecidos, com amarelecimento precoce e lesões escuras (SANTOS FILHO et al., 2010). Em pomares afetados a produção cai rapidamente, podendo chegar a perdas de 75% no peso do fruto (NEVES; LOPES, 2005).



Figura 1. A – Folhas com sintomas. B – Folhas sem sintomas de CVC.

Segundo Purcino (2006), o xilema provém um excelente ambiente nutricional para o crescimento da bactéria, porém a concentração dos nutrientes encontrados na seiva do xilema é bastante baixa, o que sugere a especialização por parte da bactéria para melhor aproveitamento dessas

substâncias, induzindo o aparecimento de sintomas de desequilíbrio nutricional em plantas doentes, como por exemplo, os sintomas de deficiência de zinco.

A CVC acomete as variedades de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, ou comumente referidas como laranjas-doce, sobre diferentes porta-enxertos, todavia não são encontrados sintomas em tangerinas e híbridos comerciais como tangor Murcott, em limões verdadeiros e lima ácida Galego, mesmo quando as plantas estão localizadas em áreas altamente infectadas (CARVALHO et al. 1995).

2.2. CONTROLE E RESISTÊNCIA

Entre as principais medidas para controle da CVC, a redução da população dos insetos vetores por meio de aplicações preventivas de inseticida é hoje a mais adotada pelos citricultores (CONSONI, 2011). O manejo da CVC inclui ainda o plantio de mudas sadias e poda de ramos sintomáticos ou eliminação de árvores severamente doentes (FUNDECITRUS, 2004).

As plantas descritas como suscetíveis possibilitam a multiplicação do patógeno no seu interior, em resposta a isso a planta demonstra os sintomas da doença. O termo tolerante refere-se a uma planta que não tem a capacidade de prevenir o estabelecimento ou restringir o crescimento do patógeno, mas pode suportar o estresse causado por ele. Essa característica é extremamente interessante para a citricultura, já que a produtividade não apresenta perdas quando comparadas com as sadias. Entretanto, a tolerância pode causar problemas, já que pode ser um depósito silencioso de patógenos, que auxilia na propagação da doença em campo (KIMATI et al.,1997). Já as plantas resistentes não apresentam multiplicação do patógeno.

A utilização de plantas resistentes pode ser a solução mais adequada para o controle da CVC (PURCELL, 1994) e levando em conta as limitações do melhoramento tradicional, a biotecnologia é um novo caminho para identificação de genes e características de interesse agrônômico.

Cada vez mais, procura-se entender a resistência em planta. Sabe-se de dois tipos de resistência: a constitutiva, como uma parede celular mais resistente o que dificulta a herbivoria e a resposta tardia, ou seja, a possibilidade da planta ter uma reação adquirida e sinalizada por elicitores como o que ocorre na formação de fitoalexinas que são compostos de baixo peso molecular identificados em mais de 30 espécies diferentes de plantas (MELLO; SILVA FILHO, 2002; YAMAMOTO et al., 2002).

Há estratégias básicas empregadas pelas plantas para reduzir o dano causado pela herbivoria, essas defesas são classificadas em: física, como tricomas, espinhos e folhas mais fibrosas ou químicas como compostos secundários que reduzem a digestibilidade e palatabilidade das plantas (HARTLEY; JONES, 1997).

A defesa envolve reações da planta ligadas à ativação de genes específicos como os de hipersensibilidade, resistência sistêmica adquirida, produção de lignina, enzimas hidrolíticas e fitoalexinas (DANGL et al., 2000).

Essas respostas induzidas por um fator de estresse na planta são resultantes da expressão de genes em condições de adversidade e, através da análise de seus transcritos, é possível a identificação de genes que produzam proteínas de defesa.

2.3. MAPAS GENÉTICOS

Os mapas genéticos são representações das posições e das distâncias relativas do locus gênico (região ocupada por um gene) ao longo da molécula cromossômica. Na construção são utilizadas as porcentagens de recombinantes como indicador quantitativo da distância linear entre dois genes (SALGADO, 2008). Os primeiros mapas genéticos foram fundamentados em características morfológicas e citológicas, sendo descritos com base em aneuploidias, translocações e deleções, alterações essas comuns em milho, tomate e ervilha, como nanismo, deficiência de clorofila, cor das pétalas e morfologia foliar que são usadas como marcadores fenotípicos (COE et al., 1988).

Na década de 80 o mapeamento genético começa a ser baseado em marcadores moleculares e, assim, ampliando as espécies mapeadas. Baseados na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) descrita por Saiki em 1985 (BATISTA PINTO, 2007), surgiram marcadores do tipo RAPD, AFLP e SSR. E, também, os marcadores DArT (*Diversity Arrays Technology*), técnica que analisa simultaneamente vários loci polimórficos espalhados pelo genoma e sendo esse um marcador dominante (JACCOUD et al., 2001).

2.4. MARCADORES FUNCIONAIS

A possibilidade de estudar marcas genéticas e estabelecer função a essas marcas torna a análise genética um ponto de partida para solucionar problemas crônicos da agricultura. Na década de 90, os marcadores moleculares eram a base de estudos por possibilitarem a análise de

características quantitativas (JANSEN; NAP, 2001). Os QTL (*Quantitative Trait Loci*) são *loci* relacionados com características que apresentam uma variação contínua no fenótipo mensurado. As características quantitativas são determinadas por muitos genes, cada um deles com pequeno efeito (GRIFFITHS et al., 2008). Entretanto, alguns desses genes podem ter maior importância no controle de determinada característica fenotípica (DEKKERS; HOSPITAL, 2002). É possível identificar o QTL por meio da utilização de marcadores em uma população através de delineamento experimental específico que proporcione o desequilíbrio de ligação (MEIRELLES, 2007). O mapeamento de QTL tem sido utilizado para mapear genes para várias características em diferentes espécies (EMBRAPA, 2007).

Já os marcadores funcionais surgem da estratégia de mensurar a variação da expressão gênica (eQTL) entre indivíduos de uma população segregante, possibilitando o mapeamento da expressão diferencial (JANSEN; NAP, 2001). O mapeamento por eQTL consiste em determinar uma região cromossômica como atuante na expressão de um gene, é ainda mais interessante quando combinado ao mapeamento por QTL (SCHADT et al., 2005). Em citros estudos foram realizados com *Phytophthora parasitica* com a finalidade de entender a resistência e suscetibilidade das plantas (BOAVA et al., 2010). Com *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), o vírus da leprose dos citros, foi desenvolvido um estudo de expressão diferencial para identificar os mecanismos de resistências em um cruzamento de um genótipo resistente (tangor Murcott) e um suscetível (laranja Pera) (KUBO, 2011). Assim, demonstra-se que o estudo de eQTL é importante para compreender a

genética envolvida na produtividade, o processo de resistência a doenças e os mecanismos de resposta ao estresse.

2.5. PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

Após do desenvolvimento da técnica de PCR que foi uma revolução para o estudo da biologia, desejava-se o desenvolvimento de uma técnica que permitisse entender individualmente diferentes reações em uma mesma análise. Em 1996, Applied Biosystems desenvolveu o PCR em tempo real que se tornou o mais preciso e sensível método para a detecção e quantificação de ácidos nucleicos. O aparelho descreve uma leitura contínua de sinal fluorescente a partir de reações em cadeia ao longo de um intervalo de ciclos, convertendo os sinais fluorescentes em um valor numérico específico para cada amostra (DORAK, 2006).

A PCR em tempo real precisa de um termociclador com sistema ótico para perceber a excitação da fluorescência e computador com software específico para analisar essa fluorescência, assim na análise desenvolvida nesse tipo de equipamento precisa ser adicionado fluoróforos que são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda conhecido.

Para análise de cDNA é amplamente utilizado o SYBR® Green, que anela em fita dupla de DNA, com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite uma fluorescência verde. Para uma análise ainda mais precisa é utilizado o sistema Taqman, já que esse apresenta além dos primers específicos uma sonda com uma extremidade com o fluoróforo e a outra

extremidade um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz) (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Nos ciclos iniciais é formada a linha de base (*baseline*) que são pequenas alterações no sinal de fluorescência que é usada para o gráfico de amplificação. O parâmetro CT (*cycle threshold*) é definido como o ciclo no qual a fluorescência ultrapassar linha de base, os métodos de análise utilizam o CT como padrão de estudo (APPLIED BIOSYSTEMS, 2012). O uso do PCR em tempo real permite a comparação dos diferentes níveis de expressão de um mesmo gene em diferentes cultivares, tecidos, estádios de desenvolvimento ou situação adversas ao ambiente (APPLIED BIOSYSTEMS, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo principal a avaliação da resistência a CVC em híbridos da progênie de tangor Murcott e laranja Pera, validação da expressão diferencial de genes entre híbridos resistentes e suscetíveis e mapeamento genético de QTL e eQTL relacionados à resistência a CVC.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a)** Identificar híbridos resistentes, tolerantes e suscetíveis a partir de análise de sintoma, diagnóstico em PCR convencional e em tempo real;
- b)** Desafio dos híbridos resistentes originados do cruzamento de laranja Pera [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] com tangor Murcott [*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck] e respectivas brotações suscetíveis originadas dos ramos utilizados como fonte de inóculo de *X. fastidiosa* [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck];
- c)** Estudo da expressão gênica para híbridos do cruzamento de laranja Pera com tangor Murcott com genes selecionados a partir de ensaios utilizando microarranjos;
- d)** Mapear regiões do genoma relacionados à resistência através dos resultados da análise da quantificação de sintomas, bactérias e expressão gênica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS RESISTENTES, TOLERANTES E SUSCETÍVEIS A PARTIR DE ANÁLISE DE SINTOMA, DIAGNÓSTICO EM PCR CONVENCIONAL E EM TEMPO REAL.

O experimento foi instalado em 2007 (Figura 2), em delineamento inteiramente casualizado no Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios da Alta Mogiana vinculado à Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), em Colina, estado de São Paulo à latitude de 20°42'48" sul e longitude 48°32'27" oeste.



Figura 2. Vista do experimento estabelecido no Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios da Alta Mogiana.

As plantas estavam com um ano de idade quando foram inoculadas com *X. fastidiosa*, em casa de vegetação, através da metodologia de enxertia de borbulhões de uma planta de laranja Pera sabidamente infectada por *X. fastidiosa* e sintomática e foram plantadas em campo após seis meses da inoculação em 2007. O experimento foi constituído de 96 plantas, sendo 94 híbridos e os genitores do cruzamento entre tangor Murcott (*C. sinensis*

Osbeck vs *C. reticulata*) vs laranja Pera (*C. sinensis* Osbeck)] com quatro repetições.

A população, já estabelecida no campo, foi avaliada para resistência à CVC. Na avaliação da severidade da doença foi utilizada uma escala de notas composta de sete níveis, variando de 0 a 6, sendo 1 (3%), 2 (6%), 3 (15 %), 4 (25 %), 5 (35%) e 6 (56%) de área com clorose adaptada de Amorim et al. (1993). Para as análises estatísticas, utilizou-se o teste paramétrico Scott Knott (SCOTT; KNOTT, 1974), que separa as médias mediante comparações entre grupos de dados, calculado por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2008).

4.1.1. EXTRAÇÃO DO DNA

Foram coletadas de cinco a seis folhas de diversos ramos das plantas, o ácido desoxirribonucleico (DNA) total (planta + bactéria) foi extraído, pelo método Doyle e Doyle (1990), a partir de 100 mg de tecidos das nervuras centrais de folhas frescas e limpas. As nervuras foram trituradas em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino e homogêneo. Em seguida, foram adicionados 700 µL de tampão de extração (5% CTAB; 1 M Tris-HCl pH 7,5; 0,5 M EDTA; 0,7 M; 5 M NaCl; 0,3 g PVP; 150 mL 2-mercaptoetanol) e levemente homogeneizados no vórtex e incubados em banho-maria por 15 minutos a 60°C. Posteriormente, foram adicionado 600 µL de CIA (24:1 clorofórmio:álcool isoamílico). Agitou-se manualmente para homogeneizar e centrifugou-se por 6 minutos a 12000 rpm.

Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, homogeneizados com 300 µL de tampão de extração e 700 µL de CIA e

centrifugados por 6 minutos a 12000 rpm. Novamente foi retirado o sobrenadante, com posterior adição de isopropanol e agitado gentilmente, após 30 minutos em repouso, centrifugou-se por 8 minutos a 12000 rpm. Descartaram-se os sobrenadantes, acrescentaram-se 300 µL de etanol 70% e mais 5 minutos de centrifugação a 12000 rpm. O precipitado foi seco em temperatura ambiente. O DNA obtido foi dissolvido em 100 µL de H₂O MilliQ contendo 10 µg/µL de RNase para a eliminação completa de contaminação por RNA e, posteriormente, acondicionado em freezer -20°C para posterior utilização. As concentrações desses DNAs foram determinadas por espectrometria no espectrofotômetro *Nanodrop 8000* (Thermo Scientific) (espectro completo de 220 a 750 nm).

4.1.2. PCR convencional

A PCR convencional foi feita em termociclador Veriti 384-well Thermal Cycler da Applied Biosystems (ABI) com *primers* específicos (Tabela 1). As reações de amplificação tiveram volume final de 25 µL com os seguintes componentes: 14,4 µL de água, 2,5 µL de tampão de reação 10x, 2,5 µL de MgCl₂, 0,8 µL de 5 mM dNTPs, 0,8 µL do primer CVC-1 a 20 nmol e 0,8 µL do *primer* do 272-2 a 20 nmol, 0,2 µL de Taq DNA polymerase e ainda 2 µL de DNA. A PCR foi realizada com temperatura de desnaturação do DNA a 94°C por 2 min. A seguir, 5 ciclos a 94°C por 45 s, 35°C por 45 s, e 72°C por 1 min, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 45 s, 50°C por 45 s, 72°C por 1 min e um passo de extensão a 72°C por 7 min. Os produtos dessa reação foram visualizados em gel de agarose a 1% com 2 µL de brometo de etídio (0,5 ng/mL).

Tabela 1: *Primers* para diagnóstico convencional de CVC

Genes	Sequências
CVC-1	AGATGAAAACAATCATGCAAA
272-2	GCCGCTTCGGAGAGCATTCT

4.1.3. PCR em tempo Real

Os DNAs foram utilizados no monitoramento da quantidade de bactéria nos tecidos por RT-PCR no aparelho ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems). A reação de amplificação foi realizada num volume de 10 μ L contendo 6,5 μ L TaqMan PCR Master Mix fast (Applied Biosystems), 1,5 μ L da sonda desenvolvida para *X. fastidiosa* a uma concentração de 6.000 pmoles e 1,5 μ L dos *primers* CVC-1 e CCSM-1 (Tabela 2) como descritos por Oliveira et al., (2002), e 2 μ L do DNA da amostra diluída a 50 ng/ μ L. Todas as amostras foram avaliadas em triplicatas dentro de cada corrida experimental. As condições de amplificação utilizadas foram: um período inicial de incubação a 50°C por 2 min, seguido por 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. A amplificação e a captura do sinal foram realizadas no ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems).

A quantificação da bactéria foi realizada em curva padrão otimizada e validada a eficiência de amplificação, segundo Oliveira et al. (2002), desenvolvida com base em concentrações conhecidas de DNA da *X. fastidiosa* obtidas a partir da amplificação de diluições seriadas de 1×10^3 a 1×10^8 ng/ μ L.

Com base nesses cinco pontos de concentração conhecida de *X. fastidiosa* foi desenvolvida a curva padrão e assim equação da reta.

Tabela 2 : *Primers* para diagnóstico em PCR quantitativo em tempo real

Genes	Sequências
CVC-1	AGATGAAAACAATCATGCAAA
CCSM-1	GCGCATGCCAAGTCCATATTT

4.2. DESAFIO DOS HÍBRIDOS RESISTENTES COM AS RESPECTIVAS BROTAÇÕES SUSCETÍVEIS ORIGINADAS DOS RAMOS UTILIZADOS COMO FONTE DE INÓCULO DE *X. fastidiosa*

Foram selecionadas dez plantas em campo que não apresentaram sintoma da doença na copa (híbrido) (Figura 3), entretanto eram extremamente sintomáticas as brotações dos ramos oriundos da fonte de inóculo responsáveis pela infecção de *X. fastidiosa* no híbrido. Para confirmar a resistência dos híbridos foi utilizado o diagnóstico em PCR tempo real, sendo que os DNAs das folhas foram extraídos com o mesmo protocolo relatado anteriormente. OPCR em tempo real foi utilizado, também, para entender a expressão diferencial dos genes relacionados à resistência a partir dos RNAs extraídos da copa (híbrido) e da fonte de inóculo (laranja Pera).

4.2.1. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

A extração de RNA total do material vegetal foi realizada com TRIZOL[®] (Invitrogen) e purificado com o *mini kit RNeasy plant* (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. Para evitar contaminações com DNA genômico, as amostras foram tratadas com RNase-free DNase set (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total foi quantificado por espectrometria no espectrofotômetro *Nanodrop 8000* (Thermo Scientific) e sua integridade, avaliada em eletroforese em gel de agarose desnaturante contendo formaldeído.

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando-se o *Revertaid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas) com a utilização de *primers* randômicos (Fermentas), a partir de 1µg do RNA total, segundo instruções do fabricante. Os cDNAs foram utilizados em duplicada na seguinte reação: 3µL de cDNA diluído (1:25), 2µl de cada *primer* (direto e reverso) , 10 µL de “Promega Gotaq” e 5 µl com água Milli-Q. As reações foram incubadas a 50°C por 2 min, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1minuto a 60°C. As amplificações foram conduzidas no ABI PRISM 7500 Fast SDS versão 1.4 (Applied Biosystem).

4.2.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM DEFESA À CVC

A análise de microarranjo (projeto FAPESP intitulado “Avaliação de novos híbridos de citros para resistência a clorose variegada dos citros” Processo: 2008/05174-9) possibilitou a seleção de 13 genes relacionados à

resistência para a validação através da técnica PCR quantitativo em tempo real, os genes escolhidos estão relacionados com a defesa da planta e processos que podem originar resistência. A lâmina de microarranjo foi composta de unigenes de três diferentes espécies, *C. sinensis*, *C. reticulata* e *P. trifoliata*. Os dados das hibridizações foram analisados no software ArrayStar 3.0, onde os diferencialmente expressos foram selecionados com base nos transcritos que apresentaram-se induzidos mais de duas vezes (fold>2) e *p*-valor < 0,05, o que resultou em 163 unigenes diferencialmente expressos .

Os genes selecionados foram os codificadores de *NBS-LRR –RGH1*, Ácido Abscísico (*ABA*), Taumatina, Quitinase, Quinase *Xa21*, Quinase *CHRK1*, Isoflavona Sintase, Proteína de Defesa Relacionada com Resistência - *PDRR*, Sem Produto Definido -*SPD*, Isoflavona Redutase, *HCr2-0A*, Anquirina e Glutathione-*GST 22*. Para avaliar as diferenças nas expressões gênicas foi utilizada a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Nesse modelo os dados informam uma relação entre o gene endógeno e um controle sem tratamento experimental.

Assim, para determinar a resposta da planta a condições de estresse causadas pelo patógeno, utiliza-se ΔCt como a diferença entre a média do Ct do gene em questão e do Ct do gene endógeno (normalizador), gerando dados para a realização do cálculo do $\Delta\Delta Ct$ e posterior $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (LIVAK; SCHIMITTGEN, 2001).



Figura 3. Descrição do híbrido provável resistente e brotamento do ramo usado como fonte de inóculo.

A laranja Pera (*C. sinensis*) foi utilizada como controle por ser suscetível à CVC. Na tabela 3 a análise do CT em escala logarítmica é desenvolvida com base na amostra controle, assim valores acima de zero representaram expressão e valores menores que zero representam a repressão do gene. Foram avaliados os genes normalizadores β Tubulina; Ubiquitina e o *GAPC2*, sendo o melhor selecionado através do software NormFinder (ANDERSEN et al., 2004).

Para avaliar a expressão comparativa entre híbridos prováveis resistentes e as respectivas brotações da inoculação foi utilizado o programa REST 2009 v 2.013 (PFAFFL et al., 2002), a partir dos valores de CT utilizando o gene escolhido pelo programa como normalizador, essas análises geraram gráficos desenvolvidos pelo software BioEstat (AYRES et al., 2007).

4.3. PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

Foram selecionados trinta e sete híbridos para serem avaliados os sintomas desenvolvidos pela infecção com *X. fastidiosa*. A reação de PCR quantitativo em tempo real foi realizado com 8 µL de GoTaq® qPCR Master Mix, 3 µL de cDNA (diluição de 1:50), 3 mM de cada *primer* e volume final de 25 µL em um equipamento ABI PRISM 7500 SDS (Applied Biosystems) com ciclos 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.

As amplificações foram feitas em duplicata, utilizou-se também reações sem cDNA como controle para detectar possíveis contaminações. Os níveis de expressão foram avaliados com base no número de ciclos de amplificação necessário para atingir um limiar fixo na fase exponencial da PCR. Os dados (Ct) foram tratados aplicando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 3. Sequências dos *Primers* utilizados no PCR quantitativo em tempo real.

Gene	Acesso no NCBI	Sequência Forward	Sequência Reverse	Organismo	Artigo
Ácido Abscísico (G1)	94503773	GTAATGATGATTGGTTGGAGG	TTTCTCCCATATTGAGGGAC	<i>Populus suaveolens</i>	Zhang (.(2006)
Taumatina (G2)	32140538	TAGGACCAATTCTGTCTCAC	ATATCTCATTGGCTTCCCT	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Sassa et al.(2002)
Quitinase (G3)	80973027	ACAGAATTGTGGAAGCGG	AGCAAGTCTTCAAACATCTCC	<i>Vitis vinifera</i>	Romero et al.(2006)
Quinase Xa21 (G4)	3159901	CAGGCATCGTAATCTTGTC	CCAGAATCCAAATCTCCCA	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	Garris et al.(2005)
Quinase CHRK1(G5)	5814092	ATGCAACAATTACACAGCC	ACCTTAATGATTGAGTGCCA	<i>Nicotiana tabacum</i>	Kim et al.(1998)
Isoflavona Sint. (G6)	27542824	TCTCGATCTTCTTACTGTCC	ACTGAGTAAACAGACACTCAC	<i>Medicago truncatula</i>	Butelli et al.(2002)
PDRR (G7)	240256403	GAATGAGTTGCCTACCTCC	TGTCAATGAATCAAGTTGGG	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Swarbreck et al.(2012)
SPD (G8)	<i>Desconhecida</i>	GTATGACAACGAACCTATTCC	TGCTTAGTCATTTATCCTGGTC	<i>Desconhecida</i>	<i>Desconhecida</i>
Isoflavona Red. (G9)	2706514	TATCCATTATACACAGCGCA	CAAGAAGTTGATCGATTGTGG	<i>Citrus x paradisi</i>	Lers et al.(1998)
RGH1 (G10)	357469394	AGTAGAAAGTGATACGGATGG	ATCAAGGAAAGAAAGACGTG	<i>Medicago truncatula</i>	Young et al.(2011)
Hcr2 (G11)	3894384	GGAGCTTAAGAAATCTAGAGGG	GTGTTATCCTCACAAACAGTC	<i>Solanum lycopersicum</i>	Dixon et al.(1998)
Anquirina (G12)	3045088	AGTTTGACCAGAGAAAGAGAC	TTTGTTAGCAATCAACGCAG	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	Garris et al.(2005)
GST -22 (G13)	839515	CTGATCTGAGTCACCTTCCA	GGCCTGTTGCTAATATCATCC	<i>Arabidopsis thaliana</i>	O'Kane e Al-Shehbaz (1997)

4.4. ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA PARA HÍBRIDOS DO CRUZAMENTO DE LARANJA PERA COM TANGOR MURCOTT COM GENES SELECIONADOS A PARTIR DE MICROARRANJO.

A expressão diferencial dos genes foi avaliada por PCR em tempo real em 37 híbridos, após a extração do RNAm como descrito anteriormente e utilizando 13 genes selecionados através de microarranjo. Para analisar a interação entre as respostas fenotípicas e genotípicas foram feitas correlações que demonstrassem o envolvimento entre as variáveis, a correlação canônica é centrada na identificação e quantificação da associação entre dois grupos de variáveis que é amplamente utilizada pelas ciências agrícolas e pelo melhoramento genético (COIMBRA et al., 2000). A partir dos métodos já relatados anteriormente foi possível desenvolver o mapeamento dos dados de expressão gênica. Também foram desenvolvidas correlações de Pearson para análise dos dados.

4.5. MAPEAMENTO GENÉTICO ATRAVÉS DOS RESULTADOS DA ANÁLISE DE SINTOMA, DIAGNÓSTICO DE BACTÉRIA E EXPRESSÃO GÊNICA.

O mapa de ligação integrado para tangor Murcott e laranja Pera foi construído com marcadores DArT (*Diversity Array Technology*). Os polimorfismos dos loci DArT foram acessados pela *Diversity Arrays Technology Pty Ltd* (DArT P/L) (www.diversityarrays.com). Amostras de DNA genômico

total de tangerinas Dancy, Ponkan, Cravo e Sunki (*C. sunki* hort. Ex Tanaka), laranja doce Pera [*C. sinensis* (L.) Osb.], trifoliata [*P. trifoliata* (L.) Raf], laranja Azeda (*C. aurantium* L.), pomelo Marsh Seedless (*C. paradisi* Macfad), toranja do Cabo (*C. grandis* Osb.), tangor Murcott [*C. sinensis* (L.) Osb. x *C. reticulata* Blanco], oito híbridos de *C. sunki* x *P. trifoliata* e oito híbridos de tangor Murcott x laranja Pera foram digeridas com *PstI/Mspl*. A análise de redundância foi executada pelos softwares *DARTSoft v. 7.44* e *DART ToolBox*.

Para a construção do mapa integrado, os loci DArT 1:1 [heterozigóticos para os parentais feminino (configuração nn x np) e masculino (configuração lm x ll)] e 3:1 (configuração hk x hk) com e sem desvio de segregação via χ^2 . O teste *qui-quadrado* [$\chi^2(p \leq 0,05, GL=1)$] (STEEL; TORRIE, 1980) foi utilizado para testar as hipóteses de segregação Mendeliana 1:1 e 3:1.

O mapa foi construído pelo software JoinMap v 3.0 (VAN OOIJEN; VOORRIPS, 2001). Determinou-se o valor do LOD (LOD score $\geq 5,0$), da frequência de recombinação ($\theta \leq 0,40$). Distâncias de mapa ou centiMorgan (cM) entre os diferentes *loci* ligados foram estimadas pela função de mapeamento de Kosambi (KOSAMBI, 1944), a partir da conversão da frequência recombinacional.

4.5.1. IDENTIFICAÇÃO DE QTLs E eQTLs

Após a validação de genes diferencialmente expressos, quantificação do nível de transcritos de cada gene em cada indivíduo da população, avaliação de sintomas e a quantificação de bactérias por meio de diagnóstico em PCR Quantitativo em Tempo Real foi realizado o desenvolvimento do mapa.

Os dados fenotípicos (concentração de bactérias – BAC e média de sintomas) e os dados de expressão gênica para os treze genes estudados foram obtidos através das médias aritméticas dos clones.

Para a detecção e mapeamento de QTLs e eQTLs na população derivada de tangor Murcott x laranja Pera, foram realizadas análises através do programa MapQTL v. 4.0 (VAN OOIJEM et al., 2002), utilizando-se os testes paramétricos “*Interval Mapping*” (IM). A detecção dos QTLs foi realizada pelo módulo “*Interval Mapping*”, com fator de significância de 95% ($p > 0,05$) para identificar QTLs com efeitos principais significativos. O LOD (logaritmo das probabilidades) crítico de cada QTL foi estabelecido como 3,0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS A PARTIR DE ANÁLISE DE SINTOMA, DIAGNÓSTICO EM PCR CONVENCIONAL E EM TEMPO REAL.

Trinta e sete híbridos do cruzamento de laranja Pera com tangor Murcott foram avaliados quanto à sintomatologia para determinar a severidade da CVC em campo. Essa análise possibilitou identificar seis híbridos sintomáticos (12, 14, 29, 30, 75 e 79) e demonstraram diferentes níveis de sintomas (Tabela 4). Com o propósito de distinguir híbridos resistentes, tolerantes e suscetíveis foram desenvolvidos diagnósticos por dois métodos.

O diagnóstico convencional demonstrou oito híbridos infectados com *X. fastidiosa*. Para uma detecção mais eficiente foi realizado o diagnóstico em tempo real, onde a bactéria *X. fastidiosa* foi quantificada através de curva

padrão (Figura 4), onde os valores dos Cts são substituídos na equação da reta originada na curva.

Dessa forma, através da técnica de PCR em tempo real, utilizando o sistema Taqman, foram identificados 30 híbridos como positivos (Tabela 4), sendo que todas as amostras detectadas positivas por PCR convencional foram também diagnosticadas em PCR em tempo real. Foram identificados sete híbridos resistentes que não multiplicam a bactéria e consequentemente não apresentam sintoma, 24 híbridos tolerantes que multiplicam a bactéria e não apresentam sintomas e 6 híbridos suscetíveis que multiplicam a bactéria e apresentam sintomas.

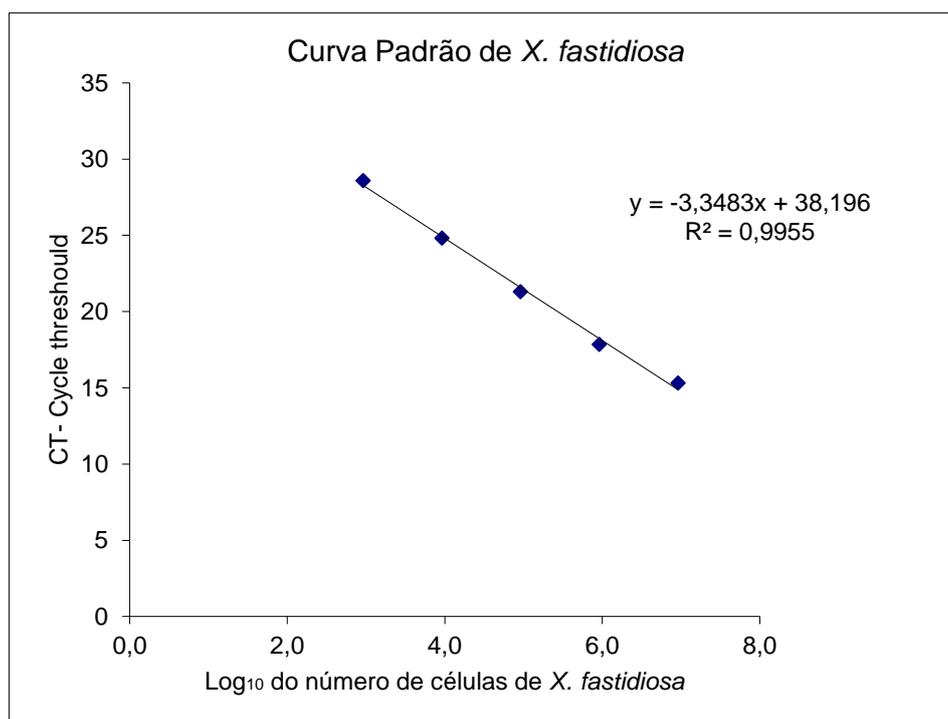


Figura 4. Curva de quantificação de *X. fastidiosa* desenvolvida com base em 5 pontos com concentração conhecida de bactéria.

Tabela 4. Diagnóstico de *X. fastidiosa* através de análise visual de sintomas, PCR convencional e quantificação da infecção através de PCR em tempo real.

	Amostras	Sintomas*	Diagnóstico por PCR convencional	Diagnóstico por PCR Real time (mg/ μ L)* **
Suscetível	12	0,958b	+	0,593
	14	0,168b	+	0,124
	29	0,168b	+	0,555
	30	0,8b	+	0,300
	75	1,333	+	0,268
	79	1,918	+	0,952
Tolerante	4	0a	-	0,147
	5	0a	-	0,4555
	6	0a	-	0,16
	10	0a	-	0,126
	13	0a	-	0,3415
	15	0a	-	0,0285
	20	0a	-	1,778
	23	0a	-	0,6985
	34	0a	-	0,296
	37	0a	-	0,6215
	44	0a	-	0,632
	47	0a	-	0,161
	50	0a	+	1,322
	57	0a	-	0,418
	59	0a	-	0,1125
	60	0a	-	0,134
	61	0a	-	0,6015
	66	0a	-	0,5955
	69	0a	-	0,21
	72	0a	-	0,1685
78	0a	-	0,5525	
82	0a	-	0,43	
84	0a	-	0,0725	
86	0a	+	1,802	
Resistentes	7	0a	-	0
	11	0a	-	0
	26	0a	-	0
	33	0a	-	0
	42	0a	-	0
	46	0a	-	0
	48	0a	-	0

*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Scott Knott (5%). ** Calculo realizado a partir da curva padrão (Figura 4) em log de células em mg/ μ L.

5.1.1. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE SINTOMAS E A QUANTIFICAÇÃO DE *X. fastidiosa* EM PCR EM TEMPO REAL PARA HÍBRIDOS SUSCETÍVEIS.

Foi desenvolvida análise de correlação de Pearson para entender a relação entre os sintomas e a quantidade de bactérias de híbridos suscetíveis, com uma amostra controle (vermelha) que é suscetível e extremamente sintomática. O coeficiente de determinação (R^2) é utilizado para demonstrar a influência de uma variável sobre a outra (KNOP; SHINTCOVSK, 2009), o valor de (R^2) para essa correlação de estudo foi de 59% e o valor de p foi significativo ($< 0,05$) (Figura 5).

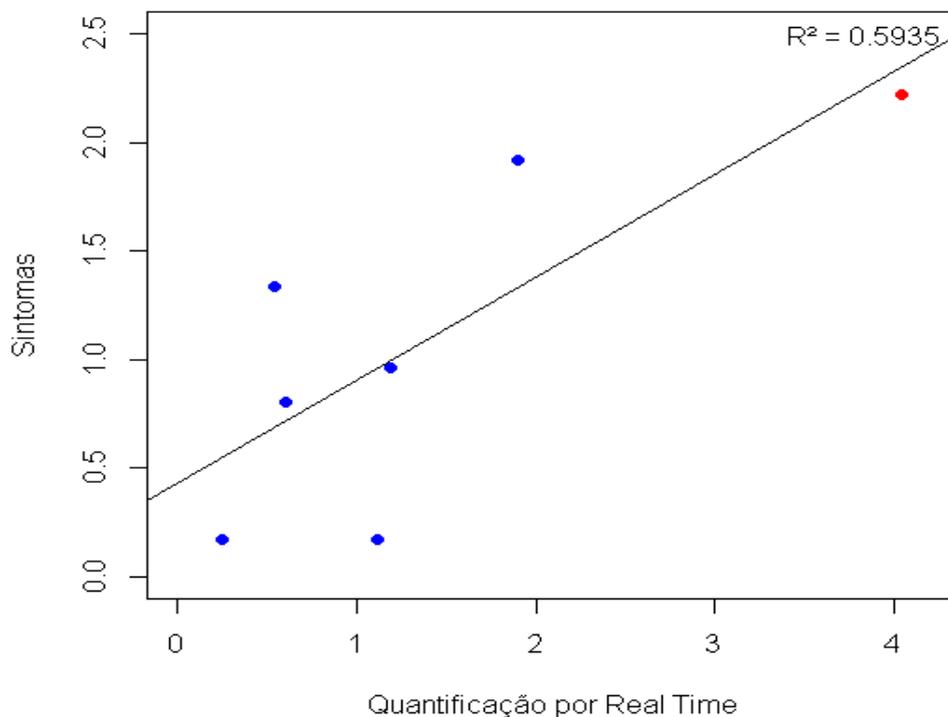


Figura 5. Gráfico de dispersão para análise de correlação de Pearson entre sintomas e quantificação de bactéria *X. fastidiosa* para os híbridos suscetíveis.

A correlação de Pearson foi significativa para híbridos suscetíveis quando comparados os sintomas e a quantificação de bactérias, com coeficiente angular positivo demonstrando que quanto mais bactérias no interior da planta mais sintomas são demonstrados em plantas suscetíveis. A proporção de sintomas em uma planta está relacionada a plantas enfraquecidas e a diferenças clima e solo (SANTANA, 2012). Também é visto na literatura que em plantas suscetíveis quanto mais sintomas uma planta apresenta maior são os vasos obstruídos do xilema, devido a cepas de bactérias que provocam mais biofilme ou a uma população maior (ALVES et al., 2004).

5.2. DESAFIO DOS HÍBRIDOS RESISTENTES COM AS RESPECTIVAS BROTAÇÕES SUSCETÍVEIS ORIGINADAS DOS RAMOS UTILIZADOS COMO FONTE DE INÓCULO DE *X. fastidiosa*

O diagnóstico foi realizado nos dez híbridos e nos ramos utilizados como fonte de inóculo o que demonstrou apenas três híbridos (75, 23 e 242) com a bactéria *X. fastidiosa*, sendo assim, estes são considerados tolerantes, ou seja, não manifestam o sintoma, mas possibilitam a multiplicação da bactéria na planta. Todos os ramos fonte de inóculo foram positivos para a presença da bactéria (Tabela 5).

Tabela 5. Diagnóstico de *X. fastidiosa* para os híbridos assintomáticos e para as brotações das fontes de inóculo.

Amostras	Quantificação de <i>X. fastidiosa</i> mg/ μ l *	
	Fonte de Inóculo	Híbrido
113	0,44605	0
116	1,1885	0
357	1,5037	0
250	1,66035	0
290	1,6009	0
103	1,5105	0
336	1,5499	0
75	0,9618	0,8465
23	1,27985	0,3165
242	1,11445	0,296

* Cálculo realizado a partir da curva padrão (Figura 4) em log de células em mg/ μ L.

Para a análise de expressão gênica, o gene *GAPC2* foi identificado através do programa NormFinder como o gene mais adequado para ser utilizado como normalizador. Com base nos resultados de $\Delta\Delta C_t$ (Anexo I) realizou-se a correlação canônica para comparar a expressão dos genes e os resultados da quantificação da concentração bacteriana nas amostras avaliadas.

A correlação canônica (Figura 6) possibilitou observar a relação entre a expressão dos genes, nos ramos dos híbridos resistentes e tolerantes e nos ramos fonte de inóculo.

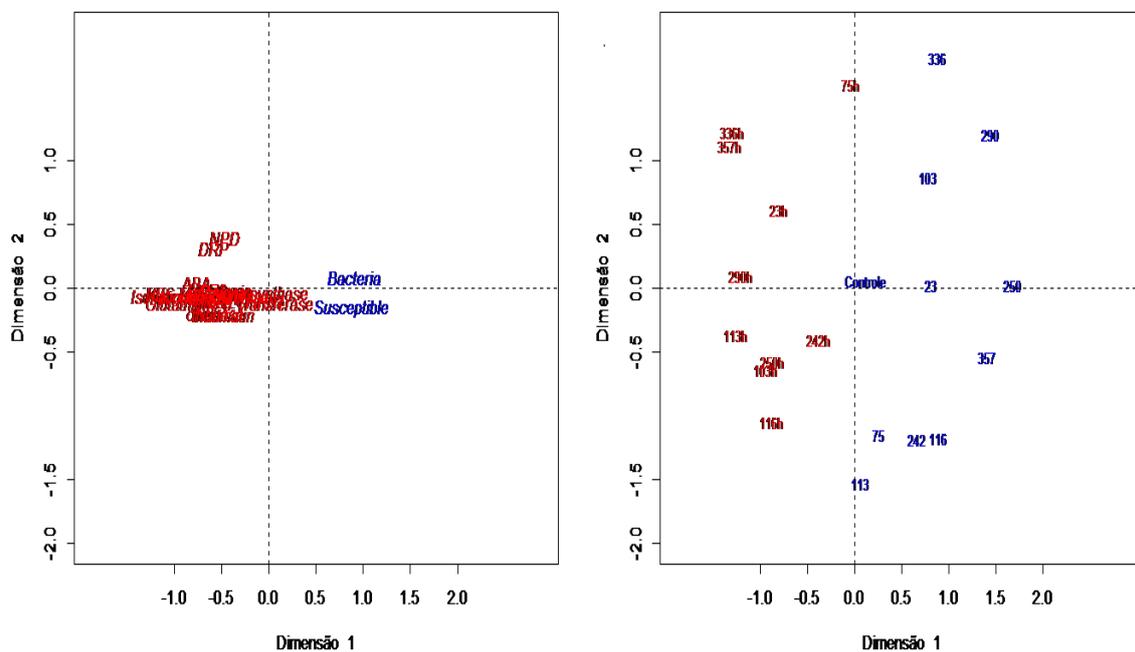


Figura 6. Correlação canônica para onze híbridos assintomáticos e fonte de inóculo suscetível para genes de resistência, quantificação de bactérias e sintomas.

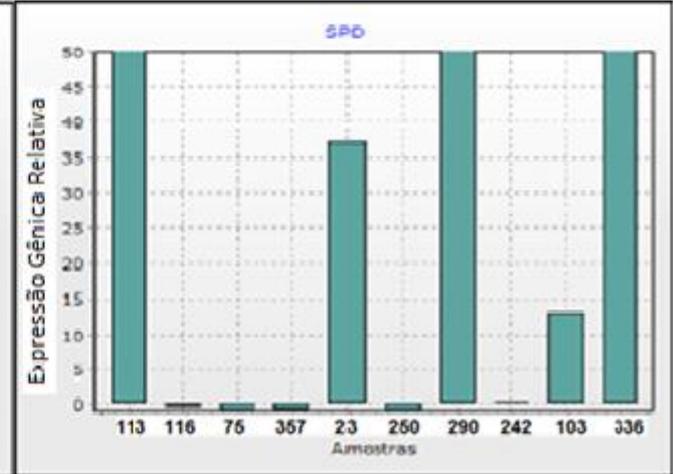
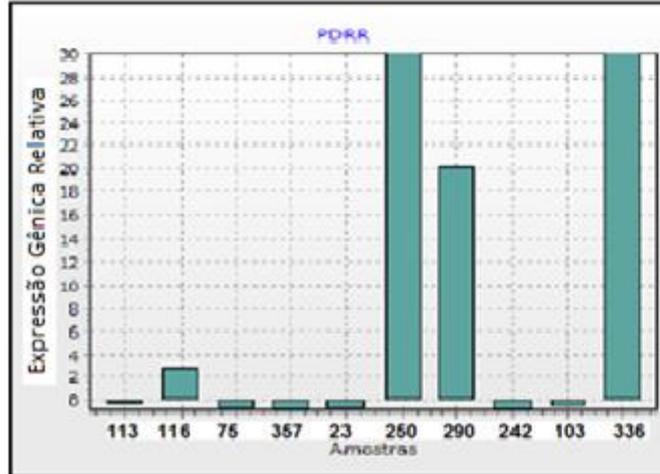
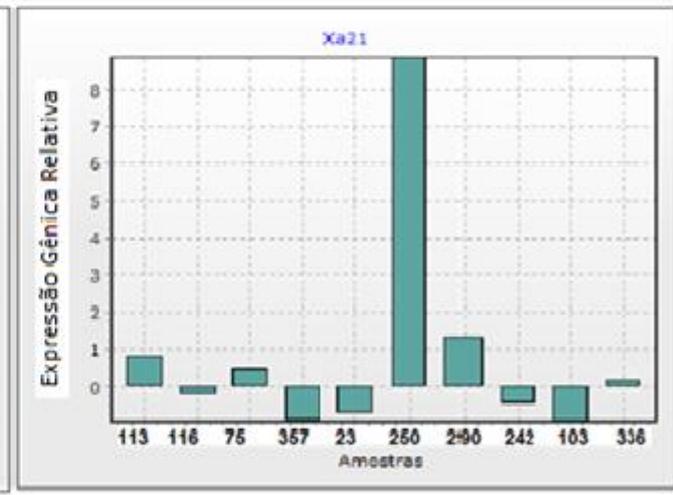
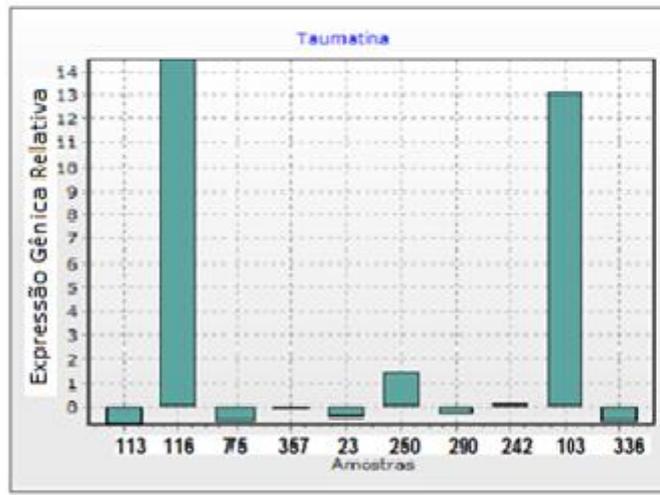
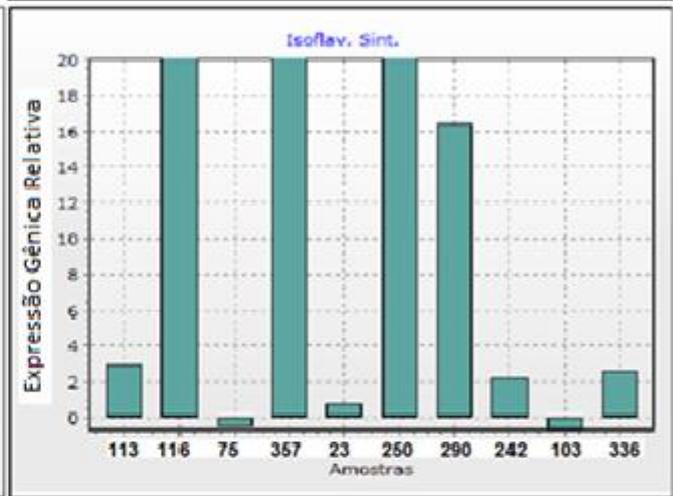
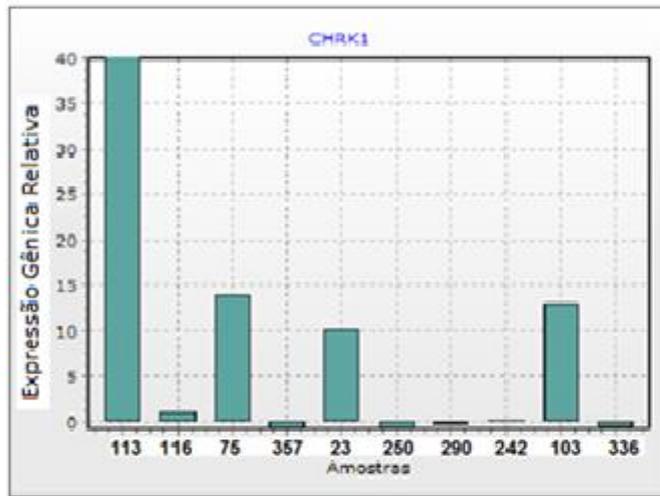
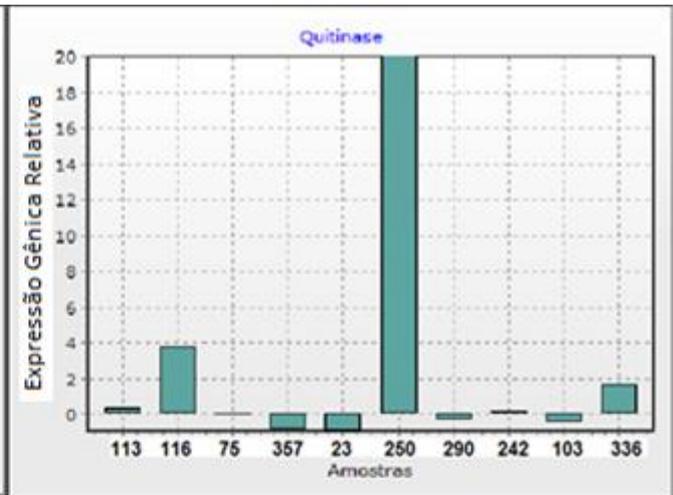
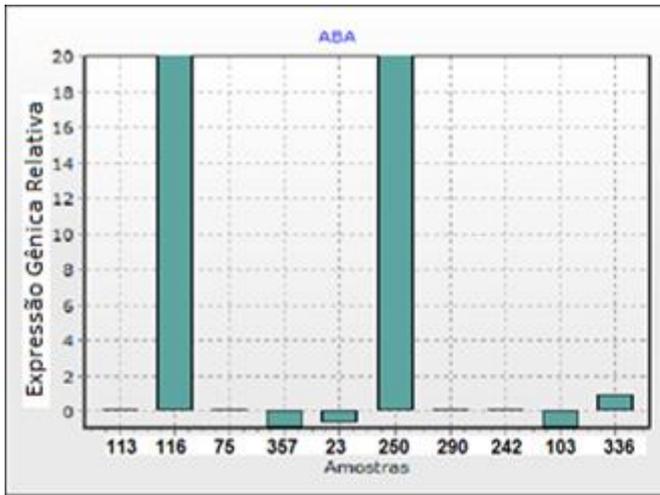
Os genes foram mais expressos nos híbridos, sendo que todas as plantas sofreram as mesmas pressões ambientais. Assim, as brotações suscetíveis originadas dos ramos utilizados como fonte de inóculo apresentaram maior relação com as variáveis relacionadas à presença de bactéria e presença de sintomas.

De todos os híbridos somente a amostra 75 (tolerante) apresentou maior relação com as variáveis referente à suscetibilidade e referente à presença de bactéria, ainda apresentou certa relação com os genes, entretanto menor do que a afinidade apresentada pelos híbridos (tangor Murcott x laranja Pera) resistentes.

Os híbridos 23 e 242, também tolerantes, apresentaram alta relação com os genes e baixa com a suscetibilidade e com a presença de bactérias, demonstrando que esses genes podem estar relacionados à tolerância, mas não conferiram resistência, talvez devido à expressão baixa.

Para visualizar a proporção de expressão dos genes nos híbridos e nas brotações, foi realizada a análise de expressão no programa REST 2009 V2.0.13, que possibilitou análises individuais, apresentando quais genes foram super expressos e quais foram reprimidos (Figura 7).

Para a amostra 75 (caracterizada como tolerante), somente o gene responsável pela quinase *CHRK1* apresentou uma expressão maior do que a brotação da fonte de inóculo (suscetível). A quinase *CHRK1* tem função na transdução de um sinal de regulação do desenvolvimento e homeostase da planta, segundo Kim et.al. (2000) apresenta também a função de receptor para o sinal de quitina (oligossacarídeo). Shiu e Bleecker (2001) relatam que a quinase receptora funciona, em tabaco, como um detector do patógeno no interior da planta, assim seu gene tem expressão estimulada nessas condições (KIM et al., 2000).



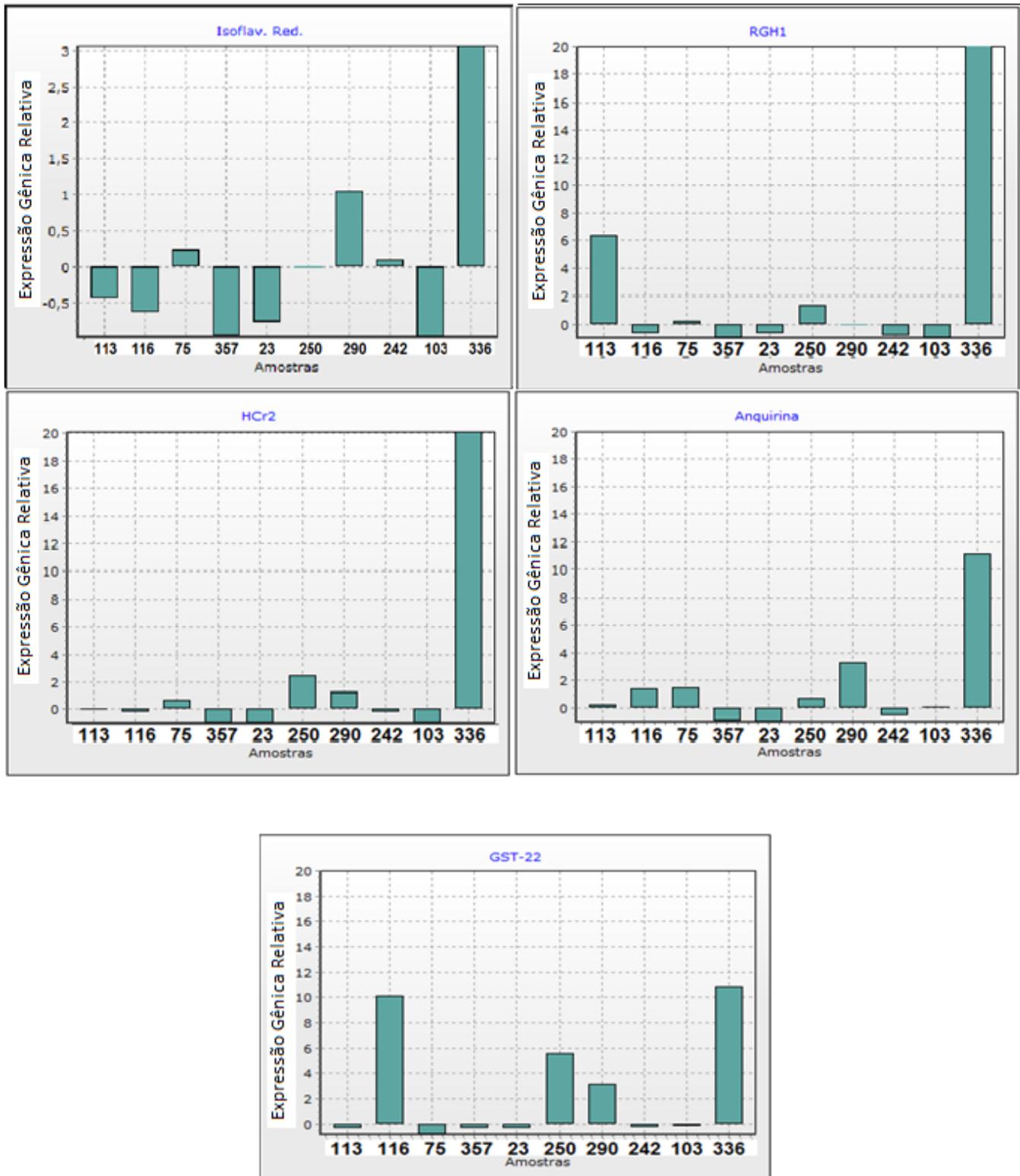


Figura 7. Expressão gênica nos híbridos 113, 116, 75, 357, 23, 250, 290, 242, 103, 336 em relação a laranja Pera. O gene *GAPC2* foi usado como gene de referência e a expressão relativa foi calculada usando eficiência de amplificação dos primers, segundo Pflaff et al. (2002).

O híbrido 23 apresentou oito genes reprimidos e um gene super expresso que foi o gene “sem produto definido” (*SPD*). Para o híbrido 242 cinco genes foram reprimidos, sem expressão positiva, ainda assim essa planta consegue controlar o desenvolvimento da doença. Entre as oito amostras resistentes, o gene codificador da Isoflavona Sintase apresentou uma alta expressão em quatro delas.

Outro gene expresso com grande recorrência foi o codificador da Taumatina, que são proteínas relacionadas com a infecção em plantas, foram encontradas primeiramente em uma planta africana, *Thaumatococcus danielli*, pertencem à classe de proteínas de defesa de plantas denominadas *PR-5* (BENKO-ISEPPON et al., 2003). Mahmood et al. (2009), descreve a superexpressão do gene que codifica a Taumatina *PK5* em arroz (*Oryza sativa L.*) gerando uma maior resistência ao patógeno. Em Purcino et al. (2007), foi relatada como proteína expressa em resposta a *X. fastidiosa*.

O estudo comparativo entre os híbridos para o gene da quitinase demonstrou maior expressão somente na amostra 250. Em outros trabalhos com citros como em Fanta et al. (2003), a proteína quitinase foi relacionada a defesa contra *Alternaria alternata* em citros, demonstrando que só o gene da quitinase ativado inibiu a ação do patógeno. Em Droby et al. (2002), o estudo foi realizado com Toranja potencializado a produção de quitinase e outras proteínas de resistência o que deflagrou uma inibição no crescimento do patógeno.

Entre as amostras resistentes, somente duas (357 e 103) tiveram mais genes reprimidos do que expressos, a amostra 357 apresentou apenas um gene super expresso (Isoflavona Sintase), que provavelmente somados a outros genes não estudados nesse trabalho, proporcionam a resistência da planta, como pode ser

vislumbrado em outro trabalho realizado com a multiplicação da *X. fastidiosa* e o estudo da resposta da planta a patógenos, onde gene *LOX* foi induzido em diversos períodos de avaliação em plantas com *X. fastidiosa*, já o gene *JAZ1* apresentou uma expressão maior com o passar dos dias o que demonstra uma resposta tardia. Genes diferentes foram estudados demonstrando a grande quantidade de genes envolvidos na resposta da planta ao patógeno da CVC (RODRIGUES, 2011).

O $\Delta\Delta CT$ foi utilizado para desenvolver a correlação canônica essa metodologia quando comparada com os dados resultantes do programa REST (PFAFFL et al., 2002) que geraram os histogramas, demonstraram dados que fundamentam a relação das amostras resistentes aos genes de defesa.

5.3. ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA PARA HÍBRIDOS DO CRUZAMENTO DE LARANJA PERA COM TANGOR MURCOTT COM GENES SELECIONADOS A PARTIR DE MICROARRANJO.

A expressão de trinta e sete híbridos do cruzamento de laranja Pera com tangor Murcott foram avaliados a partir da metodologia de $\Delta\Delta CT$ (Anexo II) e foram bases para estudos comparativos.

5.3.1 ANÁLISE COMPARATIVA DOS GENES SELECIONADOS PELOS MICROARRANJO

A fim de entender a relação entre os genes utilizados no presente trabalho foram desenvolvidas correlações de Pearson, essas correlações foram explicitadas em *heatmap* (Figura 8).

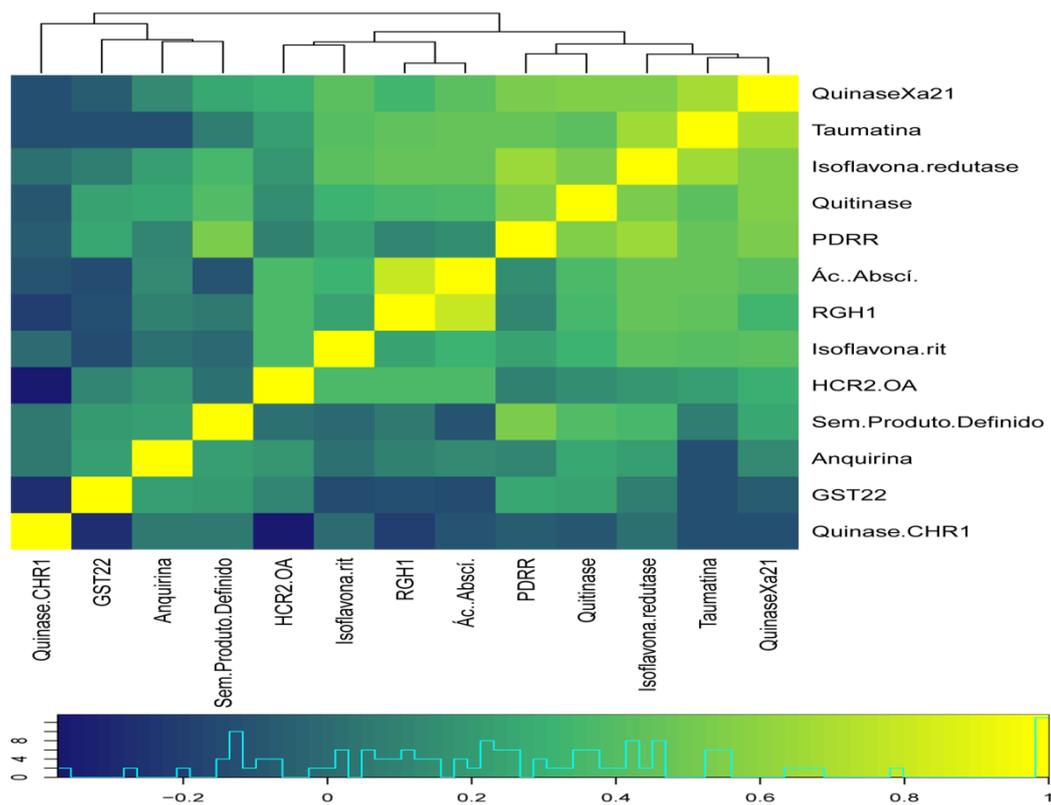


Figura 8. *Heatmap* da análise de correlação comparando genes selecionados pelo ensaio com microarranjo.

O *heatmap* é uma representação gráfica de dados onde os valores individuais contidos numa matriz são apresentados como cores, com o propósito de analisar comparativamente a expressão dos genes selecionados no microarranjo, sendo que esses genes foram testados em híbridos oriundos de uma população contrastante à característica analisada (resistência e suscetibilidade).

A correlação dos genes foi mais elevada para alguns genes, demonstrando que esses tiveram congruência entre as expressões, como a Taumatina e a Quinase Xa21, em arroz o gene Xa21 é um importante fator na resistência a patógeno, mas não está restrito a essa espécie, segundo Wanderley-Nogueira et al. (2012) esse gene está presente em um ancestral das angiospermas, assim uma gama de espécies tem sua sequência conservada e a expressão do gene da Taumatina pode

ser estimulado com ferimentos (RUPERTI et al., 2002) e estresse a seca (JUNG et al., 2005), sendo os dois genes relacionados a resistência a patógeno, existe uma provável relação entre a expressão deles e a resistências nas plantas.

O gene da isoflavona redutase evita a morte de tecidos e a decomposição por fungos, com ação antimicrobiana e antifúngica, e sua resposta gênica é oriunda de uma ativação por estresse biótico e abiótico (SHOJI et al.,2002). Esse gene apresentou correlação significativa com o gene da Taumatina e também com o gene *PDRR*. Dois genes que não são definidos demonstraram alta correlação, o gene *PDRR* e o gene *SPD*.

5.3.2. ANÁLISE COMPARATIVA DOS GENES SELECIONADOS PELO MICROARRANJO COM OS HÍBRIDOS (RESISTENTES, TOLERANTES E SUSCETÍVEIS) E ANÁLISE DE CORRELAÇÃO CANÔNICA PARA OS HÍBRIDOS IDENTIFICADOS CONTRASTANTES (RESISTENTES E SUSCETÍVEIS)

O *Heatmap* (Figura 9) possibilitou a ordenação dos genes mais relacionados, com expressões mais próximas, os híbridos estão separados em 3 blocos os suscetíveis não combatem o crescimento da bactéria e demonstram sintomas, os tolerantes que controlam mais não evitam o crescimento bacteriano e os resistentes que combatem efetivamente o crescimento da bactéria (não havendo *X. fastidiosa* no seu interior) e que não demonstram o sintoma.

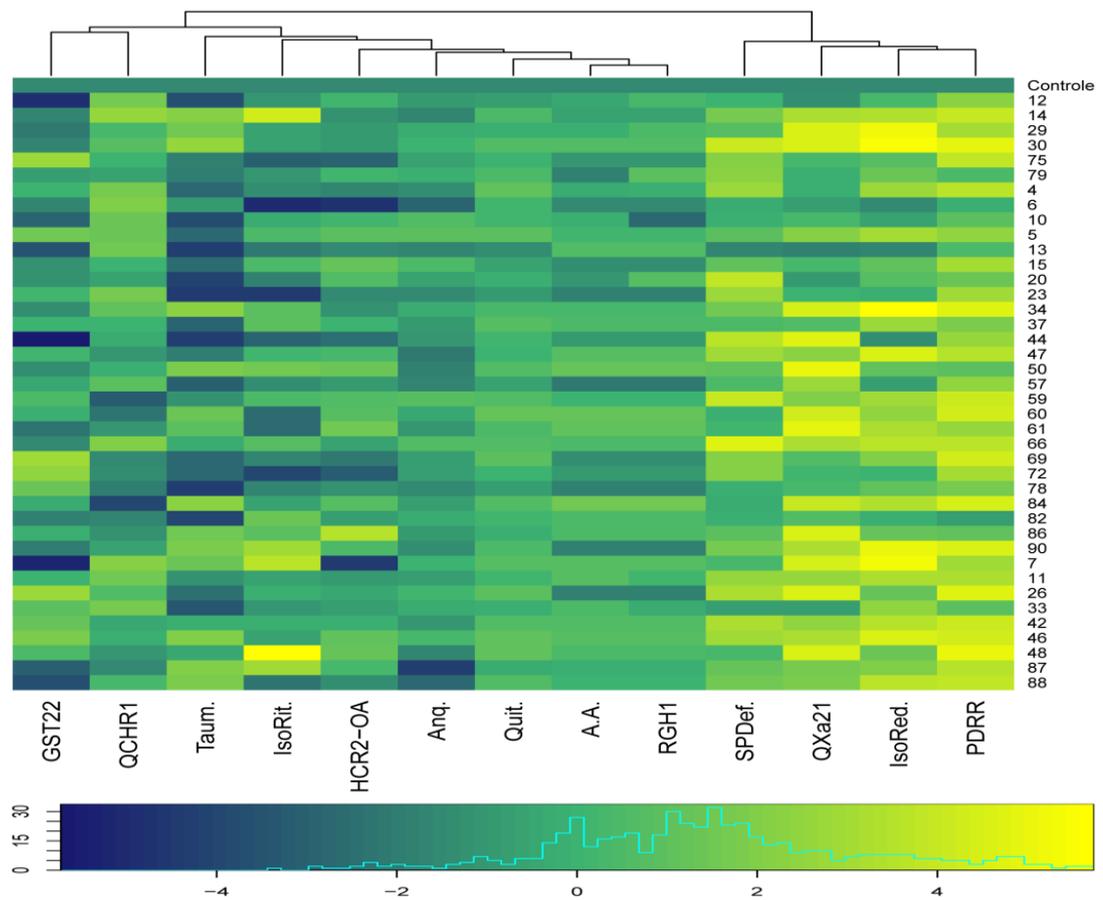


Figura 9. *Heatmap* da expressão dos genes relacionados com resistência selecionados pelo microarranjo nos híbridos desse trabalho.

Os genes como o *SPD*, Quinase *Xa21*, Isoflavona redutase e *PDRR* que estão de coloração mais clara foram mais expressos e o que pode ser suposto é que os híbridos resistentes apresentaram uma maior expressão do que os suscetíveis, para essa definição outras análises devem ser realizadas, como a análise de correlação canônica.

Genes como *HCr2*, Anquirina, Ácido Abscísico, Quitinase e *RGH1* apresentaram uma expressão mediana não interferindo diretamente na expressão dos diferentes fenótipos dessa população. Com o *Heatmap* foi possível visualizar que a maioria dos híbridos apresentou uma expressão maior que a planta controle.

Mesmo quando suscetível, há uma reação da planta ao ataque do patógeno e essa reação é maior do que a planta controle que é extremamente suscetível a CVC.

Outra análise interessante do *Heatmap* é o dendograma mostrando quais as expressões mais próximas entre os genes. Foram formados dois grupos, o primeiro sendo composto dos genes relacionados à síntese de glutathione, quinase *CHRK1*, taumatina, isoflavona sintase, *HCR2*, anquirina, quitinase, *ABA* e *NBS-LRR* que estabeleceram redes interessantes de proximidade entre si. O segundo grupo composto do o *SPD*, quinase *Xa21*, isoflavona redutase e *PDRR*.

Como o estudo com correlações canônicas (Figura 10) permite identificar a similaridade entre duas variáveis, e demonstrar visualmente a dependência entre elas, essa foi desenvolvida para os híbridos resistentes e suscetíveis, com o intuito de relacionar os genes com presença de resposta a CVC ou ausência dela.

Assim os indivíduos resistentes são 7, 11, 26, 33, 42, 46 e 48 e os suscetíveis são os 12, 14, 29, 30, 75, 79, as variáveis presentes no gráfico de correlação canônica são mensuração de sintomas (sintomas), quantificação de bactérias (bactérias) e genes [*NBS-LRR - RGH1*, Ácido Abscísico (*ABA*), Taumatina, Quitinase, Quinase *Xa21*, Quinase *CHRK1*, Isoflavone sintetase, *PDRR*, *SPD*, Isoflavona redutase, *HCr2-0A*, Anquirina e Glutathione-*GST 22*].

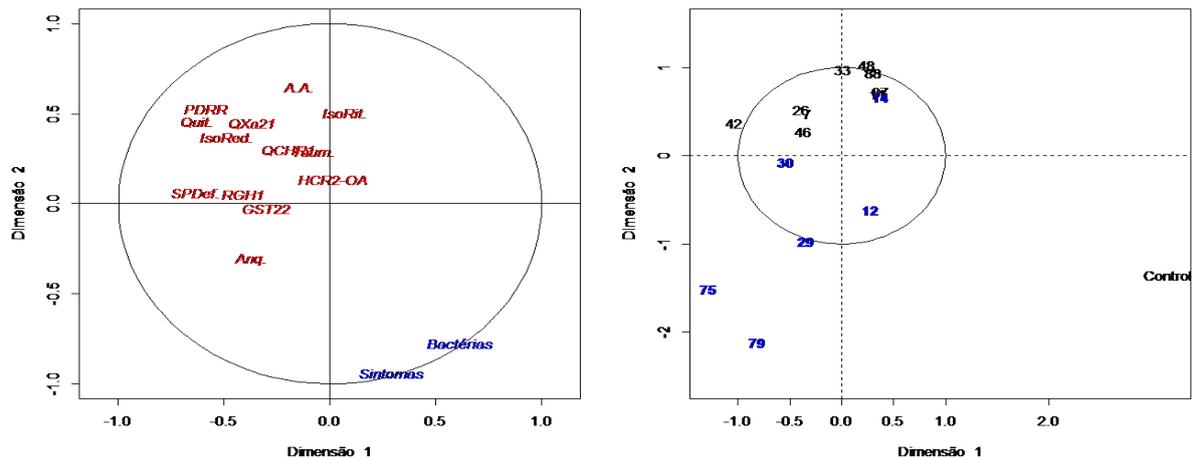


Figura 10. Análise de Correlação Canônica para híbridos resistentes e suscetíveis para o grupo de variável “genes” e o para o segundo grupo de variável “bactérias e sintomas”.

A análise de correlação canônica foi desenvolvida com os híbridos mais contrastantes, resistentes e suscetíveis, assim as amostras resistentes (apresentadas em preto) ficaram posicionadas (Figura 10) nas mesmas coordenadas no gráfico que a maioria dos genes demonstrando uma relação entre a defesa à CVC e os genes estudados. Algumas amostras suscetíveis (em cor azul) demonstraram correlação com genes, isso devido a baixa presença de sintomas e pouca quantificação de bactérias, logo mesmo apresentando sintomas há reação da planta contra a multiplicação da bactéria.

5.3.3. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS HÍBRIDOS CONTRASTANTES (RESISTENTES E SUSCETÍVEIS) E DA CONCENTRAÇÃO DE BACTÉRIA E DA MENSURAÇÃO DE SINTOMAS NAS PLANTAS.

Essa análise desenvolvida sem os híbridos contrastantes possibilitou encontrar genes que demonstraram valor de p significativo (Tabela 6). Assim as

expressões foram referentes aos genes relacionados à resistência selecionados por microarranjo.

Tabela 6. Correlação de Pearson para híbridos contrastantes, valor do coeficiente de determinação (R) e valor de *p*.

Genes	Correlação com Sintomas		Correlação com Bactérias	
	R	valor de <i>p</i>	R	valor de <i>p</i>
<i>ABA</i> (G1)	-0,6501	0,0064**	-0,5903	0,0160*
Taumatina (G2)	-0,2952	0,2670	-0,2705	0,3108
Quitinase (G3)	-0,6096	0,0121*	-0,7382	0,0010**
Quinase <i>Xa21</i> (G4)	-0,5254	0,0365*	-0,5701	0,0211*
Quinase <i>CHRK1</i> (G5)	-0,3374	0,2011	-0,3519	0,1813
Isoflavona sintase (G6)	-0,4504	0,0799	-0,3430	0,1933
<i>PDRR</i> (G7)	-0,6621	0,0051**	-0,7643	0,0006 **
<i>SPD</i> (G8)	-0,2421	0,3662	-0,4376	0,0900
Isoflavona redutase (G9)	-0,4894	0,0503	-0,5859	0,0170*
<i>NBS-LRR-RGH1</i> (G10)	-0,1697	0,5296	-0,2939	0,2692
<i>HCR2-0A</i> (G11)	-0,1206	0,6563	-0,0938	0,7295
Anquirina (G12)	0,1828	0,4978	0,0117	0,9654
Glutathione - <i>GST 22</i> (G13)	-0,0650	0,8108	-0,1673	0,5358

* valor de *p* < 0,05 ** valor de *p* < 0,01

Os genes *ABA*, *quitinase*, *quinase Xa21* e *PDRR* apresentaram valor de *p* significativo tanto para a correlação com quantificação de bactéria quanto para a correlação com fenótipo sintomático. Já o gene da Isoflavona redutase apresentou somente para quantificação de bactérias o valor de *p* significativo. Os gráficos desenvolvidos a partir das correlações (Figura 11), como também os valores

apresentados pelo coeficiente de determinação (R) demonstram que a relação entre expressão do gene, quantificação de bactérias e proporção de sintomas é inversamente proporcional, com coeficiente angular da reta negativo. Logo quanto maior a expressão dos genes menor a quantidade de bactéria e menor presença de sintomas.

Assim é importante destacar que alguns desses genes já estão descritos na literatura por serem relacionados à resistência, em citros e outras espécies de plantas, como o ácido abscísico (*ABA*) tem relação direta com o crescimento e desenvolvimento das plantas, isso se deve ao fato de controlar vários processos fisiológicos, além disso quando exposta a estresse a planta acumula *ABA* que estimula a produção de fatores de transcrição, dentre eles o “ABA-responsive element binding”- *ABF*, esses fatores de transcrição preconizam a expressão de vários genes relacionados com resistência, estão diretamente envolvido com a resposta a escassez hídrica (BACSO et al.; 2008).

As quitinases são estudadas por estarem relacionadas com patogênese em plantas (KASPRZEWSKA, 2003), a expressão é induzida pela presença do patógeno (XIE,1999), normalmente a proteína é encontrada ao redor da infecção (NIELSEN et al.,1994) e foi descrita em plantas herbáceas e lenhosas (GRAHAM; STICKLEN, 1994).

A isoflavona redutase (*IFR*) apresentou valor de p significativo para a correlação com quantificação de bactérias, sendo que a expressão desse gene é relacionado com ação antimicrobiana e antifúngica o que pode explicar a correlação significativa com a quantificação de bactérias (SHOJI et al., 2002).

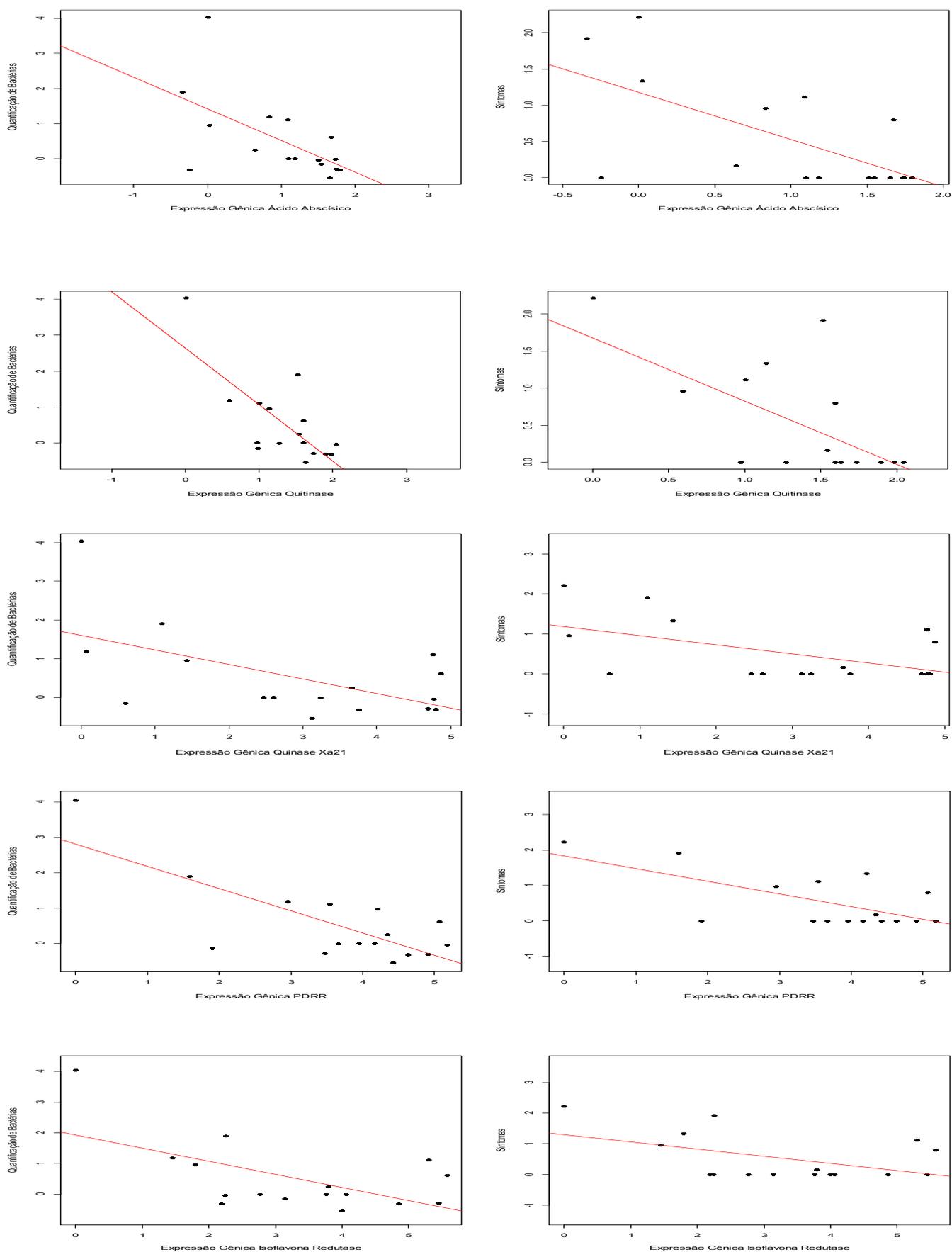


Figura 11. Gráficos de correlação de Pearson entre a expressão gênica dos híbridos contrastantes (resistentes e suscetíveis), concentração de bactéria e a mensuração de sintomas nas plantas.

5.3.4. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS HÍBRIDOS TOLERANTES E DA CONCENTRAÇÃO DE BACTÉRIA E DA MENSURAÇÃO DE SINTOMAS NAS PLANTAS.

Entendendo que os híbridos tolerantes tiveram expressões diversas e que isso pode atrapalhar na análise de característica que há indivíduos contrastantes foi realizada correlação de Pearson (Tabela 7).

Tabela 7. Correlação de Pearson para híbridos tolerantes, valor do coeficiente de determinação (R) e valor de *p*.

Genes	Correlação com Sintomas		Correlação com Bactérias	
	R	valor de <i>p</i>	R	valor de <i>p</i>
<i>ABA</i>	-0,2241	0,2813	-0,1105	0,5987
Taumatina	0,0287	0,8916	0,0797	0,7047
Quitinase	-0,4512	0,0235*	-0,4233	0,0349*
Quinase <i>Xa21</i>	-0,2952	0,1518	-0,0097	0,9632
Quinase <i>CHRK1</i>	-0,1414	0,5	-0,0657	0,755
Isoflavona sintase	-0,0443	0,8334	0,1100	0,6006
<i>PDRR</i>	-0,4645	0,01932*	-0,5347	0,0058**
<i>SPD</i>	-0,3236	0,1145	-0,0530	0,8012
Isoflavona redutase	-0,2850	0,1673	-0,2589	0,2113
<i>NBS-LRR-RGH1</i>	-0,1978	0,343	0,1058	0,6147
<i>HCR2-0A</i>	-0,1167	0,5784	0,3206	0,1181
Anquirina	-0,1379	0,5108	-0,2030	0,3303
Glutationa - <i>GST 22</i>	-0,0814	0,6988	-0,1675	0,4233

* valor de *p* < 0,05 ** valor de *p* < 0,01

Para os híbridos tolerantes foram identificados dois genes significativos na análise de correlação entre expressão gênica e quantificação de bactéria e na correlação de expressão gênica e análise de sintomas (Tabela 7). Os gráficos das correlações significativas (Figura 12), apresentaram coeficientes angular das retas negativos, demonstrando que a expressão gênica maior promove um controle de sintomas e quantificação de bactérias para esses 2 genes apresentados.

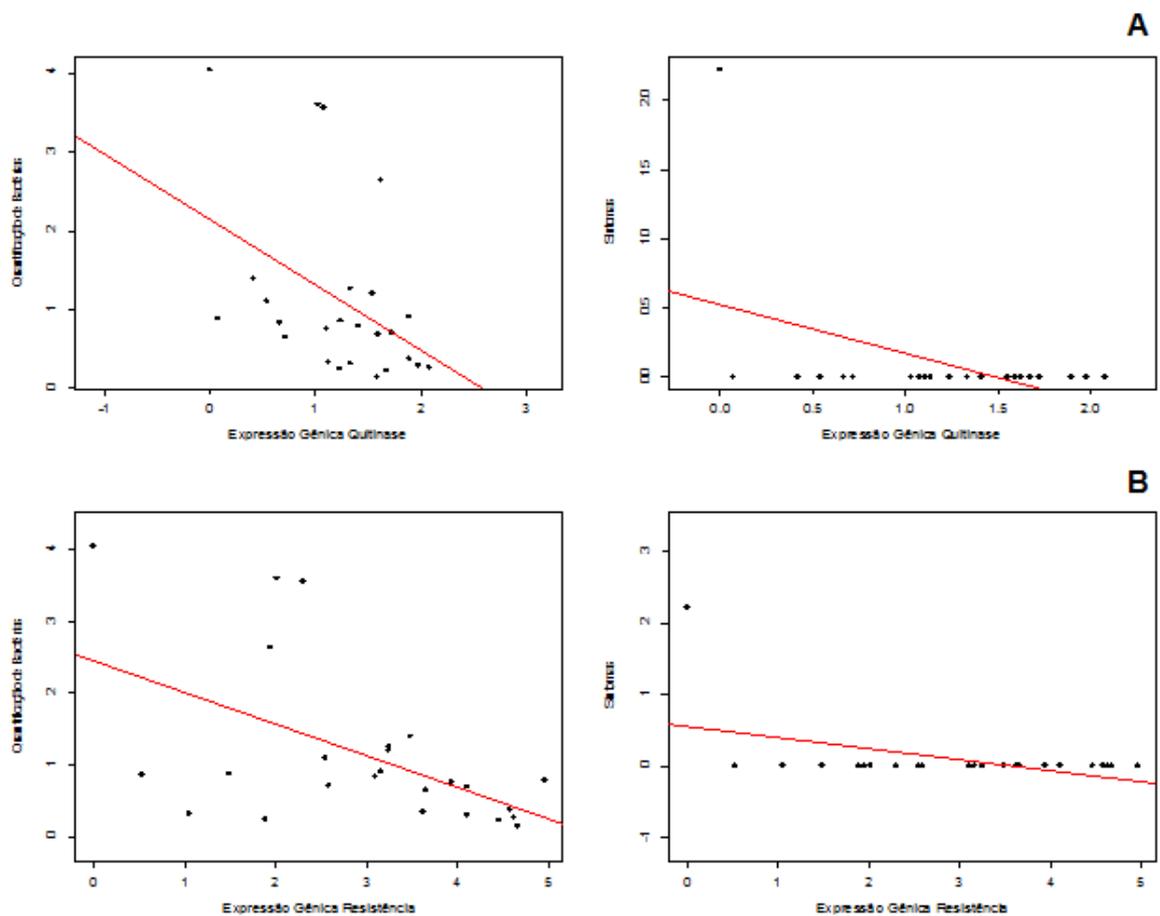


Figura 12. Correlação de Pearson para expressão gênica dos híbridos tolerantes, concentração de bactéria e mensuração de sintomas nas plantas **A-** Correlação de Pearson para o gene da *PDRR* **B-** Correlação de Pearson para o gene da Quitinase.

5.4. MAPEAMENTO DE REGIÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA A CVC ATRAVÉS DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE QUANTIFICAÇÃO DE SINTOMAS, DE BACTÉRIA E DA EXPRESSÃO GÊNICA.

No presente trabalho, foi construído um mapa genético integrado de tangor Murcott e laranja Pera utilizando marcadores DArT. Do total de 265 marcadores DArTs, 57 apresentavam segregação nnxnp (heterozigóticos para tangor Murcott), 79 apresentavam segregação Im x II (heterozigóticos em laranja Pera).

Com relação aos marcadores com segregação hk x hk (heterozigóticos em ambos genitores) 129 (48,70%) apresentaram esta configuração. Dos 265 marcadores, 217 foram mapeados, em um mapa genético integrado com nove grupos de ligação com “LOD score”, variando de três (mínimo) a cinco (máximo) (Figura 13).

O genoma de citros tem tamanho estimado de 380 Mb (GMITTER et al.,2012) e tamanho de mapa entre 1.500 cM e 1.700 cM (JARREL et al., 1992) e o mapa integrado formado a partir de marcadores DArTs apresentou tamanho de 440 cM, cerca de 25 % do tamanho do mapa estimado. Foram descritos 9 grupos de ligação, dois grupos de ligação apresentaram maior número de marcadores como o GL1 e o GL2, com respectivos 53 e 74 marcadores (Tabela 8).

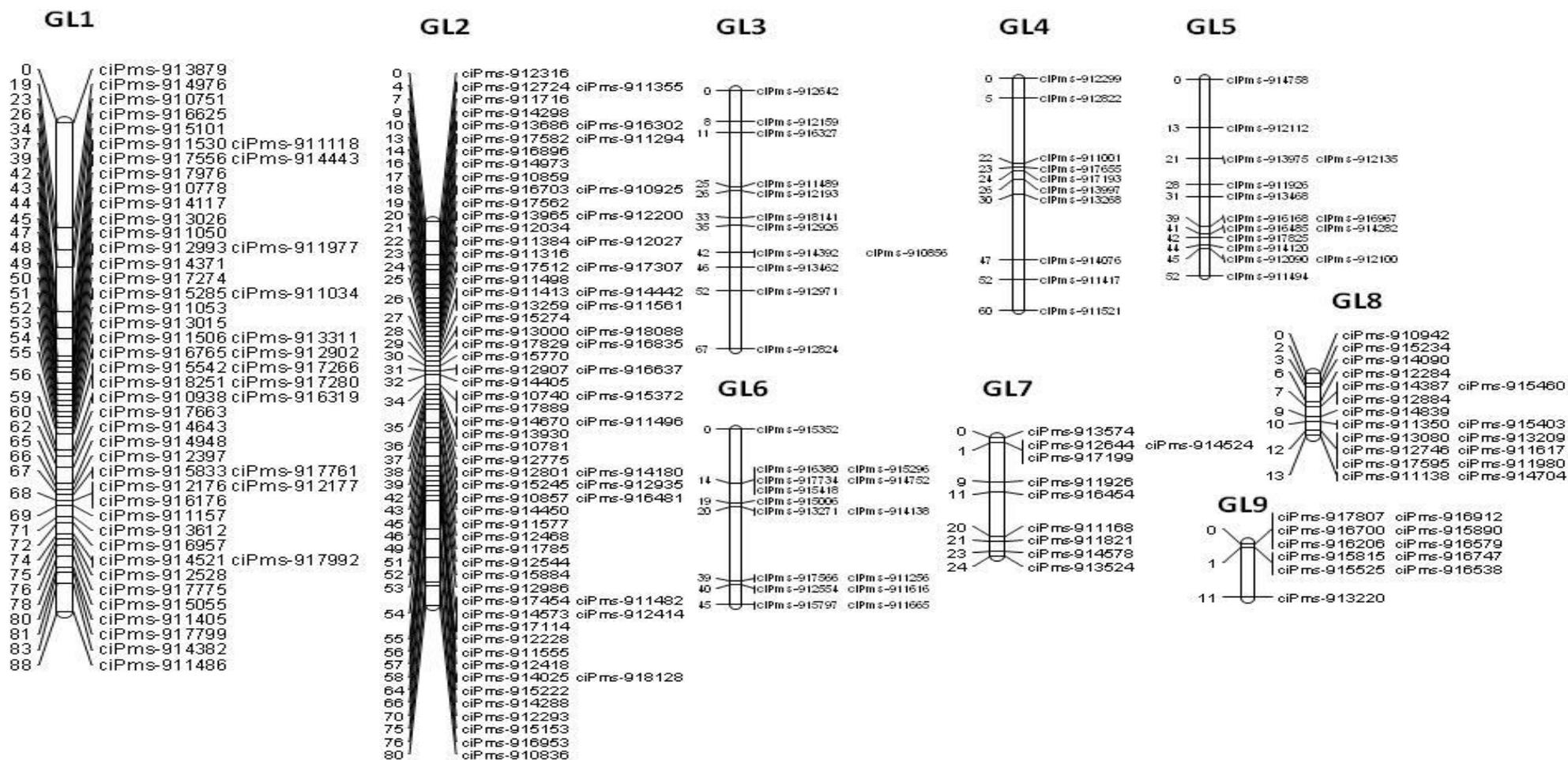


Figura 13. Mapa genético integrado de tangor Murcott e laranja Pera com nove grupos de ligação e 217 marcadores DArT

Tabela 8. Grupos de ligação (GL), número de marcadores por grupo de ligação e a distância em centimorgan.

Grupos de ligação	Número de Marcadores	Distância (cM)
GL1	53	88
GL2	74	80
GL3	12	67
GL4	10	60
GL5	15	52
GL6	15	45
GL7	10	24
GL8	18	13
GL9	11	11

5.4.1. MAPEAMENTO DE QTLs E eQTLs

Considerando a avaliação de sintomas e concentração bacteriana *X. fastidiosa* foi possível identificar QTLs e eQTLs associados à característica resistência a CVC, indicando que a herança genética é poligênica. Mesmo assim foi possível identificar a existência de plantas resistentes, tolerantes e suscetíveis, o que possibilita considerar a existência de um gene de efeito maior.

Foram identificados quatro QTLs relacionados com os sintomas nas plantas, presentes nos grupos de ligação GL1, GL4, GL5 e GL9 (Figura 14). E dois QTLs associados à concentração de bactéria presentes nos grupos de ligação GL4 e GL5 (Figura 15).

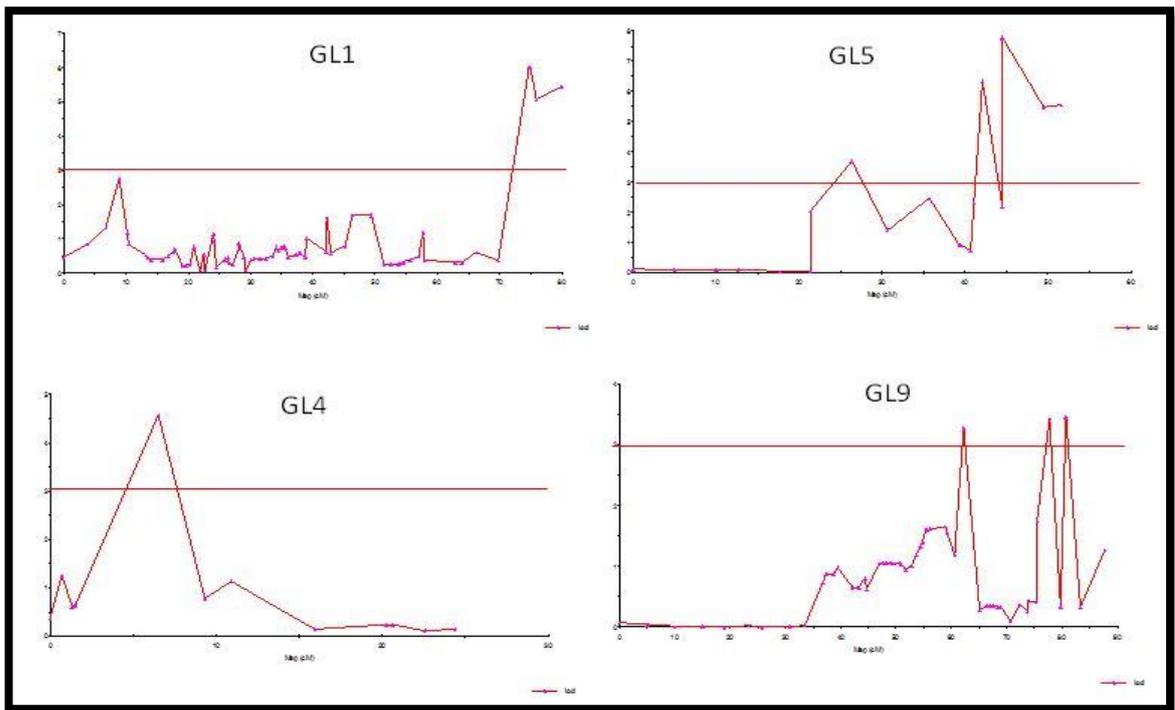


Figura 14. Grupos de ligação (GL) do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera e QTLs associados à característica sintoma.

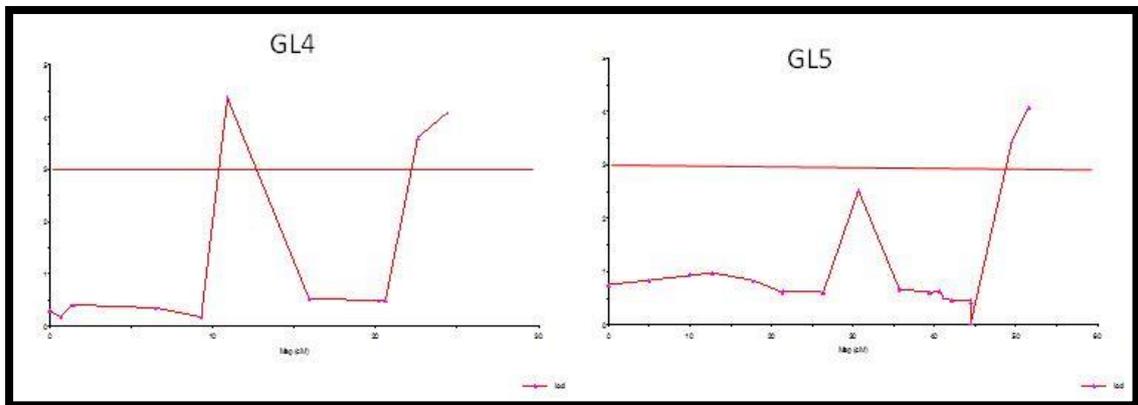


Figura 15. Grupos de ligação (GL) do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera e QTLs associados à característica concentração de bactérias.

O mapeamento das expressões dos genes apresentaram alguns QTLs relacionados a grupos de ligação. Foram identificados eQTLs relacionados ao gene do Ácido Abscísico (Figura 16) em três grupos de ligação GL2, GL6 e GL9.

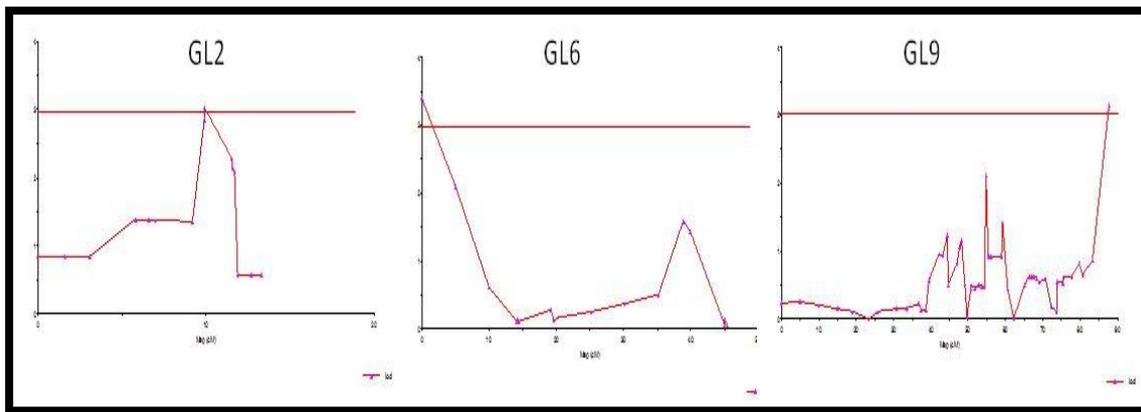


Figura 16. Grupos de ligação (GL) do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera e eQTL associado ao gene que expressa o Ácido Abscísico.

Foram identificados eQTLs relacionados ao gene da Taumatina (Figura 17) em dois grupos de ligação GL5 e GL8.

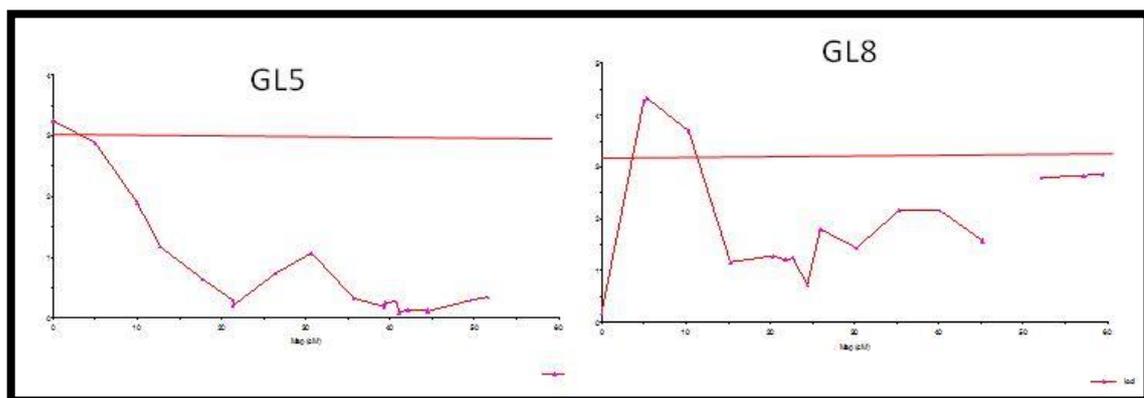


Figura 17. Grupos de ligação (GL) do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera e eQTL associado ao gene responsável pela expressão da Taumatina.

Para o gene *NBS-LRR-RGH1* foi identificado um eQTL no grupo de ligação GL4 (Figura 18). Os eQTLs relacionados a Quinase *Xa21* estão presentes em três grupos de ligação GL6 , GL7 e GL8 (Figura 19).

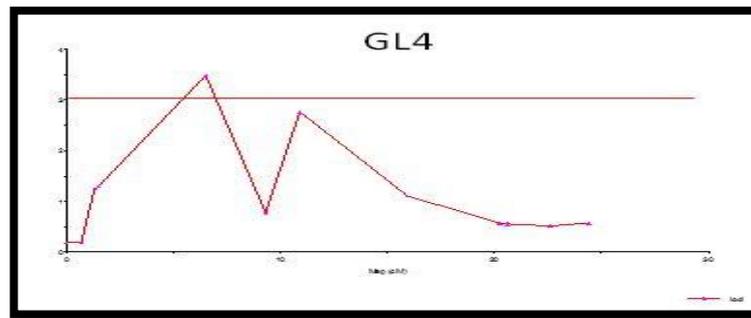


Figura 18. Grupos de ligação (GL) do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera e eQTL associado ao gene responsável pela expressão da *NBS-LRR –RGH1*.

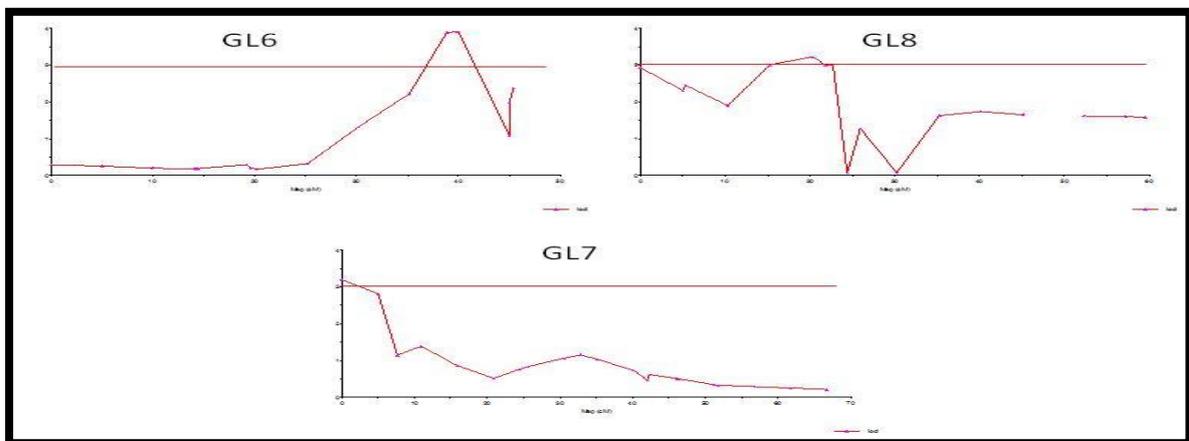


Figura 19. Grupos de ligação (GL) do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera e eQTLs associados ao gene responsável pela expressão da Quinase *Xa21*.

Foram associados eQTLs ao grupo de ligação GL1 e GL9 para o gene da Anquirina (Figura 20).

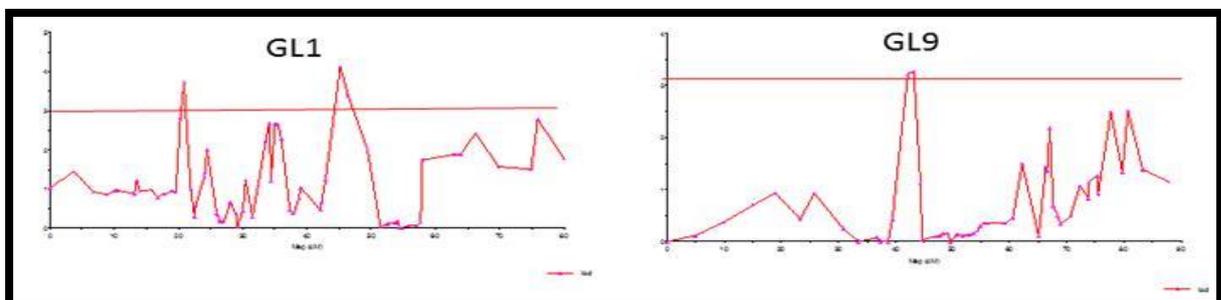


Figura 20. Grupos de ligação (GL) do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera e eQTLs associados ao gene responsável pela expressão da Anquirina.

Os QTLs de menor efeito fenotípico são detectados como herança poligênica ou quantitativa, o QTL de efeito moderado, são na faixa de 10 a 30% da variação fenotípica (ASINS et al., 2004). QTL associado à resistência a “*Pierce’s disease*” em uva, causada pela bactéria *X. fastidiosa* foi localizado no mapa do genitor resistente explicando 72% da variância fenotípica (KRIVANEK et al., 2006). Em citros, o estudo de leprose obteve resultados interessantes com QTL explicando 80% da variação fenotípica (BASTIANEL et al., 2009).

Nesse trabalho os QTLs para sintoma à CVC foram identificados, explicando de 68 a 85% da variação fenotípica total, para característica quantificação de bactérias apresentou variação de 79%. E para os QTLs relacionados com os genes de resistência apresentaram variação fenotípica entre 45 a 83%(Tabela 9).

O estudo de expressão de resistência a fitopatógenos é uma interessante forma identificar os genes que promovam uma agricultura mais sustentável e com menos impacto de defensivos no ambiente. Os genes selecionados para estudo, nesse trabalho, estão envolvidos na resposta da planta a uma condição de estresse relacionada com um patógeno. Alguns desses genes já são conhecidos na literatura e foram analisados individualmente demonstrando uma resistência eficaz que pode resultar em uma citricultura com menores impactos ao ambiente devido ao uso menor de defensivos para uma adequada produção. Outros são genes ainda desconhecidos e há a necessidade de maiores estudos de identificação das proteínas, das suas estruturas e de suas funções.

Tabela 9- Detalhes dos QTLs e eQTLs detectados nos grupos de ligação do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera pelo método Interval QTL Mapping associados às variáveis estudadas.

Variáveis	Grupo de ligação	Intervalo (cM)	LOD	LOD Crítico	Variância	% explicada
	9	87,7	3,15	3,0	0,1135	82,8
G1	6	0	3,41	3,0	0,1118	83,1
	2	9,9	3,03	3,0	0,1513	77,1
G2	2	6,6	3,07	3,0	0,6828	82,1
	5	0	3,26	3,0	0,7029	81,6
G4	8	21,8	3,01	3,0	0,6715	78,6
G10	2	9,9	3,81	3,0	0,1259	78,8
	4	6,5	3,48	3,0	0,1034	82,6
G12	1	45,2	4,13	3,0	0,2554	64,2
	9	42,2	3,22	3,0	0,3883	45,6
Bactéria	4	10,9	4,37	3,0	0,2055	79,5
	5	51,6	4,08	3,0	0,2666	73,3
	1	74,9	6,03	3,0	0,0711	81,2
Sintomas	4	6,5	4,58	3,0	0,0595	84,3
	5	44,5	7,80	3,0	0,0550	85,5
	9	80,7	3,46	3,0	0,1187	68,7

6. CONCLUSÕES

- a) Na análise dos trinta e sete híbridos do cruzamento de tangor Murcott com laranja Pera foram detectados sete híbridos resistentes que não multiplicaram a bactéria e, conseqüentemente, não apresentaram sintoma, 24 híbridos tolerantes que multiplicaram a bactéria e não apresentaram sintomas e 6 híbridos suscetíveis que multiplicaram a bactéria e apresentaram sintomas. Sabendo que todas as plantas foram infectadas através de borbulhões e que somente 6 híbridos são suscetíveis, o número de plantas que se mantiveram sadias chega a 83,7%, demonstrando a eficiência da transmissão desta característica do genitor tangor Murcott para a progênie ;
- b) Das 10 plantas em que a fonte de inóculo apresentava sintoma de CVC e o híbrido estava sadio, apenas três híbridos (75, 23 e 242) apresentaram a bactéria *X. fastidiosa*, sendo assim, esses são considerados tolerantes, ou seja, não manifestam o sintoma, mas possibilitam a multiplicação da bactéria na planta. Todos os ramos fonte de inóculo foram positivos para a presença da bactéria. Na avaliação da expressão dos genes houve uma alta relação entre os híbridos resistentes e os genes de resistência, e as duas metodologias utilizadas que demonstraram essa relação apresentaram os mesmos resultados;
- c) A análise da expressão de 13 genes associados com defesa nos híbridos mostra que existe relação entre a expressão de Taumatina e Quinase *Xa21*, dois genes relacionados a resistência a patógeno, e a resistência. O gene da isoflavona redutase apresentou correlação significativa com o gene da Taumatina e também com o gene *PDRR*. Dois genes cujos produtos não são

conhecidos apresentaram alta correlação, o gene *PDRR* e o gene *SPD*. Genes como *HCr2*, Anquirina, Ácido Abscísico, Quitinase e *RGH1* apresentaram uma expressão mediana não interferindo diretamente na expressão dos diferentes fenótipos dessa população. Os genes *ABA*, *GST 22*, *HCr 2-0A* e *PDRR* apresentaram valor de p significativo tanto para a correlação com quantificação de bactéria quanto para a correlação com fenótipo sintomático;

- d)** O mapa apresentou nove grupos de ligação, alguns desses (GL9, GL5, GL4, GL2) apresentaram QTLs relacionados à expressão da resistência. Os genes mapeados foram os relacionados à síntese do ácido abscísico, taumatina, *NBS LRR RGH1*, quinase *Xa21* e anquirina, além das características relacionadas à concentração de bactéria e sintomatologia;

- e)** O estudo de expressão de genes relacionados com resistência a fitopatógenos foi importante para mapear regiões do cromossomo responsáveis pela resistência. O uso de variedades resistentes é peça chave para uma agricultura mais sustentável e com menos impacto de defensivos no ambiente.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. **Adesão e Colonização em vasos do xilema de laranjeiras doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre a película de poliestireno.** Piracicaba, 2003. p146. Dissertação (Doutorado) – ESALQ/USP, Piracicaba, 2003.

ALVES, E.; MARUCCI, C .R.; LOPES, R.E.; LEITE, B. Leaf symptoms on plum, coffee and citrus and the relationship with the extent of xylem vessels colonized by *Xylella fastidiosa*. **Journal of Phytopathology**, London, v. 152, p.291-297. 2004.

AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; PALAZZO, D.A.; BASSANEZI, R.B.; GODOY, C.V.; TORRES, G.A.M. Clorose variegada dos citros: uma escala diagramática para a avaliação da severidade da doença. **Fitopatologia Brasileira**, Piracicaba, v 18, p. 174-180, 1993.

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription - PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Chicago, v.64, p.5245-5250, 2004.

APPLIED BIOSYSTEMS. Introdução ao PCR em tempo real. Disponível em: <<http://www.appliedbiosystems.com.br/site/material/d1jg4lmm.pdf>>. Acesso em: 07 set. 2012.

ASINS, M. J.; BERNET, G.P.; RUIZ, C.; CAMBRA, M.; GUERRI, J.; CARBONELL, E. A. QTL analysis of citrus tristeza vírus-citradia interaction. **Theoretical and Applied Genetics**, v.108, p.603-611, 2004

AYRES, M.; AYRESJR, M.; AYRES, D.; SANTOS, A. **BioEstat 5.0** Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá, Belém, 2007.

BACSO, R.; JANDA, T.; GALIBA, G.; PAPP, I. Restricted transpiration may not result in improved drought tolerance in a competitive environment for water. **Plant Science – Elsevier**, v.174. p. 200-204, 2008.

BASTIANEL, M; CRISTOFANI-YALY, M; OLIVEIRA, A.C.; ÁSTUA, J.F.; GARCIA, A.A.F.; RESENDE, M.D.V.; RODRIGUES, V.; MACHADO, M.A. Quantitative trait loci analysis of citrus leprosis resistance in an interspecific backcross family of (*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* L. Osbeck) x *C. sinensis* L. Osb. **Euphytica**, v. 169, p. 101-111, 2009.

BATISTA PINTO, L.F. **Ocorrências de interações QTL x Sexo, de epistasias e de QTLs pleiotrópicos em aves.** Piracicaba, 2007. p.119. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba 2007.

BENKO-ISEPPON, A.M.; WINTER, P.; HUETTEL, B.; STAGINNUS, C.; MUEHLBAUER, F. J.; KAHL, G. Molecular markers closely linked to fusarium resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis-related

- genes located on Arabidopsis chromosomes 1 and 5. **American Journal of Plant Sciences**. v. 107. n. 2. p 379-386, 2003. DOI: 10.1007/s00122-003-1260-x.
- BOAVA, L.P.; KUHN O.J.; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO, R.M.; FURTADO, E.L. Atividade de quitinases e peroxidases em folhas de eucalipto em diferentes estágios de desenvolvimento após tratamento com acibenzolar-S-metil (ASM) e inoculação com *Puccinia psidii*. **Tropical Plant Pathology** v.35, n.2, p.124-128. 2010.
- BREM, R.B.; YVERT, G.; CLINTON, R., KRUGLYAK, L. Genetic dissection of transcriptional regulation in budding yeast. **Science**, v.296, p.752-755, 2002.
- BRUNO, A.K.; WETZEL, M. The early light-inducible protein (ELIP) gene is expressed during the chloroplast-to-chromoplast transition in ripening tomato fruit. **J. Exp. Botanic.**, v.55 p.2541- 2548, 2004.
- CAMPOS, T.M.P.; CRISTOFANI, M.; SANTOS JÚNIOR, J.A.; SCHINOR, E.H.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M .A. Avaliação de híbridos de limão Cravo vs *Poncirus Trifoliata* para resistência à Gomose de *Phytophthora*. **Embrapa**, 2010.
- CARVALHO, M.L.V.; V. ROSSETI; J.R. POMPEU. Evolução da sintomatologia de Clorose Variegada do Citros, em laranja doce (*C. sinensis*). Brasília : **Fitopatologia Brasileira**, v.20.p. 351, 1995.
- CHAGAS, C.M.; ROSSETI, V.; BERETTA, M.J.G. Electron microscopy studies of a xylem limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil.**Journal Phytopathology**, v.134, p.306-312, 1992
- COE, H.E.; NEUFFER, M.G.; HOISINGTON, D.A. The Genetics Of Corn. In: Sprague, G. F.; Dudley, J.W. **Corn and corn improvement**. 1988. p.81-237.
- COLETTA FILHO, H.D.; PEREIRA, E.O.; SOUZA, A. A. DE; TAKITA, M. A.; CRISTOFANI-YALY, M.; MACHADO, M. A. Analysis of resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pera sweet orange x Murcott tangor. **Plant Pathology**, v.56, 2007.
- CRISTOFANI-YALY, M.; BASTIANEL, M.; FALDONI, L.; BLUMER, S.; POMPEU JUNIOR, J.; CAMPOS, T.M.P.; SANTOS JÚNIOR, J.A.; MACHADO, M.A. Seleção de citrandarins (tangerina Sunki vs. *Poncirus trifoliata*) para porta-enxertos de citros. **Laranja**, v.28, n.1-2, p.71-79, 2007.
- COIMBRA, J.L.M.; GUIDOLIN, A.F.; CARVALHO, F.I.F.; AZEVEDO, R. Correlações Canônicas : II - Análise Do Rendimento Degrãos De Feijão E Seus Componentes. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 30 p. 31-35, 2000.
- CONSONI, R. **Efeito da aplicação de inseticidas em plantas cítricas na população das cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa*, agente causal da Clorose Variegada dos Citros, e do psílídeo vetor de *Candidatus liberibacter asiaticus*, agente causal do Huanglongbing, em pomares novos**. Araraquara, 2011. 58f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, 2011.

DANGL, J.L.; DIETRICH, R.A.; THOMAS, H. Senescence And Programmed Cell Death. In: Buchanan, B.B.; Grissem, W.; Jones, R.L. **Biochemistry e Molecular Biology Of Plant**. p.1044-1100. 2000

DEKKERS, J. C. M.; HOSPITAL, F. Multifactoral Genetics: The Use Of Molecular Genetics. In The Improvement Of Agricultural Populations. **Nature Reviews Genetics**. v.3, n. 1, p. 22-32. .2002.

DORAK, M.T. **Real Time PCR**. Taylor e Francis group. Nova Iorque.Taylor e Francis Group.p.362, 2006.

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

DROBY, S.; VINOKUR, V.; WEISS, B.; COHEN, L.; DAUS, A.; GOLDSCHMIDT, E.E.; PORAT, R. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Phytopathology**. v. 92 p. 393-399. 2002.

DROST, D.R.; BENEDICTA, C.I.; BERG, A.; NOVAES, E, NOVAES, C.R.D.B.; YUA, Q.; DERVINIS, C.; MAIA, J.M.; YAP, J.; MILES, B.; KIRST, M. Diversification in the genetic architecture of gene expression and transcriptional networks in organ differentiation of *Populus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, p.8492–8497 , 2010

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Mapeamento de QTL para produção e qualidade de carcaça em frangos de corte. **Periódicos Capes**, 2007. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/genomafrango>>. Acesso em: 24/09/2012.

FANTA, N.; ORTEGA, X.; PÉREZ, L.M. The development of *Alternaria alternata* is prevented by chitinases and β -1,3- glucanases from Citrus limon seedlings. *Biological Research, Chile*. v.36. p.411-420, 2003.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p.36-41, 2008.

FUNDECITRUS (Fundo de defesa de citricultura). Descobertos mais 6 vetores CVC. **Revista do Fundecitrus**, v.94, p8-9, Araraquara, 1999.

FUNDECITRUS (Fundo de defesa de citricultura). **Manual de CVC**. Araraquara, 2004, 11p.

GRAHAM, L.S.; STICKLEN, M.B. Plant chitinases. **Canadian Journal of Botany** v. 72. p.1057 – 1083.1994.

GRIFFITHS, A. J. F; WESSLER, S. R; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B. **Introdução A Genética**. 9. Ed. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.712

GMITTER, F. G., CHEM, C.,MACHADO, A.M., SOUZA, A.A., OLLITRAULT, P. FROELICHER, Y. SHIMIZU,T. Citrus genomics. **Tree Genetics & Genomes**. v 8,p.611–626, 2012.

HARTLEY S.E.; JONES C.G. Plant chemistry and herbivory, or why the world is green. 1997. In: **Plant ecology** (M.J. Crawley ed.). Blackwell Science, Oxford. p.284-324.1997.

HUBNER, N.; WALLACE, C.A.; ZIMBAHL, H.; PETRETTO, E.; SCHULZ,H.; MACIVER, F.; MUELLER, M.; HUMMEL, O.; MONTI, J.; VACLAV, Z.; MUSILOVA, AL.; KREN,V.; CAUSTON, H.; GAME, L.; BORN, G.; SCHMIDT, S.;MULLER, A.; COOK, S..A.; KURTZ, T.W.; WHITTAKER, J.; PRAVENEK, M.; AITMAN,T.J. Integrated transcriptional profiling and linkage analysis for identification of genes underlying disease. **Nature Genetics**, v.37, p.243-253, 2005.

JACCOUD, D.; PENG, K.; FEINSTEIN, D.; KILIAN, A. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 4:e25, Jan. 2001.

JANSEN, R.C.; NAP,J.P. **Genetical Genomics: The Added Value From Segregation**. Trends In Genetics. 2001.v.17.n.7.

JARREL, D.C.; ROOSE, M.L.; TRAUGH, S.N.; KUPPER, R.S. A genetic map of citrus based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross. **Theoretical and Applied Genetics**, v.84, p.49-56, 1992.

JUNG, Y. C.; LEE, H. J.; YUM, S. S. ; SOH, W. Y. ; CHO, D. Y. ; AUH, C. K. ; LEE, T. K. ; SOH, H. C. ; KIM, Y. S. ; LEE. S. C. Drought-inducible—but ABA-independent—thaumatin-like protein from carrot (*Daucus carota* L.) **Plant Cell**. v. 24, p. 366-373, 2005

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases – regulation and function. 2003. **Cellular & Molecular Biology letters**. v. 8, p. 809 – 824. (2003)

KRIVANEK, A.F.; RIAZ, S.; WALKER, M.A. Identification and molecular mapping of *PdR1*, a primary resistance gene to Pierce’s disease in *Vitis*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.112, n.6, p.1125-1131, 2006.

KIM, Y. S.; LEE, J. H.; YOON, G. M.; CHO, H. S.; PARK, S. W.; SUH, M. C.; CHOI, D.; HA, H. J.; LIU, J.R.; PAI, H. S. *CHRK1*, a chitinase-related receptor-like kinase in Tobacco. **Plant Physiology**, v. 123, n.3, p.905-916, 2000.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. Piracicaba: USP –ESALQ. **Manual de Fitopatologia**. v.2. 1997.

KNOP, L.A.H.; SHINTCOVSK, R.L. **Apostila de bioestatística básica**. 2009. http://www.portalf.com.br/trabalhos/doc/APOSTILA_TEORICA_PARTE_2.pdf

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

KUBO, S. K. **Expressão gênica diferencial de genótipos de citros em resposta à infecção do vírus da leprose (CiLV-C)**. 2011. 166f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT. **Elsevier Science**, Washington, v.25, p.402–408, 2001.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS Jr. D.; NEGRI, J.D; PIO, R.M; POMPEU Jr. J. (eds). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico 2005.

MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F.; RIBEIRO, R.V.; MEDINA, C.L.; STUCHI, E.S.; MARIN, F.R.; SILVA, J.A.B.; SILVA, S.R. Fluxo de seiva e fotossíntese em laranja 'Natal' com clorose variegada dos citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 911-918, 2006.

MAHMOOD, T.; JAN, A.; KOMATSU, J. Proteomic analysis of bacterial blight defence signalling pathway using transgenic rice overexpressing thaumatin-like protein. **Biologia Plantarum**. Springer Netherlands. v.53, p 285-293.2009. 10.1007/s10535-009-0052-9.

MARUCCI, R.C.; CAVICHIOLI, R.R.; ZUCCHI, R.A. Espécies de cigarrinhas (Hemiptera, Cicadellidae, Cicadellinae) em pomares de citros da região de Bebedouro, SP, com descrição de uma espécie nova de *Acrogonia* Stål. **Revista Brasileira de Entomologia** v.46 n.2 p.149-164. 2002

MEDINA, C.L. **Fotossíntese, relações hídricas e alterações bioquímicas em laranja pera com CVC e submetida a deficiência hídrica**. 2002. 164p. Doutorado. Unicamp 2002. Campinas.

MELLO, M. O.; SILVA FILHO, M. C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Braz. J. Plant Physiologic** [online]. vol.14, n.2, pp. 71-81.2002, ISSN 1677-0420. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202002000200001>.

MEIRELLES, S. L. **Características de carcaça de bovinos da raça canchim - estimativas de parâmetros genéticos e associação com marcadores moleculares**. 2007. 79f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal. 2007.

MONKS, S.A.; LEONARDSON, A.; ZHU, H.; CUNDIFF, P.; PIETRUSIAK, P.; EDWARDS, S.; PHILLIPS, W.; SACHS, W.; SCHADT, E. Genetic inheritance of gene expression in human cell lines. **American Journal of Human Genetics**, v.75, p.1094-1105, 2004.

NEVES, M.F.; LOPES, F.F. **Estratégias para laranja no Brasil**. 1. ed. São Paulo: Atlas, 2005. 225 p.

- NEVES, E.V.; MÔNACO NETO, L. A. Importância econômica da citricultura paulista. **Espaço Citrícola** –fevereiro- março - abril de 2012. Edição 49.
- NIELSEN, K.K.; BOJSEN, K.; ROEPSTORFF, P.; MIKKELSEN, J.D. A hydroxyproline-containing class IV chitinase of sugar beet is glycosylated with xylose. **Plant Molecular Biology** v.25 p.241-257.1994.
- NOVAIS, C.M., PIRES- ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** - nº33 - julho/dezembro, 2004.
- OLIVEIRA, A.C.; VALLIM, M.A.; SEMIGHINI,C.P.; ARAUJO, W.L.; GOLDMAN,G.H.; MACHADO,M.A. Quantification of *Xylella fastidiosa* from Citrus Trees by Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay.**Phytopathology** .v.92, p.1048-1054, 2002.
- PFAFFL, M.W.; HORGAN, G. W.; DEMPFFLE, L .Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids** v.30, e 36. 2002.
- PINTO, A. de S.; POSTALI, J. R.; OLIVEIRA, H. N. de. **Guia de campo de pragas e insetos benéficos da soja**. Piracicaba,2008, p.264.
- PRIA JÚNIOR, W. D.; LACAVAL, P. M.; LI, W.; COSTA, P. I.; HARTUNG, J. S. Detecção da *Xylella Fastidiosa* em sementes e sua translocação para plântulas de laranja-doce. **Laranja**, v.24, n.2, p.397-412. 2003.
- PURCELL, A. H. Cigarrinhas na cultura de citros. In: DONADIO, L.C.; GRAVENA, S. **Manejo integrado de pragas dos citros**. Campinas: Fundação Cargill, p.195-209. 1994.
- PURCINO, R. P. **Metabolismo de compostos nitrogenados e carboidratos**.2006. 110 f. Dissertação (Doutorado) - Departamento de Instituto de Biologia, Unicamp Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- PURCINO, R. P.; MEDINA, C. L; MARTINS, D.; WINCK, F. V.; MACHADO, E. C.; NOVELLO, J. C.; MACHADO, M. A.; MAZZAFERA,P. *Xylella fastidiosa* disturbs nitrogen metabolism and causes a stress response in sweet orange *Citrus sinensis* cv. Pêra. **Journal of Experimental Botany**. p 1 -12 . doi:10.1093/jxb/erm138. .2007.
- RODRIGUES, C.M. **Expressão diferencial de genes em laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb) e em tangerina (*Citrus reticulata* blanco) em resposta à infecção por *Xylella fastidiosa***. São Paulo,2011.140p. Tese (Doutorado em Genética Vegetal) Universidade do Estado de São Paulo, São Paulo ,2011.
- ROSSETTI, V.; DE NEGRI, J.D. Clorose variegada dos Citros: revisão. 1990. **Laranja**. v.11, n.1, p.1-14,
- RUPERTI, B.; CATTIVELLI, L.; PAGNO, S.; RAMINA, A. Ethylene-responsive genes are differentially regulated during abscission, organ senescence and wounding in peach (*prunus persica*). **Journal of Experimental Botany**. v. 53,p. 429-437, 2002.

- SALGADO, C. C. **Integração de Mapas Genéticos**. 2008. p.142. Dissertação - Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais. 2008.
- SANTANA, W.O. **Genômica Comparativa de Xylella Fastidiosa: Diversidade do pangenoma e análise de genes de patogenicidade**. 2012. p. 156. Tese - Universidade de São Paulo. Instituto de Química. São Paulo. 2012
- SANTOS FILHO, H. P.; BARBOSA, C.J.; LARANJEIRA, F.F.; BRITO SILVA, S.X. CVC ameaça a citricultura do recôncavo sul. Bahia: **Citros em foco**. n°34, 2010.
- SCHADT, E. E.; MONKS, S. A.; DRAKE, T. A.; LUSIS, A. J.; CHE, N.; COLINAYO, V.; RUFF, T.G.; MILLIGAN, S. B.; LAMB, J. R.; CAVET, G.; LINSLEY, P. S.; MAO, M.; STOUGHTON, R. B. Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. **Nature** 422: 297–302,2003.
- SCHADT EE, LAMB J, YANG X, ZHU J, EDWARDS S, GUHATHAKURTA D, SIEBERTS SK, MONKS S, REITMAN M, ZHANG C, LUM PY, LEONARDSON A, THIERINGER R, METZGER JM, YANG L, CASTLE J, ZHU H, KASH SF, DRAKE TA, SACHS A, LUSIS AJ. An integrative genomics approach to infer causal associations between gene expression and disease. **Nature Genetics**. v.37, p. 710 – 717, 2005. doi:10.1038/ng1589
- SCOTT, A.J.; KNOTT, M. Acluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v.30, n.2, p.507-512, 1974.
- SENHORAS, E. M.; TAKEUCHI, K. P.; TAKEUCHI, K. P. Estrutura da Indústria de Suco de Laranja Concentrado: Uma Investigação do Complexo Agroindustrial Citrícola Paulista. In: Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia, III SEGeT, Rio Janeiro. **Anais**. Rio Janeiro : III SEGet, 2006.
- SHIU, S.-H.; BLEECKER, A.B. Plant Receptor-Like Kinase Gene Family: Diversity, Function, and Signaling. **Pubmed central** v. 113, p.22.2001. DOI: 10.1126/stke.2001.113.re22.
- SHOJI, T.; WINZ, R.; IWASE,T.; NAKAJIMA,K.; YAMADA, Y.; HASHIMOTO,T. Expression patterns of two tobacco isoflavone reductase-like genes and their possible roles in secondary metabolism in tobacco. **Plant Molecular Biology** v. 50.p. 427–440, 2002.
- STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. L. Principles and procedures of statistics. 2. ed. New York : **McGraw-Hill**,p418, 1980.
- VAN OOIJEN, J.W.; BOER, M.P.; JANSEN, R.C.; MALIEPAARD, C. MapQTL™4.0: Software for the calculation of QTL positions on genetic maps. Wageningen **Plant Research International**. 2002.
- VAN OOIJEN J.W.,VOORRIPS R.E. JoinMap 3.0 Software for hte calculation of genetic linkage maps. **Plant Reasearch Interncional**, Wageningen, Netherland, 2001.

WANDERLEY-NOGUEIRA AC, BELARMINO LC, SOARES-CAVALCANTI NM, BEZERRA-NETO JP, KIDO EA, PANDOLFI V, ABDELNOOR RV, BINNECK E, CARAZZOLE MF AND BENKO-ISEPPON AM. An overall evaluation of the Resistance (R) and Pathogenesis Related (PR) superfamilies in soybean, as compared with Medicago and Arabidopsis. **Genetic Molecular Biolog.** v.35.p.260-271. 2012.

XIE, Z-P.; STAEHELIN, C.; WIEMKEN, A.; BROUGHTON, W.J.; MÜLLER, J.; BOLLER, T. Symbiosis-stimulated chitinase isoenzymes of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Journal experimental Botany.** v.50 p.327-333. 1999.

YAMAMOTO, P. T.; JÚNIOR PRIA, W. D.; ROBERTO, S. R.; FELIPPE, M. R.; DE ALMEIDA, E. J.; DE FREITAS, E. P. Controle Químico Da Cigarrinha Em Citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.23, N.1, p.141-154, 2002.

ANEXO I. Dados de expressão gênica originados a partir do método $\Delta\Delta C_t$ para os híbridos resistentes e tolerantes

Híbridos	<i>ABA</i>	<i>Tau.</i>	<i>Quit.</i>	Quin. <i>Xa21</i>	Quin. <i>CHRK1</i>	Isofl. Sintetase	<i>PDRR</i>	<i>SPD</i>	Isofl. Redutase	<i>RGH1</i>	<i>HCr 2</i>	<i>Anq.</i>	<i>GST-22</i>
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113	1,704	-0,146	1,744	4,256	1,590	0,531	2,614	2,984	5,346	-0,195	0,877	1,571	3,181
116	1,091	-0,107	0,535	0,389	-2,021	-0,646	0,537	-1,227	1,080	0,773	0,743	0,280	-0,750
75	0,234	-0,542	-0,353	0,568	-3,348	0,851	0,499	2,396	0,428	0,281	0,086	-0,513	-0,407
357	1,042	-0,071	0,687	0,910	-0,602	-0,771	4,304	-0,071	0,968	1,244	0,898	1,022	0,790
23	1,065	1,310	0,538	0,898	7,488	1,201	5,494	1,768	1,203	0,715	1,190	1,121	0,607
250	0,515	0,373	0,253	0,537	0,850	0,945	-2,218	0,669	1,008	1,783	1,375	5,456	1,162
290	2,506	2,677	2,505	2,252	3,415	1,569	0,582	3,415	2,574	1,845	2,382	2,299	0,774
242	-0,249	-0,233	0,210	-0,425	-0,233	-0,884	0,872	-2,389	-0,277	0,374	-0,067	-0,027	0,075
103	0,397	1,297	0,094	0,821	1,297	0,133	2,939	1,297	0,024	0,677	0,213	0,124	0,039
336	2,289	0,074	0,671	1,839	0,074	1,329	2,074	1,052	0,795	1,182	-0,115	0,123	-0,657

ANEXO II. Resultados oriundos dos cálculos de $\Delta\Delta C_t$ para os híbridos mapeados.

Amostras	ABA	Tau.	Quit.	Quin. <i>Xa21</i>	Quin. <i>CHRK1</i>	Isofl. Sintetase	<i>PDRR</i>	SPD	Isofl. Redutase	<i>RGH1</i>	<i>HCr 2</i>	Anq.	<i>GST-22</i>
Controle (31)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0,830	-1,821	0,593	0,068	2,468	0,280	2,952	1,148	1,449	1,432	1,307	0,452	-2,685
14	0,643	2,830	1,541	3,660	3,217	4,623	4,337	2,553	3,792	0,643	0,202	-0,190	-0,219
29	1,083	2,379	1,004	4,760	1,419	0,696	3,538	1,821	5,292	1,556	0,482	0,942	-0,519
30	1,672	3,268	1,594	4,867	1,759	0,630	5,069	4,456	5,572	1,672	0,483	1,158	-0,178
75	0,342	-0,241	1,143	1,424	1,113	-1,226	4,202	2,842	1,792	0,342	-1,141	0,687	3,383
79	-0,343	-0,469	1,516	1,086	0,621	0,303	1,585	3,009	2,249	1,845	1,256	1,018	0,580
4	0,927	-1,001	1,974	0,990	2,540	0,071	4,102	3,361	3,356	1,027	-0,155	0,040	1,191
5	1,312	-1,017	1,896	2,815	2,313	1,475	3,154	1,952	3,609	1,312	1,909	1,864	2,366
6	-0,096	0,380	1,333	0,582	2,699	-2,889	1,051	0,949	-0,112	-0,096	-2,641	-1,095	-0,143
10	1,073	-1,878	1,233	1,388	2,236	0,943	1,882	1,091	0,640	-1,073	1,305	1,609	-1,209
13	1,685	-2,290	0,074	-0,330	2,319	-0,499	1,484	-0,145	-0,145	1,685	-0,107	-0,163	-1,662
15	0,080	-0,950	0,715	1,360	1,179	1,467	3,645	2,019	2,019	0,080	2,195	1,508	0,183
20	0,282	-2,157	1,078	0,444	0,717	-0,354	2,301	4,229	1,790	1,787	1,654	0,704	0,187
23	-0,351	-2,377	0,419	1,125	2,555	-2,426	3,476	3,402	1,075	-0,351	-0,074	-0,094	1,223
34	1,388	3,048	1,408	4,734	2,019	1,850	4,957	2,440	5,716	1,388	0,173	0,941	0,111
37	1,528	-1,115	1,724	1,595	1,180	1,885	2,585	1,468	3,299	1,528	1,174	0,429	1,160
44	0,374	-2,207	1,332	4,927	0,949	-1,163	3,242	4,052	0,111	0,374	-0,820	0,303	-3,406
47	1,827	-0,396	1,107	2,961	0,357	1,256	3,936	3,506	4,869	1,827	1,358	-0,551	1,288
50	2,110	2,659	1,621	5,145	0,986	2,383	1,950	2,049	2,027	2,110	2,254	-0,259	0,022
57	-0,552	-1,309	0,666	3,337	1,938	0,050	3,096	1,472	0,527	-0,552	0,383	-0,172	0,783
59	1,209	0,185	1,670	2,704	-1,435	1,475	4,453	4,339	3,493	1,209	1,670	1,733	1,518
60	2,122	2,212	2,077	4,572	-0,693	-0,879	4,621	1,050	3,116	2,122	1,799	0,821	1,077

Conclusão

ANEXO II. Resultados oriundos dos cálculos de $\Delta\Delta Ct$ para os híbridos mapeados.

Amostras	ABA	Tau.	Quit.	Quin. <i>Xa21</i>	Quin. <i>CHRK1</i>	Isofl. Sintetase	<i>PDRR</i>	<i>SPD</i>	Isofl. Redutase	<i>RGH1</i>	<i>HCr 2</i>	Anq.	<i>GST-22</i>
61	2,007	1,865	1,549	5,053	0,356	-0,869	3,247	1,254	3,713	2,007	2,339	0,361	-0,684
66	1,549	0,934	1,600	3,715	2,746	1,756	4,100	4,981	4,034	1,549	0,722	1,666	-0,114
69	0,012	-0,972	1,890	1,628	-0,016	-0,217	4,574	2,874	2,707	0,012	-0,541	0,507	3,497
72	0,437	-1,026	1,133	1,291	0,038	-2,011	3,616	2,822	1,177	0,437	-1,436	0,509	3,084
78	-0,338	-2,269	0,541	1,347	-0,392	-0,157	2,543	1,011	1,993	-0,338	0,162	-0,011	2,260
82	1,549	-1,968	1,236	1,663	-0,185	2,200	0,525	1,001	1,001	1,549	0,566	0,901	-0,260
84	2,323	2,999	1,590	4,268	-1,967	0,654	4,663	0,934	3,831	2,323	1,803	0,588	0,973
86	1,587	2,364	1,028	4,876	0,245	1,870	2,013	1,850	2,168	1,587	3,927	0,394	1,011
7	1,742	2,263	1,733	4,694	2,820	4,029	3,471	1,346	5,449	1,742	-2,351	1,105	-2,941
11	1,733	0,144	1,271	3,243	2,386	0,670	3,660	3,261	3,756	1,295	0,385	0,533	1,186
26	-0,249	-0,784	1,897	4,796	1,605	1,007	4,904	3,754	2,185	-0,249	0,809	1,254	3,330
33	1,543	-1,568	0,979	0,596	2,456	0,323	1,908	0,564	3,139	0,944	0,526	0,950	1,952
42	1,645	1,078	1,632	3,118	0,841	1,079	4,422	3,669	3,990	1,645	1,075	0,319	2,083
46	1,790	2,760	1,980	3,758	1,016	0,617	4,630	3,437	4,854	1,790	2,049	1,354	2,563
48	1,504	0,841	2,043	4,762	0,301	5,729	5,170	1,393	2,238	1,504	2,192	-0,218	1,539