

**INSTITUTO AGRONÔMICO**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA**  
**TROPICAL E SUBTROPICAL**

**MAPEAMENTO GENÉTICO DE TANGERINA SUNKI E**  
***PONCIRUS TRIFOLIATA* PARA RESISTÊNCIA AO**  
***HUANGLONGBING (GREENING) DOS CITROS***

**SAMANTA MARENGO**

**Orientador: Marcos Antonio Machado**  
**Co-orientadora: Mariângela Cristofani-Yaly**

Dissertação submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de **Mestre**  
em Agricultura Tropical e Subtropical  
Área de Concentração em Genética,  
Melhoramento Vegetal e Biotecnologia

Campinas, SP  
Maio 2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ficha elaborada pela bibliotecária do Núcleo de Informação e Documentação do Instituto Agrônômico

M324m Marengo, Samanta  
Mapeamento genético de tangerina Sunki e *Poncirus trifoliata* para resistência ao “huanglongbing” (greening) dos citros. / Samanta Marengo. Campinas, 2009. 75 fls.

Orientador: Marcos Antonio Machado  
Co-orientadora: Mariângela Cristofani-Yaly  
Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal)  
– Instituto Agrônômico

1. Citricultura – doenças 2. “Huanglongbing”, 3. PCR quantitativo  
4. QTLs. I. Machado, Marcos Antonio II. Cristofani-Yaly, Mariângela  
III. Título

CDD. 634.31

Aos meus pais

Sandra e Joel (*in memoriam*),

Pelo amor e apoio

**DEDICO**

Ao meu querido

companheiro, Francis

e meus irmãos Barbara e Victor

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

- Ao pesquisador e orientador Dr. Marcos Antonio Machado, pela oportunidade e ensinamentos;
- À pesquisadora e co-orientadora Dra. Mariângela Cristofani Yaly, pela grande dedicação, ensinamentos e amizade;
- Ao Dr. Helvécio pelas valiosas colaborações;
- Ao José Alberto (Beto) pela amizade e grande auxílio;
- Aos amigos do laboratório;
- À toda a equipe de pesquisadores, aos funcionários da administração e colegas do Centro APTA Citros Sylvio Moreira;
- Aos colegas e funcionários da PG-IAC, pelo auxílio e amizade no decorrer do curso;
- À FAPESP pela bolsa concedida;
- À toda minha família, pelo apoio;
- Aos meus irmãos, pelo companheirismo e paciência;
- Ao Francis, pelo carinho e imenso amor;
- Á minha mãe, pelo incentivo aos estudos e pela grande amizade;
- Especialmente ao meu pai, por mostrar-me que um grande amor não tem fim nem morte.

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
LISTA DE ANEXOS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Genética e Melhoramento de Citros.....	2
2.2 “Huanglongbing” (“greening”) dos Citros.....	6
2.2.1 <i>Candidatus Liberibacter</i> .....	7
2.2.2 Melhoramento para a resistência ao HLB.....	9
2.3 Mapeamento genético.....	12
2.3.1 Mapeamento genético de citros.....	16
2.4 Mapeamento de QTLs.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Local de Experimentação.....	23
3.2 Material Genético.....	23
3.3 Marcadores Moleculares.....	23
3.3.1 Extração do DNA Total.....	23
3.3.2 Marcadores Microssatélites (“Simple Sequence Repeats”).....	24
3.3.3 Marcadores TRAPs (“Target Region Amplification Polymorphism”).....	25
3.4 Construção dos Mapas de Ligação .....	27
3.5 Infecção do material vegetal .....	27
3.6 Detecção e quantificação da bactéria por PCR quantitativo (qPCR).....	28
3.7 Análise estatística.....	29
3.8 Avaliação de sintomas de HLB.....	29
3.9 Identificação de QTLs .....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Curva Padrão para qPCR de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> .....	31
4.2 Quantificação da <i>Liberibacter</i> nos Genitores ( <i>C. sunki</i> e <i>P. trifoliata</i> ).....	34
4.3 Quantificação da <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> na progênie .....	37
4.4 Sintomas de HLB nos genitores ( <i>C. sunki</i> e <i>P. trifoliata</i> ).....	41
4.5 Mapas de Ligação.....	43
4.5.1 Marcadores moleculares.....	43
4.5.2 Análise de ligação.....	47
4.5.3 Mapeamento de QTLs.....	51
5 CONCLUSÕES.....	56
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
7 ANEXOS.....	67

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 -	Códigos utilizados para os tipos de segregação para uma população CP (“Cross Pollinators”) .....	25
Tabela 2 -	Seqüências dos “primers” fixos e arbitrários utilizados para amplificar marcadores TRAPs nos híbridos de <i>C. sunki</i> e <i>P. trifoliata</i> .....	26
Tabela 3 -	Taxa de infecção (*) e média número de cópias da molécula 16S rDNA (**) de <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> nas espécies <i>C. sunki</i> e <i>P. trifoliata</i> .....	35
Tabela 4 -	Valores médios dos Cts de amplificação da bactéria <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> nas espécies <i>C. sunki</i> e <i>P. trifoliata</i> nos diferentes tempos de coleta.....	36
Tabela 5 -	Estimativa de parâmetros genéticos obtidos para as variáveis número de cópias da molécula 16S rDNA, valores do Ct e delta Ct em uma progênie de 94 indivíduos do cruzamento entre <i>C. sunki</i> vs <i>P. trifoliata</i> .....	38
Tabela 6 -	Características dos marcadores moleculares selecionados, no presente trabalho, para integrar os mapas já estabelecidos de <i>C. sunki</i> e <i>P. trifoliata</i> .....	46
Tabela 7 -	Número, tipo de marcadores e a distância em centimorgans (cM) de cada grupo de ligação do mapa de <i>C. sunki</i> .....	50
Tabela 8 -	Número, tipo de marcadores e a distância em centimorgans (cM) de cada grupo de ligação do mapa de <i>P. trifoliata</i> .....	50
Tabela 9 -	Detalhes dos QTLs detectados nos grupos de ligação de <i>P. trifoliata</i> , pelo método “Multiple QTL Mapping” (MQM) associados às características estudadas.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 -	Sintomas típicos do huanglongbing em plantas de citros: (A, B, C) plantas com amarelecimento e acentuada queda de folhas; (D) folha com mosqueamento típico, (E) detalhe da folha com sintomas semelhantes à deficiência mineral e (F) frutos apresentando tamanho reduzido, columela torta, sementes abortadas e amadurecimento e coloração desuniformes. (Fotos: Marcos A. Machado).....	7
Figura 2 -	Regiões flaqueadas pelas sondas Taqman, que possuem a capacidade de distinguir os resultados entre as duas espécies ( <i>Ca. L. asiaticus</i> e <i>Ca. L. americanus</i> ).....	11
Figura 3 -	PCR quantitativo- Curva de amplificação: diluições seriadas (11; $1,1 \times 10^{-1}$ ; $1,1 \times 10^{-3}$ ; $1,1 \times 10^{-5}$ ; $1,1 \times 10^{-6}$ ng) do DNA plasmidial contendo o inserto 16S rDNA da bactéria <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> .....	32
Figura 4 -	PCR quantitativo- Curva de amplificação: diluições seriadas (34; 3,4; $3,4 \times 10^{-1}$ ; $3,4 \times 10^{-2}$ ; $3,4 \times 10^{-4}$ ; $3,4 \times 10^{-5}$ ng) do DNA de uma planta sadia com amplificação de 18S rDNA.....	32
Figura 5 -	PCR quantitativo- Curva padrão para determinação do número de cópias de 16S rDNA da bactéria <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> .....	33
Figura 6 -	PCR quantitativo- Curva padrão para a determinação do gene 18S rDNA em planta sadia.....	33
Figura 7 -	Número de cópias da molécula 16S rDNA ao longo dos meses de coleta.....	36
Figura 8 -	Distribuição de médias para as variáveis: A- número de cópias da molécula 16S rDNA. B- valor do Ct. C- valor do delta Ct (Programa SISVAR, FERREIRA., 2000).....	40
Figura 9 -	Padrão das folhas da espécie <i>P. trifoliata</i> infectada (A) e não infectadas (B) com <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> .....	41
Figura 10 -	Padrão das folhas da espécie <i>C. sunki</i> infectadas com <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> .....	42
Figura 11 -	Gel poliacrilamida 5%. Combinação dos “primers” TRAPs F2P3, bandas polimórficas destacadas em azul. M: Marcador molecular; P1: <i>C. sunki</i> ; P2: <i>P. trifoliata</i> ; 1 ao 6: híbridos.....	44
Figura 12 -	Gel agarose 3%; amplificação de fragmentos de DNA utilizando microssatélite CCSM 156. (1) <i>P. trifoliata</i> , (2) <i>C. sunki</i> (3-11) híbridos. M= marcador de peso molecular.....	45



Figura 13 -	Mapa de ligação de <i>C. sunki</i> com 121 marcadores (78 RAPD, 17 AFLP, 8 SSR e 18 TRAP) em 11 grupos de ligação; os marcadores TRAPs estão destacados em vermelho e os SSR em azul.....	48
Figura 14 -	Mapa de ligação de <i>P. trifoliata</i> com 202 marcadores (135 RAPD, 33 AFLP, 10 SSR e 24 TRAP) em 10 grupos de ligação; os marcadores TRAPs estão destacados em vermelho e os SSR em azul; os QTLs estão destacados em amarelo.....	49
Figura 15 -	QTLs associados à resistência ao HLB em mapas de ligação de <i>P. trifoliata</i> .....	55

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 -	Análise de variância para os dados do número de cópias da molécula 16S rDNA (Programa SISVAR, FERREIRA., 2000) e teste de comparação de médias (Scott-Knott ao nível de 5% de significância).....	67
Anexo 2 -	Análise de variância para os valores dos Cts (Programa SISVAR, FERREIRA., 2000) e teste de comparação de médias (Scott-Knott ao nível de 5% de significância ).....	69
Anexo 3 -	Análise de variância para os valores do delta Ct (Programa SISVAR, FERREIRA., 2000) e teste de comparação de médias (Scott-Knott ao nível de 5% de significância).....	71
Anexo 4 -	Marcadores TRAPs, seqüência dos “primers”, tipo de segregação e teste de homogeneidade para segregação mendeliana.....	73
Anexo 5 -	Marcadores microssatélites, tipo de repetição, seqüência dos “primers”, tipo de segregação e teste de homogeneidade para segregação Mendeliana.....	75

MARENGO, Samanta. **Mapeamento genético de tangerina Sunki e *Poncirus trifoliata* para resistência ao “huanglongbing” (greening) dos citros.** 2009. 75p. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal)- Pós-Graduação- IAC.

## RESUMO

O histórico da citricultura é assinalado por uma sucessão de doenças causadas por diferentes agentes etiológicos. O “huanglongbing” (HLB) ou “greening”, causado pela bactéria *Candidatus Liberibacter spp.* é considerado a mais grave das doenças de citros. Embora a literatura relate a suscetibilidade de praticamente todas as espécies e variedades de citros ao HLB, o grupo de trifoliata (*Poncirus trifoliata* Raf.), incluindo seus híbridos, são considerados mais tolerantes. A construção de mapas de ligação é de fundamental importância em programas de melhoramento, permitindo a associação de regiões genômicas às características de interesse agrônomo. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi saturar os mapas de ligação previamente estabelecidos com marcadores RAPD e AFLP de *Citrus sunki* Hort. Ex Tan e *Poncirus trifoliata* utilizando marcadores microssatélites (SSRs, “Single Sequence Repeats”) e TRAPs (“Target Region Amplification Polymorphisms”) visando ao mapeamento de regiões genômicas associadas à resistência ao HLB. Foram genotipados 94 híbridos, com “primers” TRAPs e SSRs obtidos a partir de DNA genômico e ESTs do banco de dados do CitEST. Esses marcadores foram integrados aos mapas através do programa JoinMap v. 3.0. Para tangerina Sunki foram gerados 11 grupos de ligação e, para *Poncirus*, os marcadores se ligaram em 10 grupos. Os resultados obtidos por qPCR (PCR quantitativo) indicam que existe diferença na multiplicação da bactéria entre tangerina Sunki e *Poncirus*, sendo que a bactéria se multiplica mais rapidamente na tangerina. O mapeamento de QTLs foi realizado pelo programa MapQTL v. 4.0. Três QTLs foram detectados nos grupos de ligação 3 e 5 de *Poncirus*. Este é o primeiro estudo envolvendo análise de QTL para esse patossistema. Com base na distribuição das frequências das características na população F<sub>1</sub> e na detecção de QTLs com efeitos moderados, a característica resistência ao HLB em *Poncirus trifoliata* parece ser controlada por vários genes.

Palavras-chave: “huanglongbing”, PCR quantitativo, QTLs.

MARENGO, Samanta. **Genetic mapping of Sunki mandarin and *Poncirus trifoliata* cv Rubidoux to resistance for the huanglongbing (greening) of citrus.** 2009. 75p. Dissertation (Master in Plant Breeding) - Post-Graduate IAC.

## ABSTRACT

The history of the citriculture is marked by a succession of diseases caused by different etiological agents. The huanglongbing (HLB) or greening, caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter* ssp. is considered the most serious diseases of citrus. Although the literature reports the sensitivity of virtually all species and varieties of citrus to the HLB, the group of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.), including its hybrids, are considered more tolerant. The construction of linkage maps is of fundamental importance in breeding programs, allowing the association of genomic regions with the characteristics of agronomic interest. In this sense, the objective of this study was to saturate the linkage maps previously established with RAPD and AFLP markers in *Citrus sunki* Hort. Ex Tan and *Poncirus trifoliata* using microsatellite markers (SSRs, Single Sequence Repeats) and TRAPs (Target Region Amplification Polymorphisms) to map genomic regions associated with resistance to HLB. Ninety four hybrids were genotyped with TRAPs primers and SSRs derived from genomic DNA and ESTs from CitEST database. These markers were integrated to the maps using JoinMap 3.0 software. For mandarin, 11 linkage groups were generated and for *Poncirus*, markers were linked to 10 groups. The results obtained by qPCR (quantitative PCR) indicated that there is a difference in bacteria multiplication between Sunki mandarin and *Poncirus*, and that the bacterium multiplied faster in mandarin. QTL mapping was performed using MapQTL v. 4.0 software. Three QTLs were detected on linkage groups 3 and 5 of *Poncirus*. This is the first study involving QTL analysis for this pathosystems of citrus. Based on the frequency distribution of the characteristics in F<sub>1</sub> population and the detection of QTLs that explained little of the phenotypic variation, the characteristic resistance to HLB in *Poncirus trifoliata* seems to be controlled by several genes.

Keywords: huanglongbing, quantitative PCR, QTLs.

# 1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira se destaca como uma das mais importantes atividades do agronegócio brasileiro, com uma cadeia estruturada em diferentes segmentos (viveiristas, produtores, fornecedores de insumos e máquinas, prestadores de serviço, indústrias, etc.). Seus indicadores são significativos e, embora seja uma fornecedora de “commodities”, ela tem expressiva participação e controle brasileiro. Sem sombra de dúvidas, o Estado de São Paulo sempre foi o principal produtor e exportador dessa “commodity” internacional.

No entanto, alguns problemas têm atingido o setor, como os crescentes danos causados por pragas e doenças, sendo as principais, a clorose variegada dos citros (CVC), o cancro cítrico, a leprose, a tristeza, a pinta preta, a morte súbita (MSC), e mais recentemente o “huanglongbing” (HLB) ou “greening”. Os danos causados são irreversíveis e afetam diretamente a quantidade e qualidade das frutas cítricas, podendo chegar até a improdutividade e erradicação das plantas.

Uma alternativa racional frente ao usual controle químico dessas doenças ou de seus vetores é a obtenção de genótipos com maior resistência a esses principais patógenos (CRISTOFANI *et al.*, 1999). Sendo assim, os programas de melhoramento genético e seleção dos citros focam a obtenção de novas variedades de porta-enxertos e de copa com maior tolerância ou resistência a doenças e pragas, e mais adaptadas a condições abióticas adversas. Frente a este cenário, o melhoramento de citros tem avançado nas últimas décadas, principalmente devido à possibilidade de utilização e incorporação de ferramentas de biotecnologia aos programas tradicionais de melhoramento. Nesse aspecto, a utilização de marcadores moleculares para a seleção precoce de plantas de origem híbrida, oriundas de cruzamentos dirigidos, possibilitou a seleção de um número elevado de novas combinações e, conseqüentemente, o estabelecimento de um maior número de populações híbridas em condições de campo para seleção de novas variedades e características agrônômicas desejáveis.

Neste contexto, marcadores moleculares como TRAPs (“Target Region Amplification Polymorphism”) (CHEN *et al.*, 2006), AFLPs (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) (VOS *et al.*, 1995) e SSRs (“Simple Sequence Repeats”) (KIJAS *et al.*, 1995) contribuem para o desenvolvimento de mapas de ligação de alta resolução, permitindo a clonagem e o isolamento dos genes de interesse baseados nos mapas genéticos. O uso de marcadores ancorados em sequências repetidas, os

denominados microssatélites (SSRs), permitem a integração de mapas e a seleção assistida por marcadores em um amplo espectro de populações. Um mapa de referência com marcadores multialélicos co-dominantes fornece a possibilidade de ligar os mapas dos dois genitores envolvidos e permite mapeamento comparativo (BARKLEY *et al.*, 2006; CRISTOFANI, *et al.*, 2000).

O HLB tornou-se uma das principais preocupações da citricultura na atualidade, principalmente em função da falta de fontes de resistência que amplie as perspectivas de controle genético em médio e longo prazo. Por outro lado, também não existem informações sobre a herança da suscetibilidade diferencial entre espécies nesses grupos, como em *Citrus* spp e *Poncirus trifoliata*.

Desse modo, o objetivo principal desse trabalho insere-se no estudo da relação patógeno-hospedeiro utilizando-se como modelo uma população segregante de citrandarins (tangerina Sunki x *P. trifoliata*), com foco na comparação de capacidade de infecção e replicação da bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. em uma progênie de citrandarins e seus genitores.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Genética e Melhoramento de Citros

O gênero *Citrus* é representado por plantas de porte médio (arbóreo/arbustivo), flores brancas e aromáticas e frutos tipo baga. Estima-se que sua origem ocorreu entre 20 a 30 milhões de anos atrás, nas regiões tropical e subtropical da Ásia e do arquipélago Malaio, de onde se dispersaram para outras regiões do mundo. O sistema de classificação mais utilizado foi o proposto por SWINGLE (1943), que reconheceu 16 espécies verdadeiras de citros e as classificou entre os seis gêneros que compunham o grupo subtribal denominado "árvores de citros verdadeiros" ("true citrus fruit trees"), subtribo Citrinae, tribo Citreae, subfamília Aurantioideae da família Rutaceae (SWINGLE & REECE, 1967).

Segundo GUERRA *et al.* (2000), a subfamília Aurantioideae pode ser caracterizada pela dominância de diplóides, sendo que de suas 60 espécies estudadas até então, a grande maioria é  $2n = 2x = 18$  e, ocasionalmente, ocorrem autopoliplóides intra-específicos ( $3x$  e  $4x$ ). Poliplóides comprovadamente estabilizados são raramente encontrados. A estabilidade do cariótipo em Aurantioidea está aparentemente ligada à alta capacidade de hibridação interespecífica. (GUERRA *et al.*, 1997, 2000).

Em relação ao sistema de classificação sistemática e a filogenia, esse grupo de plantas apresenta grande complexidade, principalmente devido à compatibilidade sexual entre citros e gêneros afins, alta frequência de mutações, longa história de cultivo e sua ampla dispersão. Recentemente, diversas técnicas moleculares têm sido introduzidas para inferir filogenia, incluindo a análise de sítios de restrição, sequenciamento, análises estruturais e reação em cadeia da polimerase (PCR), baseada em técnicas como RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), AFLPs e SCAR (“Sequence Characterized Amplified Regions”) (NICOLOSI *et al.*,2000).

As espécies do gênero *Citrus* reproduzem-se sexuadamente por autopolinização e polinização cruzada e assexuadamente por apomixia nucelar adventícia. Suas sementes possuem tanto embriões zigóticos, como apomíticos, apresentando, em geral, apomixia facultativa, com número variável de embriões entre um a doze. Espécies do gênero *Citrus* e outras de gêneros correlacionados como *Poncirus* e *Fortunella* apresentam compatibilidade genética, produzindo híbridos férteis de interesse para o melhoramento.

Após hibridação com *Poncirus*, os descendentes denominados citrange (híbridos com laranja doce), citrandarim (híbridos com tangerina), citrumelo (híbridos com pomelo), entre outros, apresentam folhas trifoliadas, que é uma característica morfológica governada por um gene dominante. Contudo, vale ressaltar, que o uso de *Poncirus* como um dos genitores em programas vai muito além de sua marcante morfologia de folha trilobada, visto que esse gênero apresenta inúmeras características agrônomicas importantes, como resistência a doenças e melhor qualidade de fruta na variedade copa enxertada sobre ele.

Tangerina Sunki (*Citrus sunki* Hort. ex. Tanaka) é originária do sudeste da China sendo indicada como porta-enxerto para laranjas, tangerinas e pomelos, possui diversas características desejáveis, como: induz boa formação de copa, apresenta tolerância a tristeza, morte súbita, xiloporose, sorose e declínio, tolerância a solos salinos e a seca. No entanto, apresenta características agrônomicas indesejáveis como suscetibilidade a gomose e pequeno número de sementes viáveis por fruto.

SOARES FILHO *et al.* (2000) destacam que a tangerina Sunki é indicada como importante genitor feminino em programas de melhoramento de citros via hibridação, pelo alto pegamento de fruto, baixa poliembrionia, e elevada frequência de híbridos, principalmente quando se usa como genitor masculino *P. trifoliata* ou seus híbridos.

O porta-enxerto *P. trifoliata* (L.) Rafinesque Rubidoux, espécie única do gênero, é um genótipo muito usado no Japão, Uruguai e em países de clima temperado sendo indicado para combinações com laranjas, limas ácidas e tangerinas. *P. trifoliata* induz melhor qualidade de fruto, é ideal para regiões frias e úmidas, induz baixo vigor reduzindo o porte da copa, facilitando a colheita e o adensamento do pomar e apresenta boas características fitossanitárias como: resistência a *Phytophthora* spp., nematóides, vírus da tristeza dos citros e à xiloporose. No entanto, possui aspectos negativos como: suscetibilidade ao exocorte, intolerância ao declínio, baixo desenvolvimento em viveiro, intolerância a seca, alta exigência nutricional a apresenta incompatibilidade com a laranja Pêra, limões verdadeiros e tangor Murcott (SIVIERO *et al.*, 2002).

Segundo CRISTOFANI *et al.* (2000) e TEROL *et al.* (2008), os citros possuem muitas características agronômicas que são difíceis de selecionar por técnicas convencionais de melhoramento, devido à maioria delas possuir herança quantitativa, com poucas heranças qualitativas caracterizadas como resistência à tristeza, leprose e morfologia foliar, que são aparentemente governadas por um ou dois genes.

No melhoramento genético de citros, o estudo do modo de herança de resistência a doenças e de outras características importantes apresenta um determinado grau de complexidade especialmente devido a fatores de ordem genética, botânica e agronômica. Tais como a heterogeneidade genética do gênero, poliembrionia natural, recombinação, longo período pré-reprodutivo, incompatibilidade, alta heterozigosidade, complexidade dos mecanismos genéticos, depressão por autogamia e, por ser espécie perene, longo tempo é necessário para se realizar seleções para as características desejadas (CRISTOFANI *et al.*, 1999).

O uso de um número reduzido de variedades com base genética estreita e o sistema de produção de citros como monocultura fez com que a indústria citrícola se tornasse vulnerável a pragas e doenças. Como aconteceu como vírus da tristeza dos citros (CTV) na década de 1940, cancro cítrico na década de 50, CVC nos anos 90 e, mais recentemente, MSC e HLB.

Os programas de melhoramento genético de citros focam, principalmente, a obtenção de novos porta-enxertos e variedades copa resistentes às doenças, pragas e mais adaptados a condições abióticas adversas. Neste contexto, uma das formas mais eficientes de associar as características fenotípicas da cultura com as características genéticas é por meio de mapas de ligação, no qual essas características são ordenadas



sequencialmente, correspondendo de modo aproximado à posição dos genes nos cromossomos (MACHADO *et al.*, 2005).

A hibridação artificial com polinização controlada é o método mais eficiente para a obtenção de híbridos, pois, além de permitir o controle da identidade de ambos os genitores, reduz significativamente os riscos de cruzamentos indesejáveis e de autofecundação (MACHADO *et al.*, 2005). Entretanto, a maioria das pesquisas de melhoramento de *Citrus* tem como objetivo, selecionar variedades que sejam resistentes a doenças. Poucos estudos genéticos, usando uma progênie controlada, têm sido realizados para entender a herança genética com relação à resistência a essas doenças.

Os desafios na obtenção de progênies F<sub>1</sub> no cruzamento dentro do gênero *Citrus* e entre gêneros próximos são consideráveis e a introgressão de genes em *Citrus* por hibridação sexual é frequentemente dificultada pela poliembrionia, incompatibilidade sexual e longa juvenilidade. Essa abordagem é particularmente importante quando a ela se agregam ferramentas da biotecnologia, auxiliando na seleção de indivíduos zigóticos, na obtenção de marcadores, no mapeamento genético, culminando com a seleção assistida por marcadores.

As estratégias de melhoramento de citros, atualmente, envolvem genética-genômica, a qual representa o estudo de processos genéticos controladores de caracteres fenotípicos de herança complexa, a partir da análise conjunta de informação relativa a fenótipos, estruturas de parentesco, marcadores moleculares e expressão gênica (ROSA, 2007).

As seqüências expressas do genoma (ESTs) estão se tornando disponíveis em banco de dados públicos. Essa coleção representa uma fonte valiosa para a o acesso direto aos genes de interesse e para o desenvolvimento de marcadores moleculares baseados em clonagem e programa de seleção assistida por marcadores. Além disso, mapas de ligação genética têm sido produzidos com o aumento de sua resolução, diante da evolução de novos marcadores.

O estudo de locos controladores de características quantitativas (QTLs-“Quantitative Trait Loci”) associado ao uso de mapas genéticos obtidos por marcadores moleculares permite identificar, mapear e quantificar o efeito dos QTLs. Atualmente, mapear QTL em *Arabidopsis* e outras espécies vegetais é facilmente aplicável, porque essas apresentam mapas com alta densidade de marcadores. Até o momento, o que dificulta a identificação do gene ou genes responsáveis pelo QTL são as grandes regiões englobadas pelo QTL, a baixa densidade de marcadores e o pequeno número de

genitores recombinantes utilizados. A disponibilidade de uma sequência completa do genoma é uma ferramenta útil na busca por QTLs (HANSEN *et al.*, 2008).

## 2.2 “Huanglongbing” (“greening”) dos Citros

No século XVIII e XIX um grande problema na plantação de citros da Índia foi descrito, parecendo se tratar de HLB, porém sua causa não era conhecida. Os primeiros relatos científicos sobre o “huanglongbing” (HLB) foram registrados em 1919, os quais descrevem na China a doença do ramo amarelo (“yellow shoot”) dos citros. Parece provável que o HLB seja originário da Índia e tenha se propagado para a China (GOTTWALD *et al.*, 2007).

O HLB é considerado uma das mais devastadoras doenças de citros de todo o mundo. Até então restrita a países da Ásia e da África, a doença teve seu agente causal recentemente identificada no Estado de São Paulo (COLETTA FILHO *et al.*, 2004). A bactéria é restrita ao floema da planta e apresenta lento crescimento no tecido (DA GRAÇA, 1991).

O HLB é extremamente danoso à citricultura e tem provocado enormes prejuízos em todas as regiões onde ocorre. A doença é de particular importância para a citricultura brasileira, pois além de causar consideráveis e irreversíveis danos a praticamente todas as variedades de citros, encontra-se no país o seu vetor, a espécie de psilídeo *Diaphorina citri*. As duas principais formas de disseminação da doença são a transmissão através deste vetor (*D. citri*), o que torna o controle da doença ainda mais difícil, e material vegetativo contaminado (borbulhas e mudas).

O HLB se caracteriza por uma série de sintomas que são basicamente representados pela ocorrência de folhas jovens com sinais de deficiência de Zn, Ca, B e Mn, frutos com tamanho reduzido e assimétrico, com a columela central torta, abortamento de sementes, coloração desuniforme com predomínio da cor verde na face voltada para o interior da planta, além do mosqueamento das folhas (manchas irregulares verde claras ou amarelas) (Figura 1). A planta apresenta redução do número de radículas, queda acentuada de folhas e frutos e seca dos ramos a partir da extremidade. Plantas infectadas com HLB apresentam morte econômica (incapacidade de produção econômica) em curto espaço de tempo e morte biológica com ataque severo da bactéria.

Os sintomas das frutas encontradas no Brasil são mais semelhantes aos observados na China do que na África do Sul (BOVÉ, 2006).



**Figura 1.** Sintomas típicos do huanglongbing em plantas de citros: (A, B, C) plantas com amarelecimento e acentuada queda de folhas; (D) folha com mosqueamento típico, (E) detalhe da folha com sintomas semelhantes à deficiência mineral e (F) frutos apresentando tamanho reduzido, columela torta, sementes abortadas e amadurecimento e coloração desuniformes. (Fotos: Marcos A. Machado).

### 2.2.1 *Candidatus Liberibacter*

O agente causal do HLB, *Candidatus Liberibacter*, é uma bactéria endocelular e limitada ao floema da planta hospedeira. Embora, nas plantas cítricas a presença de *Candidatus Liberibacter* resulte em sintomas bastante evidentes, dados de literatura têm mostrado que esta bactéria apresenta distribuição bastante irregular e pode estar presente em baixas concentrações (HUNG *et al.*, 1999). Além do mais, a expressão dos sintomas é lenta, podendo variar de 6 a 12 meses (HUNG *et al.*, 2000).

A bactéria apresenta três espécies diferentes de '*Candidatus*' (termo usado para bactérias que não são cultiváveis) que utilizam os citros como hospedeiros, com ocorrência geográfica definida: *Ca. L. asiaticus*, que ocorre em países asiáticos, como China, Japão, Índia, Filipinas e Vietnã, entre outros, tendo como vetor o psilídeo *D. citri* Kuwayama, *Ca. L. africanus*, que é encontrada em países africanos, como a África do Sul e o Zimbawe e tem como vetor o psilídeo *Triosa erythrae* Del Guercio e a *Ca. L.*

americanus detectada no Brasil, sendo o vetor a espécie *D. citri* (TEIXEIRA *et al.*, 2005a).

Recentemente, as três espécies de *Candidatus Liberibacter* ssp. foram cultivadas com sucesso utilizando um meio denominado Liber A. Esse cultivo foi confirmado através do PCR em tempo real e sequenciamento. Esse foi o primeiro relato de cultivo das espécies *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* (SECHLER *et al.*, 2009).

A primeira técnica de identificação e confirmação do HLB foi através da microscopia eletrônica. Esta se baseou em duas características da bactéria, localização exclusiva nos vasos do floema e presença de parede celular (BOVÉ, 2006).

Há na literatura indicação de metodologia capaz de identificar a espécie asiática da bactéria (HUNG *et al.*, 1999; HUNG *et al.*, 2004), a espécie africana (JAGOUEIX *et al.*, 1996) ou ambas (HOCQUELLET *et al.*, 1997), através da determinação da sequência do DNA ribossomal 16S, com a amplificação por PCR. Por ser uma região do DNA que apresenta alta conservação, é adequada para estudos filogenéticos (WEISBURG *et al.*, 1991).

Ao longo dos anos, muitos estudos foram desenvolvidos para a detecção e identificação dessas bactérias. HOCQUELLET *et al.* (1997) desenvolveu sondas não radioativas para esse fim. As espécies da Ásia e África podem ser diferenciadas pela sensibilidade a temperatura, hibridização de DNA, propriedades genômicas e sorológicas (BOVÉ, 2006). A *Ca. L. africanus* é sensível a altas temperaturas, assim como o psilídeo *T. erythrae*. Já a *Ca. L. asiaticus* e o *D. citri* são tolerantes a altas temperaturas.

Algumas regiões são utilizadas para estudar essas duas espécies, como a região intergênica 16S/23S, a qual apresentou 79,46% de homologia entre *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. africanus* (JAGOUEIX *et al.*, 1997). Para a detecção da bactéria HOCQUELLET *et al.* (1999) utilizaram PCR baseado na amplificação de genes de proteínas ribossomais. Os “primers” foram desenhados a partir das sequências *rplA* e *rplJ* ( $\beta$  operon) e amplificaram 669 pb na espécie de *Ca. L. africanum* e 703bp na *Ca. L. asiaticum*, dessa maneira, foi possível à distinção entre essas espécies.

Uma árvore filogenética foi construída baseada nas sequências do gene *opm* de *Liberibacter* da Ásia e África, e esta confirmou a filogenia baseada na região 16S rDNA (BASTIANEL *et al.*, 2005). Analisando essa região verificou-se uma baixa similaridade da bactéria encontrada no Estado de São Paulo com a espécie asiática e africana. Esse fato se reflete na árvore filogenética, pois a nova bactéria foi separada em outro grupo,

confirmando os resultados obtidos por outros estudos da região 16S rDNA e indicando que esta é uma nova espécie *Ca. L. americanus*. Todas as Liberibacters são pertencentes à subdivisão  $\alpha$  da classe *Proteobacteria* (TEIXEIRA *et al.*, 2005b).

### 2.2.2 Melhoramento para resistência ao HLB

Para entender o conceito de resistência ou suscetibilidade a determinado fator é necessário considerar que muitas doenças de citros são doenças exclusivas da copa, ou do porta-enxerto, ou resultante da interação entre eles. Assim, qualquer estratégia de melhoramento deve levar em consideração a natureza da interação planta-patógeno.

Aparentemente todas as espécies e variedades de citros são suscetíveis à bactéria do HLB, embora os sintomas não sejam típicos e uniformes para todas elas. A suscetibilidade ou resistência a um determinado patógeno é dada pela interação entre genes de patogenicidade e avirulência do patógeno com genes de resistência do hospedeiro. O entendimento dessa relação é crucial para o estabelecimento de abordagens de controle.

O patossistema HLB (planta-patógeno-vetor-ambiente) ainda é muito pouco conhecido. O controle da doença em todo o mundo se dá por erradicação de plantas doentes e controle químico do vetor. A remoção de plantas sintomáticas deve ser feita a cada três meses, reduzindo ao máximo o potencial de inóculo na área. No entanto, o controle químico do vetor é imprescindível, uma vez que a erradicação nem sempre é eficiente e novos focos podem surgir.

Até o momento, não há nenhuma fonte de resistência que possa ser utilizada no controle desta doença, o que restringe, por ora, a utilização do controle genético. Apesar disso, abordagens de estudo de herança poderão trazer novas informações sobre a suscetibilidade diferencial entre genótipos de citros.

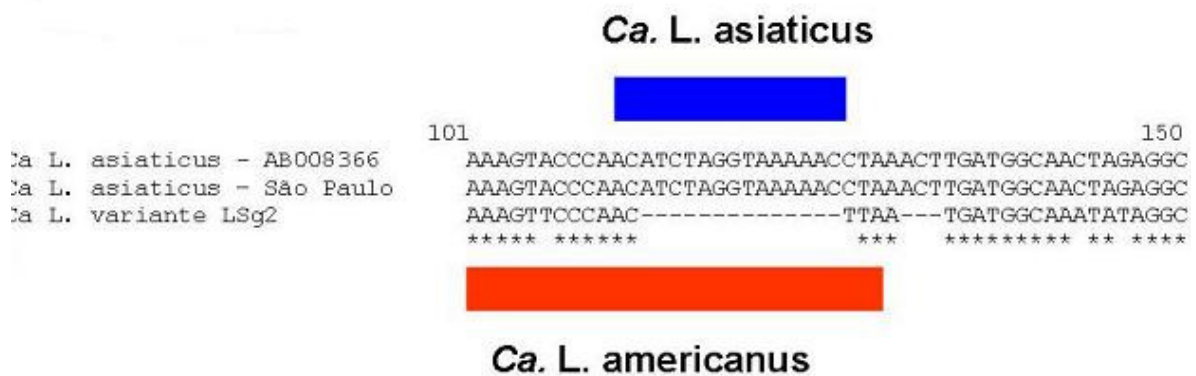
As Rutáceas são hospedeiras naturais das espécies de Liberibacter, com todas as espécies e cultivares de citros sendo suscetíveis à infecção (GARNIER *et al.*, 1984). As laranjas doces (*Citrus sinensis* L. Osb.), as tangerinas (*C. reticulata* Blanco), e híbridos de tangerinas são os mais severamente afetados. Os pomelos (*Citrus paradisi* Macfad.), laranjas azedas (*C. aurantium* L.), e limões (*C. limon* L.) são moderadamente afetados. A lima ácida Galego (*C. aurantifolia* Christm Swingle), as toranjas (*Citrus grandis* Osbeck) e os trifoliatas (*P. trifoliata* Raf.), incluindo seus híbridos, são considerados mais tolerantes. A Kumquat (*Fortunella* spp.) é também hospedeira.

Outras Rutáceas, também são hospedeiras da bactéria e possuem o psíldeo como vetor, tanto em observações em experimentos como naturalmente: *Severinia buxifolia*, *Balsamocitrus dawei*, *C. grandis*, *C. hystrix*, *C. jambhiri*, *Citrus x nobilis*, *Clausena indica*, *Cl. lansium*, *Microcitrus australisica*, *Triphasia trifolia*, *Atalantia missionis*, *Severinia buxifolia*, *Limonia acidissima* (= *Feronia limonia*), e *Swinglea glutinosa* (HUNG *et al.* 2000; HUNG *et al.*, 2004).

Em março de 2004, o HLB foi relatado no Estado de São Paulo (Coletta- Filho *et al.*, 2004) e a bactéria *Ca. L. asiaticus* estava presente em 4% das amostras avaliadas, enquanto a nova *Liberibacter*, *Ca. L. americanus*, era predominante. Desde 2006 ocorreu um aumento significativo da espécie asiática. O programa de controle dessa doença no Estado de São Paulo utiliza a técnica de PCR baseada na região 16S rDNA para confirmar a presença do patógeno, depois da análise visual. Praticamente, todas as folhas com sintomas de mosqueamento são positivas, porém muitas árvores não apresentam sintomas típicos. Outro problema é a distribuição irregular do patógeno, o que dificulta a detecção dessas bactérias (TEIXEIRA *et al.*, 2008). Esses autores investigaram a distribuição da *Ca. L. americanus*, nos diferentes ramos da laranja Westin, analisando a detecção por PCR convencional, “nested” PCR e PCR em tempo real (qPCR), utilizando “Syber Green”. Os resultados demonstraram que o qPCR é a técnica mais sensível, seguida pelo nested, já a PCR convencional é 1000 vezes menos sensível.

O uso da PCR em tempo real permite detecções mais sensíveis, e também a própria quantificação do patógeno (SCHAAD *et al.*, 2002). Além do ganho em sensibilidade e especificidade, o qPCR tem possibilitado o aumento de informações quanto à concentração de *Ca. Liberibacter* na amostra analisada.

Um método de qPCR para detecção de *Ca. Liberibacter* spp. foi desenvolvido baseado em um conjunto de “primers” e sistema “Taqman”, desenhados a partir da diferença de sequências de rDNA na região 16S entre *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus* (Figura 2). Estas sondas foram avaliadas “in silico” e através de reações utilizando amostras de citros sintomáticas ou não e apresentaram resultados seguros e altamente específicos (CARLOS *et al.*, 2006).



**Figura 2** - Regiões flaqueadas pelas sondas Taqman, que possuem a capacidade de distinguir os resultados entre as duas espécies (*Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus*).

LI *et al.* (2006) também desenvolveram um sistema “TaqMan” utilizando a região 16S rDNA, essa técnica mostrou-se rápida, confiável, específica, sensível e capaz de detectar a espécie asiática e americana.

O desenvolvimento e comparação de métodos de diagnóstico molecular foram realizados por WANG *et al.*, (2006). Esses autores estudaram a diferença de detecção da bactéria *C. Liberibacter asiaticus* pelo PCR convencional, sistema “TaqMan” e “Syber Green”. Esse último mostrou-se mais sensível, porém sua especificidade precisa ser confirmada pela curva de dissociação. O sistema “TaqMan” é um pouco menos sensível, mas apresenta uma especificidade superior e é consideravelmente mais rápido.

Um estudo combinou métodos tradicionais de PCR e qPCR para analisar a distribuição e circulação da bactéria *C. Liberibacter asiaticus* dentro de uma planta de citros, com o objetivo de compreender a sua virulência e o mecanismo de propagação da doença. Verificou-se a distribuição da bactéria em diferentes partes, a *Ca. Liberibacter asiaticus* foi detectada em todas as partes florais (pétalas, pistilos e estames) e nas frutas (pedúnculo, columela, e tegumento), exceto no endosperma e embrião. Uma concentração relativamente alta foi encontrada nos pedúnculos. Esses dados sugerem que a bactéria é transmitida sistemicamente pelo floema para diversas partes da planta (TATINENI *et al.*, 2008).

O PCR em tempo real também é utilizado na detecção da bactéria nos psilídeos. MANJUNATH *et al.* (2008) verificaram que é possível a detecção desse patógeno no vetor, vários anos antes do desenvolvimento de sintomas nas plantas. KAWABE *et al.* (2006) defendem o método de PCR competitivo para quantificar o patógeno do HLB, essa técnica é baseada na comparação da quantidade final de DNA amplificado de dois alvos, a sequência de interesse a ser quantificada e o competidor (DNA de concentração conhecida). Esses autores alegam que esse sistema tem duas vantagens sobre o método de PCR em tempo real. Primeiro, com a amplificação do DNA alvo e do concorrente na mesma reação, há menor risco de erro resultante das diferenças entre as eficiências na amplificação causada pelos inibidores, tais como compostos fenólicos e polissacarídeos. Em segundo lugar, os equipamentos e os produtos químicos necessários para esse novo método é mais barato e possui maior disponibilidade do que os utilizados em qPCR.

Novas seqüências genômicas da *Candidatus Liberibacter* foram obtidas, essa informação é útil para o desenvolvimento de métodos de diagnósticos mais específicos e maior conhecimento sobre patogenicidade da bactéria (LIN *et al.*, 2008). Em outro estudo, regiões genômicas foram clonadas para um melhor entendimento molecular da evolução dos genomas *Ca. Liberibacter* e taxonomia dessas bactérias (DODDAPANENI *et al.*, 2008).

### **2.3 Mapeamento genético**

Os primeiros mapas genéticos foram fundamentados em marcadores morfológicos e citológicos, principalmente nas culturas de milho, tomate e ervilha. No início da década de 60, as isoenzimas foram descobertas e passaram a ser usadas como marcadores bioquímicos, permitindo a construção de mapas genéticos em todas as espécies de planta. Como o número de locos detectados por esse tipo de marcador é baixo, é difícil obter uma ampla cobertura do genoma. A partir da década de 80, com o advento dos marcadores de DNA, mapas genéticos foram amplamente saturados (CARNEIRO & VIEIRA, 2002).

Os microssatélites ou SSRs são marcadores co-dominantes, multialélicos, altamente informativos, são baseados em PCR, reprodutíveis, com ampla cobertura do genoma e utilização na maior parte das culturas. A identificação e desenvolvimento de marcadores microssatélites têm permitido aumentar significativamente a densidade dos mapas de ligação obtidos com outros marcadores, além de possibilitar estudos de filogenia e evolução de diferentes espécies. Em girassol, por exemplo, têm sido



utilizados na integração de diferentes mapas genéticos previamente obtidos com marcadores RFLPs (YU *et al.*, 2003).

Outros exemplos são encontrados em maçã, onde os mapas são construídos utilizando marcadores AFLPs, SSRs, RAPDs e marcadores derivados de ESTs (IGARASHI *et al.*, 2008). Foram desenvolvidos 500 SSRs para o gênero *Cucurbita*, os quais apresentaram transferibilidade para espécies do mesmo gênero (GONG *et al.*, 2008). O primeiro estudo a desenvolver e caracterizar um grande número de marcadores SSRs desenvolvidos exclusivamente para a caracterização de laranja doce foi realizado por NOVELLI *et al.* (2006). Esses marcadores foram obtidos a partir de biblioteca genômica de citros, com o objetivo de avaliar a variabilidade intraespecífica para a identificação e caracterização da laranja doce, além de comparar os padrões de diversidade genética dos acessos. Quatro marcadores polimórficos foram capazes de distinguir os cultivares, sendo, portanto, útil para a certificação de variedades e identificação de plantas zigóticas.

Com o advento do sequenciamento de DNA em larga escala tem sido gerada uma grande quantidade de informações sobre seqüências em diversos organismos. HU & VICK (2003) desenvolveram uma técnica rápida e eficiente baseada em PCR, que utiliza ferramentas de bioinformática e dados de ESTs para gerar marcadores polimórficos ao redor de genes candidatos. Este polimorfismo de amplificação de regiões alvo (TRAP) utiliza dois “primers” de 18 nucleotídeos para gerar marcadores. Um dos “primers”, o “primer” fixo, é desenhado a partir de uma seqüência alvo do banco de dados. O segundo “primer”, o “primer” arbitrário, é uma seqüência arbitrária rica em AT ou GC para anelar com um “intron” ou “exon”, respectivamente. É realizada uma reação de amplificação e os fragmentos são separados em um gel de sequenciamento (poliacrilamida 6,5%). Essa técnica tem como alvo genes que governam características agrônômicas de interesse.

Essa técnica foi aplicada ao feijoeiro por MIKLAS *et al.* (2006), onde observaram que a técnica TRAP detecta inúmeros marcadores polimórficos que são reprodutíveis e hereditários, sendo tanto dominantes ou codominantes. A maioria desses marcadores mapeou próximo a regiões relacionadas à resistência a doenças.

HU *et al.* (2003) ressaltaram que essa técnica é útil para a genotipagem de coleções de germoplasma e genes responsáveis por características agrônômicas desejáveis em plantas cultiváveis. Esses autores, estudando uma hortaliça, verificaram que a técnica TRAP além de discriminar todas as cultivares, também revelou o

relacionamento evolutivo das espécies, sendo consistente com resultados anteriores obtidos por outras técnicas, como RFLPs (HU *et al.*, 2005).

A grande disponibilidade de marcadores altamente polimórficos, cuja herança não sofre influência ambiental, aliada aos procedimentos estatísticos complexos, tem permitido a construção de mapas de ligação para a maioria das espécies vegetais de interesse agrônômico, até mesmo para aquelas de longo ciclo de vida, como as florestais e as frutíferas.

Para se construir um mapa genético, algumas premissas são importantes, como a seleção apropriada da população, onde os genitores devem ser contrastantes, já que o número de marcas no mapa representa o número de caracteres contrastantes nos genitores. A determinação do tipo de cruzamento ( $F_2$ , retrocruzamento, etc) também é considerada uma etapa crítica, pois é necessário que os locos estejam em desequilíbrio de ligação. (TANKSLEY, 1993).

Outro ponto é o tipo de marcador genético, levando em consideração o número de locos que pode ser detectado, grau de polimorfismo entre e dentro de acessos e características de dominância (MALIEPAARD *et al.*, 1997; JOSHI *et al.*, 1999). É importante considerar o conteúdo informativo dos marcadores de natureza codominante (RFLPs e SSRs) em relação aos marcadores dominantes (RAPDs e AFLPs), além de aspectos como custo, tempo necessário para a realização das avaliações e dificuldades práticas inerentes à execução de cada técnica. Tanto o grau de cobertura do genoma como a densidade do mapa a serem construídos são funções diretas do número de marcadores, do tamanho populacional e do número de recombinantes.

Um padrão Mendeliano típico é esperado nos modelos probabilísticos, porém a ausência do padrão mendeliano é chamada distorção da segregação mendeliana, sendo causada, por exemplo, pelo efeito de amostragem ou viabilidade diferencial de gametas. Essa distorção da segregação é um fenômeno comum nas análises genômicas, um estudo realizado por XU (2008) demonstrou que essa distorção pode aumentar o poder estatístico dos mapeamentos de QTLs com efeitos aditivos e diminuir o poder em mapeamento de QTLs com efeitos dominantes.

O método mais importante e comum de mapeamento utiliza a frequência de recombinação para determinar a distância relativa entre duas características ligadas. O princípio do mapeamento genético é que a frequência de quiasmas entre dois genes ligados é de certa forma proporcional à distância física entre ambos. Uma unidade de centiMorgan equivale a aproximadamente 1% de recombinação quando os marcadores

estão bastante próximos, ou podem diferir da porcentagem de recombinação quando estão mais distantes em vista da ocorrência de “crossing-over” duplo, triplo, etc. Diversas funções de mapeamento têm sido utilizadas na correção das distâncias calculadas em porcentagem de recombinação para a distância em centiMorgan (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

Com base na frequência de recombinação é realizada uma análise para distribuição independente entre os locos segregantes para identificar pares de características ligadas. Após essa etapa, os marcadores ligados são combinados em grupos de ligação. A ordem linear dos marcadores dentro de cada grupo é deduzida da distância genética relativa a cada um em estimativas dois a dois (RITTER *et al.*, 1990).

Outros métodos utilizando estimativas de máxima verossimilhança da frequência de recombinação entre os marcadores e algoritmos de ordenação rápida de um grande número de marcadores têm sido empregados para a construção de mapas com maior precisão. Existem disponíveis diversos programas computacionais com base no método da máxima verossimilhança. Um exemplo é o JoinMap, o qual é baseado no LOD (logaritmo das probabilidades) modificado em função do teste de Qui-quadrado independente, permitindo, assim, a integração de marcadores de diferentes tipos de segregação em mapas genitores e a construção de mapas consensos.

O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares, pois são úteis às análises filogenéticas, e potencialmente, ao melhoramento de plantas. Diante desses avanços, procedimentos como a localização e o mapeamento de QTLs, estudos de sentença e clonagem de genes com base em mapas genéticos passaram a representar complementos importantes a serem considerados em programas de melhoramento.

Uma das aplicações mais importantes dos mapas genéticos é a localização de genes que controlam características de importância econômica, como produção de grãos, altura da planta, teor de proteína, resistência a doenças, as quais podem resultar da ação cumulativa de um conjunto de genes. Essas características são denominadas poligênicas, quantitativas ou de herança complexa, e os locos que as controlam são chamados de QTLs (TANKSLEY, 1993). O mapeamento de QTLs possibilita mensurar o número de locos quantitativos envolvidos na herança complexa, bem como suas localizações cromossômicas, modo de ação gênica (aditividade, dominância, heterose e epistasia), além de possibilitar a decomposição da interação genótipos por ambientes ao nível de cada QTL (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

Uma vez detectados os marcadores ligados a uma determinada característica de interesse, é possível selecionar os indivíduos com base na genotipagem do marcador, sem que haja a necessidade de avaliar o fenótipo da característica. Essa é uma das abordagens da seleção assistida por marcadores (SAM) (SOUZA *et al.*, 2001). É importante, principalmente, nos casos em que a característica de interesse é de avaliação difícil e cara, nos estudos de espécies perenes de ciclo longo, e para características fenotípicas de herdabilidade baixa, o que pode significar redução no tempo e nos custos de programas de melhoramento.

O mapeamento comparativo constitui outra importante aplicação dos mapas genéticos. A comparação das estruturas genômicas de diferentes espécies, do ponto de vista de homologia de genes e conservação de distâncias e da ordem de ligação nos cromossomos, permite melhor compreensão da evolução dos genomas. Outra utilização do mapeamento comparativo é como estratégia de obtenção de um mapa único de referência, pelo menos ao nível de famílias taxonômicas (CARNEIRO & VIEIRA, 2002).

A clonagem de genes é uma aplicação muito importante dos mapas genéticos, onde seu efeito e sua posição cromossômica são determinados pelo mapeamento, permitindo a identificação de marcadores próximos à região de interesse. Com o desenvolvimento dos chamados *projetos genoma*, é possível associar marcas mapeadas a genes, através do sequenciamento dos fragmentos mapeados, os quais servem como ponto de partida para a comparação com seqüências depositadas nos bancos, facilitando a identificação e clonagem desses genes. Além disso, os fragmentos mapeados em cada um dos grupos de ligação podem servir como sondas em ensaios de hibridação “in situ” contra metáfases mitóticas, possibilitando a atribuição dos grupos de ligação aos cromossomos das espécies em estudo.

### **2.3.1 Mapeamento genético de citros**

Embora os desafios na obtenção de progênies em cruzamentos dentro do gênero *Citrus* e entre gêneros próximos sejam consideráveis, existem várias fontes de resistência a fatores bióticos e abióticos que podem ser potencializadas na obtenção de indivíduos com características agronômicas e industriais desejáveis. Essa abordagem é particularmente importante quando a ela se agregam ferramentas que auxiliam na seleção de indivíduos zigóticos, na obtenção de marcadores, no mapeamento genético,

culminando com a seleção assistida por marcadores e a clonagem de genes baseada em mapeamento.

GUERRA (1993) ressalta que o gênero *Citrus* e correlatos têm características vantajosas que facilitam a construção de mapas genéticos, visto que são diplóides ( $2n = 9$ ), apresentam pequeno tamanho do genoma ( $2C = 0,62$  pg de DNA por núcleo ou aproximadamente 380 MB) e são altamente heterozigóticos, permitindo, a produção de híbridos inter-específicos e inter-genéricos. Os primeiros mapas de ligação de citros foram desenvolvidos com locos isoenzimáticos e RFLPs utilizando famílias de retrocruzamentos intergenérico de *Citrus* e *P. trifoliata*.

Em função do ciclo de reprodução e da perenidade de muitas espécies lenhosas de polinização aberta e altamente heterozigóticas, o mapeamento genético, mesmo com marcadores moleculares, ainda não está tão avançado quanto o de espécies anuais. A disponibilidade de progênies de cruzamentos entre diferentes espécies e variedades de *Citrus*, por exemplo, ainda é muito rara. Na maioria das vezes, somente progênies do cruzamento entre dois genitores, com certa heterozigosidade, encontram-se disponíveis para estruturação de mapas de ligação. Para superar problemas dessa natureza, GRATTAPAGLIA & SEDEROFF (1994) propuseram a utilização de uma estratégia denominada de “pseudo-testcross”, que permite a construção de mapas de ligação com base em progênie  $F_1$  de genitores altamente heterozigotos. Nessa abordagem, a configuração do cruzamento não precisa ser planejada “a priori”, como em um cruzamento teste clássico, mas pode ser inferida “a posteriori”, após a análise de segregação dos marcadores na progênie.

Como resultado do programa de melhoramento do Centro APTA Citros Sylvio, foram obtidos até o momento cerca de 1300 novas combinações de híbridos. Seis mapas de ligação genética foram desenvolvidos para os cruzamentos laranja doce cv Pêra e tangerina Cravo (OLIVEIRA *et al.*, 2004a, 2005), tangerina Sunki e *P. trifoliata* cv Rubidoux (CRISTOFANI *et al.*, 1999, 2000) e laranja doce cv Pêra e tangor Murcott (OLIVEIRA *et al.*, 2000). Regiões genômicas associadas às características quantitativas e qualitativas foram localizadas nestes mapas tais como: resistência/tolerância ao CTV, CVC, gomose de *Phytophthora*, leprose, mancha de alternaria e apomixia (CRISTOFANI *et al.*, 1999; SIVIERO *et al.*, 2006; BASTIANEL *et al.*, 2006).

Mapas de ligação genética foram construídos para as espécies *P. trifoliata* cv. Rubidoux e *C. sunki* usando marcadores moleculares RAPDs, explorando a estratégia de mapeamento “pseudo-testcross”. Além disso, foi determinado o loco de resistência a

CTV no grupo de ligação I do mapa de *P. trifoliata*. Porém, os mapas necessitam de mais saturação, pois 10 grupos de ligação foram encontrados para a espécie *C. Sunki* e 8 grupos para *P. trifoliata*. O comprimento total dos mapas foi 732,32 cM para *C. sunki* e 866,88 cM para *P. trifoliata*, uma vez que o tamanho do genoma de *Citrus* foi estimado entre 1.500 e 1.700 cM (JARREL et al., 1992), esse estudo cobriu entre 43,07 a 48,82% e 50,99 a 57,79% dos genomas de *C. sunki* e *P. trifoliata*, respectivamente (CRISTOFANI et al., 1999).

Essa mesma progênie F<sub>1</sub> derivada do cruzamento *P. trifoliata* cv. Rubidoux e *C. sunki* foi utilizada por SIVIERO et al. (2002), os quais detectaram um QTL associado ao número de frutos por planta e outro ao número de sementes por fruto no mapa de *P. trifoliata*. Um mapa genético integrado de *C. sinensis* (L.) Osbeck cv. 'Pêra' e *C. reticulata* Blanco cv. 'Cravo foi construído por OLIVEIRA et al. (2005).

A estratégia de clonagem baseada em mapa já vem sendo utilizada para genes de resistência de citros. O primeiro patossistema mapeado foi o gene *Ctv* (resistência à tristeza) a partir de *P. trifoliata*, tendo sido construídos mapas de alta resolução para o loco *Ctv* (DENG et al., 2001; YANG et al., 2003).

Em citros, pouco mais de 20 mapas genéticos foram desenvolvidos nos últimos anos por diferentes grupos de pesquisa no mundo inteiro, porém tem sido bastante difícil correlacionar e integrar os grupos de ligação identificados nesses mapas devido ao pequeno número de marcadores em comum (ROOSE et al., 2000; RUIZ & ASÍNS, 2003). Esta integração é essencial, pois deverá permitir o desenvolvimento de mapa de referência para um genótipo modelo, o qual deve incluir um conjunto de marcadores altamente polimórficos que podem ser mapeados em várias populações e, assim, permitir a comparação e combinação de mapas diferentes. Mapas genéticos desenvolvidos para genótipos modelos ou referência são importantes para facilitar o desenvolvimento de um mapa físico e, em última instância, obter a sequência completa do genoma da espécie. A existência de regiões sem a presença de um único marcador nesses mapas pode dificultar o posicionamento de marcadores polimórficos próximos a genes de interesse, assim como a identificação e clonagem de QTLs.

Um mapa comparativo entre *Citrus sinensis* e *P. trifoliata* foi construído utilizando marcadores EST-SSR. A maioria dos locos era heterozigoto para a laranja e homozigoto para *Poncirus*, fato que dificulta a cobertura de ambos os genomas equitativamente. Portanto, é necessário o desenvolvimento de mais EST-SSRs para que

um número maior de locos segregantes faça parte do mapa de *Poncirus* (CHEN *et al.*, 2008).

A construção e saturação de mapas de ligação com marcadores co-dominantes permitem a distinção entre genótipos homozigotos e heterozigotos, além da distribuição dos marcadores dentro do grupo. Estes marcadores podem ser usados como âncoras para combinar mapas de ligação obtidos em diferentes laboratórios ou com diferentes populações, gerando assim um mapa genético que melhor represente a estrutura e organização dos diferentes grupos de ligação (KIJAS *et al.*, 1997).

A utilização de microssatélites na construção e/ou integração de mapas genéticos em citros tem sido limitada devido à falta de um número suficiente de marcadores polimórficos disponíveis para esta finalidade. Embora tenham ajudado a aumentar a densidade em alguns dos mapas genéticos já obtidos (JARREL *et al.*, 1992; GARCÍA *et al.*, 1999), eles ainda não têm permitido obter níveis de saturação apropriados (CRISTOFANI *et al.*, 2000; KIJAS *et al.*, 1997; ROOSE *et al.*, 2000; RUIZ & ASÍNS, 2003).

Um trabalho que demonstrou a capacidade dos marcadores SSRs foi desenvolvido por KIJAS *et al.* (1995), mostrando que há grande variação de tamanho nos locos SSRs em espécies de citros. Neste trabalho foram avaliados acessos provenientes de um cruzamento intergenérico entre limão cravo (*Citrus limonia Osbeck*) e *P. trifoliata*. Dois locos SSRs foram analisados quanto à variação e herança alélica, a partir da amplificação e hibridização com a sonda TAA. Demonstrou-se com este estudo que todas as plantas da progênie avaliada apresentaram o SSR (TAA) indicando assim, que a região flanqueadora é conservada nos diferentes genomas testados.

Com o advento do sequenciamento em larga escala e os diferentes projetos genoma em execução, a disponibilidade de seqüências para diferentes organismos tornou-se uma das mais importantes fontes de marcadores moleculares. Atualmente, essas fontes estão sendo exploradas para o desenvolvimento de marcadores informativos, tais como microssatélites, polimorfismos de nucleotídeo simples ou SNPs (“Single Nucleotide Polymorphisms”) (BROOKS, 1999) e RGAs (“Resistance Gene Analogs”) (LOPEZ *et al.*, 2003), os quais são geralmente co-dominantes, podem ser dirigidos a áreas pouco saturadas do mapa e sua avaliação pode ser facilmente automatizada. Essas características fazem com que esses marcadores moleculares sejam ideais para a identificação de cultivares e híbridos de citros (NOVELLI *et al.*, 2006), a

saturação de mapas de ligação já existentes (CRISTOFANI *et al.*, 2000) e a localização e clonagem de genes de interesse (YANG *et al.*, 2003).

O Centro APTA Citros Sylvio Moreira gerou, através do Projeto Institutos do Milênio, mais de 300 mil ESTs (“Expressed Sequenced Tags”) (REIS *et al.*, 2007) a partir de cDNAs de diferentes genótipos tais como: laranja Azeda (*C. aurantium* L.), laranja Pêra (*C. sinensis* L. Osbeck), lima ácida Tahiti (*C. latifolia* Tan.), tangerina Poncan (*C. reticulata* Blanco), limão Galego (*C. aurantifolia* Christm Swingle), limão Cravo (*C. limonia* Osb.) e *P. trifoliata* (L.) Raf. A disponibilidade dessas informações representa uma valiosa fonte de marcadores tanto pelo seu uso direto como sondas para a hibridização (WU *et al.*, 2002) ou pelo desenvolvimento de marcadores do tipo microssatélites (PALMIERI *et al.*, 2007), marcadores baseados em SNPs (NOVELLI *et al.*, 2004) ou marcadores do tipo TRAPs (FARIA, 2007).

DONG *et al.* (2006) investigaram a frequência e a distribuição de SSR em *Citrus* e *P. trifoliata*, concluindo que as bases de dados de ESTs são eficientes para o desenvolvimento desses marcadores. Em trabalho semelhante, verificou-se que o banco de dados do CitEST é uma fonte valiosa para o rápido desenvolvimento de novos marcadores SSRs, altamente transferíveis para estudos de diversidade e mapeamento em espécies de citros e gêneros afins (PALMIERI *et al.*, 2007). Estes dados poderiam ser aplicados em programas como o melhoramento genético de citros, para a caracterização de germoplasma, triagem de sementes zigóticas e nucelares e desenvolvimento de marcadores para seleção assistida. Corroborando esse estudo, SHAHSAVAR *et al.* (2007) demonstraram que os marcadores SSRs são poderosas ferramentas para diferenciar indivíduos, o que contribui para o problema de identificação e classificação dos citros.

CHEN *et al.* (2006) desenvolveram 56 marcadores EST-SSRs a partir de 2.295 sequências ESTs para mapear uma família intergenérica F<sub>1</sub> de *C. sinensis* e *P. trifoliata*. Comparando os microssatélites gênicos e genômicos, VARSHNEY *et al.* (2005) verificaram que para uma avaliação de diversidade os SSRs genômicos são mais indicados, devido ao maior polimorfismo. A escolha do sistema mais adequado dependerá de muitos fatores, incluindo a disponibilidade de plataformas tecnológicas, custos do desenvolvimento do marcador, a transferibilidade entre espécies e informações de conteúdo e facilidade de documentação.

Segundo LURO *et al.* (2008), em citros os marcadores SSRs são desenvolvidos a partir de bibliotecas enriquecidas e frequentemente estão localizados em regiões não



codificantes do DNA. Para otimizar o uso dos marcadores EST-SSRs em programas de mapeamento e análises sistemáticas, esses autores investigaram o polimorfismo relacionado com o tipo (di ou trinucleotídeo) e sua posição nas sequências codificantes. Os autores concluíram que a seleção natural deve limitar o número e o polimorfismo dos SSRs nessas sequências. Com isso, sugeriram concentrar esforços em SSRs do tipo dinucleotídeo localizados nas regiões 5' UTR (região não traduzida), mais heterozigotas e polimórficas, para aumentar a eficiência no mapeamento, reduzindo, assim, o custo com a triagem desses marcadores.

## 2.4 Mapeamento de QTLs

A maioria das características de interesse agrônômico é controlada por locos quantitativos sendo que seu estudo permite a identificação, mapeamento e quantificação de seus efeitos. Vários fatores influenciam a detecção dessas regiões, como o número e a frequência de recombinação dos QTLs, magnitude dos seus efeitos, características de herdabilidade, interações entre genes e os tipos de marcadores e grau de saturação do mapa genético (TANKSLEY, 1993; YOUNG, 1996).

A associação entre o marcador e QTL pode ser avaliada utilizando análise de marcas simples que é fundamentada na comparação entre as médias das classes genotípicas dos marcadores, realizadas por teste t, regressão linear, análise de variância e razão de verossimilhança. O mapeamento por intervalo faz uso do método da máxima verossimilhança, que é baseado nas frequências conjuntas de um par de marcas adjacentes e um QTL pontual. O mapeamento por intervalo-composto emprega a combinação de mapeamento de intervalo simples e a regressão linear múltipla (SCHUSTER & CRUZ, 2004).

O mapeamento de QTLs tem favorecido programas de melhoramento de diversas espécies, como o arroz, onde foram mapeados 2 QTLs associados à tolerância ao frio no cromossomo 4 (SAITO *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2008). No Algodão, nove QTLs explicaram de 10-28% a variância fenotípica em relação a *Verticillium wilt*, uma das mais sérias limitações dessa cultura (YANG *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2007). Em citros, SIVIERO *et al.* (2006) detectaram QTLs associados à resistência a gomose de *P. parasitica* a partir de um cruzamento entre *C. sunki* e *P. trifoliata*. Três QTLs ligados à resistência a gomose foram detectados em *P. trifoliata* cv. Rubidoux e um QTL em *C. sunki*. Nessa mesma população foram detectados QTLs associados à produção de frutos e sementes (SIVIERO *et al.*, 2002).

Segundo CRISTOFANI *et al.* (2000), os marcadores multi-alélicos co-dominantes podem funcionar como âncoras entre os mapas dos genitores, permitindo a construção de mapas consenso ou o mapeamento comparativo, além de possibilitar uma maior robustez entre os mapas que compartilham estes marcadores nas mesmas posições.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Local de Experimentação

As atividades experimentais foram desenvolvidas no Centro APTA Citros 'Sylvio Moreira'/IAC, Cordeirópolis/SP.

### 3.2 Material Genético

Os indivíduos empregados no experimento fazem parte de uma população de 314 indivíduos F<sub>1</sub> obtidos do cruzamento entre os genitores *C. sunki* Hort. ex Tan e *P. trifoliata* Raf. cv Rubidoux, os quais foram utilizados em hibridação controlada como genitores feminino (suscetível ao HLB) e masculino (aparentemente com maior grau de tolerância ao HLB) segundo DA GRAÇA (1991), respectivamente. As plantas foram multiplicadas sobre limão Cravo. O bloco experimental é constituído de 94 híbridos zigóticos com quatro repetições. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação. Essa população tem sido também utilizada no mapeamento de outras características fenotípicas.

### 3.3 Marcadores Moleculares

#### 3.3.1 Extração do DNA Total

O DNA total foi extraído de folhas frescas de acordo com a metodologia descrita por MURRAY & THOMPSON (1980), com adaptações introduzidas por MACHADO *et al.*, 1996. Cerca de 2 g de folhas frescas foram lavadas e trituradas em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Em seguida, foram adicionados 700 µL de tampão de extração (1% CTAB; 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,7M NaCl; 2% sarcosil; 2% mercaptoetanol) e foram incubados à 60°C por 30 minutos. Após o resfriamento, foi adicionado ao extrato o mesmo volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), os tubos foram agitados por 3 minutos, em seguida, centrifugados por 8 min a 13.400 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e homogeneizado com o mesmo volume de CTAB 10% (10% CTAB; 0,7M NaCl), e clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), novamente centrifugado por 8 min a 13.400 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e à ele, adicionado igual volume de tampão de precipitação (1% CTAB; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10mM EDTA) misturado

gentilmente, permanecendo 30 min em repouso e, posteriormente, centrifugado por 5 min à 9.300 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimentado ("pellet") formado dissolvido em 80 µL de TE, com alta concentração de NaCl (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1M NaCl) à 65°C, até completa dissolução.

Posteriormente, após resfriamento, o DNA foi precipitado com 160 µL de etanol 100% e colocado a - 20°C por 12 horas. Posteriormente, foi centrifugado por 6 min à 9.300 g. O DNA obtido foi dissolvido em 80 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ contendo 10 µg/µl de RNase para a eliminação completa de contaminação por RNA.

### 3.3.2 Marcadores Microssatélites

Marcadores microssatélites foram amplificados utilizando-se pares de “primers” desenhados a partir de seqüências de microssatélites obtidas tanto do banco de dados do genoma citros (CitEST) como de bibliotecas de DNA genômico, previamente obtidas no laboratório. Foram testados 148 pares de “primers”, sendo 30 EST-SSRs e 118 genômicos. As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 25 µL contendo 50 ng de DNA, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase, tampão 10X (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 8 Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 1,0-2,0 mM, dNTP (0,2 mM) e 0,1 µM de cada “primer”.

A amplificação foi conduzida em termocicladores “MJ Research” programados para 30 ciclos de 94°C por 30s, 65-56°C por 30s e 72°C por 5s. A temperatura de anelamento se iniciou a 65°C, decrescendo até 0,3°C a cada ciclo seguido por três ciclos de anelamento a 56°C. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 3% com brometo de etídio (0,5 ng/ml) e fotografados sob luz ultravioleta. Todos os pares de “primers” SSR já haviam sido validados anteriormente (NOVELLI *et al.*, 2006; PALMIERI *et al.*, 2007).

Os marcadores encontrados foram classificados de acordo com os tipos de segregação para uma população CP (“Cross Pollinators”). Os códigos utilizados para a construção do arquivo mapa estão apresentados na tabela 1.

**Tabela 1.** Códigos utilizados para os tipos de segregação para uma população CP (“Cross Pollinators”) \*.

<b>Código</b>	<b>Descrição</b>
<abxcd>	loco heterozigoto em ambos os genitores, quatro alelos
<efxeg>	loco heterozigoto em ambos os genitores, três alelos
<hkxhk>	loco heterozigoto em ambos os genitores, dois alelos
<lmxll>	loco heterozigoto em um genitor
<nnxnp>	loco heterozigoto em outro genitor

\* códigos do programa JoinMap v 3.0 (VAN OOIJEN & VOORRIPS, 2001), de uma população caracterizada como “cross pollinators”, provenientes de genitores heterozigotos com fase de ligação dos locos originalmente desconhecida.

### 3.3.3 Marcadores TRAPs

Para o desenvolvimento dos marcadores TRAPs, o “primer” fixo (gene alvo) foi desenhado de um banco de dados de seqüência EST; o “primer” arbitrário (19 a 20 pb), possui em sua extremidade 3’, 3 a 4 nucleotídeos seletivos, 4 a 6 nucleotídeos no centro da seqüência (rica em AT ou em GC), intercalada por um “intron” ou “exon”, respectivamente LI & QUIROS (2001).

Os “primers” fixos foram obtidos a partir dos genes diferencialmente expressos detectados nos trabalhos com hibridação “in silico” de seqüências no CitEST (Citrus EST) de plantas de *P. trifoliata* infectadas ou não com o *Citrus tristeza virus* (CTV) e que codificam proteínas relacionadas à via de fenilpropanóides: Cinnamoyl-CoA reductase e Caffeic acid-O-Methyltransferase (CRISTOFANI *et al.*, 2007). Foram avaliadas 18 combinações de “primers”, sendo 3 fixos e 6 aleatórios (Tabela 2).

**Tabela 2-** Seqüências dos “primers” fixos e arbitrários utilizados para amplificar marcadores TRAPs nos híbridos de *C. sunki* e *P. trifoliata* .

“Primers”	ORFs	Nome do “Primer”	Seqüência (5’→3’)
“Primers” Fixos “Forward”	Cinnamoyl-CoA reductase	F1	GCCCGTGCTGCCTGATGATT
	Caffeic acid-O-Methyltransferase	F2	ACAGGGCCAAAGGTAAACACA
	Caffeic Acid O-Methyltransferase	F4	ACAGGGCCAAAGGTAAAC
“Primers” Arbitrários “Reverse” *		P1	GACTGCGTACGAATTAAT
		P2	GACTGCGTACGAATTTGC
		P3	GACTGCGTACGAATTGAC
		P4	GACTGCGTACGAATTTGA
		P5	GACTGCGTACGAATTAAC
		P6	GACTGCGTACGAATTGCA

\*De acordo com LI & QUIROS (2001).

As reações de amplificação foram conduzidas a um volume final de 25 µL com os seguintes componentes: 2 µL da amostra de DNA (30-50 ng), 1,5 µL do tampão de reação 10 X (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 8 Invitrogen), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de mix de dNTPs (20 mM), 10 nmol dos “primers” arbitrários e 10 nmol dos “primers” fixos e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase. 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, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 s, 50°C por 45 s, e 72°C por 1 min e um passo de extensão a 72°C por 7 min. Após a reação de amplificação, foi realizado a concentração do DNA, da seguinte maneira: adicionou-se 80 µL de isopropanol 95% por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foi centrifugado a 4500 rpm por 45 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µL de etanol 65% e a mistura foi centrifugada a 4500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado, e o “pellet” foi ressuspensionado em 4 µL de tampão da amostra 5X [0,313 M Tris-HCl (pH 6,8)] a 25°C, 10% SDS, 0,05% azul de bromofenol, 50% glicerol. Uma alíquota de 3 µL foi aplicada no gel de sequenciamento (poliacrilamida 6,5%). A eletroforese foi conduzida a 1500 V por 3,5 h em cuba vertical

para eletroforese de ácidos nucleicos (“Sequi-Gen System” Bio Rad), o gel foi corado com prata (CRESTE *et al.*, 2001).

O polimorfismo entre os genótipos foi estimado loco a loco por meio da presença ou ausência de bandas amplificadas por PCR com o auxílio do marcador 1Kb “Plus DNA Ladder” (Gibco) para estimar o tamanho dos fragmentos. Os marcadores TRAPs de boa intensidade e reprodutibilidade foram analisados quanto à segregação mendeliana esperada (1:1 ou 3:1) nos 94 indivíduos da progênie. Esse marcador é analisado loco a loco.

### **3.4 Construção dos Mapas de Ligação**

Mapas de ligação previamente construídos para estes mesmos genitores, *C. sunki* Hort. ex Tan e *P. trifoliata* Raf. cv Rubidoux, que visaram a localização de genes de resistência ao vírus da tristeza (CTV) (CRISTOFANI *et al.*, 1999) e mapeamento de QTLs envolvidos na resistência a gomose de *Phytophthora* (SIVIERO *et al.*, 2006) foram empregados no presente trabalho. Os mapas já estavam estabelecidos com marcadores RAPD e AFLP.

Os marcadores SSRs e TRAPs foram integrados aos mapas de ligação utilizando o programa JoinMap v 3.0 (VAN OOIJEN & VOORRIPS, 2001). Este programa permite análise conjunta de marcadores segregando nas proporções 1:1, 3:1, 1:2:1 e 1:1:1:1. De acordo com as instruções contidas no programa, a população foi caracterizada como CP (“Cross Pollinators”) proveniente de genitores heterozigotos com fase de ligação dos locos originalmente desconhecida. Os grupos de ligação foram formados e ordenados utilizando-se LOD 3,0 e máximo de 40% de recombinação. As frequências de recombinação, estimadas em análises multiponto foram convertidas em distância genética (centiMorgans) através da função de Kosambi. O teste *qui-quadrado* [ $\chi^2$  ( $p \leq 0,05$ , GL=1)] (STELL & TORRIE, 1980) foi utilizado para testar as hipóteses de segregação Mendeliana 1:1 e 1:1:1:1 para cada um dos marcadores SSR e TRAP.

### **3.5 Infecção do material vegetal**

Ao atingirem seis meses após a enxertia em limão Cravo, as plantas híbridas foram sobre-enxertadas com duas borbulhas provenientes de plantas infectadas com *Ca. Liberibacter asiaticus*. A fonte de inóculo foi obtida a partir de ramos sintomáticos de laranja Pêra e a infecção pela espécie asiática foi confirmada através da técnica de PCR

convencional. Todos os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, com fotoperíodo natural e temperatura ambiente  $\pm 3^{\circ}\text{C}$  (LOPES *et al.*, 2009).

### 3.6 Detecção e quantificação da bactéria por PCR quantitativo (qPCR)

Para a determinação do ponto ideal da análise dos resultados nos híbridos, realizou-se um experimento preliminar de qPCR com os genitores. Folhas jovens e maduras situadas acima e abaixo da enxertia de seis repetições de cada genitor foram coletadas e foi extraído o DNA, após 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 dias da enxertia com borbulhas contaminadas com *Ca. Liberibacter asiaticus*. Nos híbridos, a coleta foi realizada aos 240 dias após a inoculação, pois nessa data era possível visualizar a diferença de concentração da bactéria nos parentais.

A quantificação de bactéria foi realizada a partir de amostras de DNA total das plantas infectadas com o patógeno. O método de extração de DNA utilizado foi baseado no trabalho de MURRAY & THOMPSON (1980).

A curva padrão do alvo se baseou nas concentrações conhecidas do fragmento de rDNA 16S de *Ca. Liberibacter asiaticus* clonado (plasmídeo pGEM contendo um inserto de 1200 pb). Para a normalização dos dados, uma curva baseada em DNA de planta sadia (18S rDNA) foi construída. Dessa maneira, as curvas foram estabelecidas relacionando-se as concentrações conhecidas de DNA com os respectivos valores do limiar de fluorescência (Ct- “threshold” “cycle”) para cada diluição.

As análises de qPCR foram realizadas no “ABI PRISM 7500 Sequence Detection System” (“Applied Biosystem”) através do sistema “TaqMan”. As sondas desenvolvidas são referentes a uma região conservada do DNA ribossomal 16S, capaz de diferenciar a forma asiática de *Ca. Liberibacter* (CARLOS *et al.*, 2006). A seqüência da sonda utilizada foi: 6-NEDACATCTAGGTAAAAACCMGBNFQ (var. asiaticus). Os iniciadores para *Ca. Liberibacter asiaticus* (Lsg1-AS-84F 5' TCACCGGCAGTC CCTATAAAGT 3' e Lsg1-AS-180R 5' GGGTTAAGTCCCGCAACGA) foram usados nas reações de qPCR (CARLOS *et al.*, 2006).

As reações de amplificação seguiram o protocolo convencional da “Applied Biosystems”, que consiste em uma pré-ativação a  $50^{\circ}\text{C}$  por 2 min e  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 min, seguidos de 40 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 s,  $60^{\circ}\text{C}$  por 1 min, com um volume final de reação de 20  $\mu\text{l}$ . Todas as amostras foram analisadas em duplicatas e em cada placa, também foram realizadas reações com o controle negativo (planta sadia), com o controle positivo (planta doente), com água estéril, amostras contendo concentrações conhecidas



do fragmento de rDNA 16S clonado para a construção da curva padrão e amostras de plantas sadias de concentrações conhecida para a construção da curva do 18S rDNA.

A quantificação das amostras foi realizada com base em uma curva-padrão obtida através de diluições em série na base 10 do plasmídeo contendo a região de rDNA 16S de *Ca Liberibacter*. A fórmula utilizada para calcular o número de cópias (CN) foi baseada no trabalho de WANG *et al.* (2006):  $CN=(M \times N)/(L \times D)$ , onde M= concentração mínima de ácido nucléico detectada ( $\text{gml}^{-1}$ ); N= número de Avogrado ( $6,022 \times 10^{23}$  moléculas/mol); L= tamanho do ácido nucléico em kpb; e D= fator de conversão de 1kpb de ácido nucléico para Daltons ( $\text{dsDNA}= 6,6 \times 10^{-5}$  g /mol Kbp). Foram consideradas as três cópias do operon 16S no genoma da bactéria.

### **3.7 Análise estatística**

Histogramas de distribuição de médias, análise de variância e teste de comparação de médias (Scott–Knott) a 5% de propabilidade foram realizados utilizando o programa SISVAR – Sistema de análise de variância v 5.0 (FERREIRA, 2000) para os resultados expressos em valores de Ct, delta Ct (diferença entre o Ct do alvo e do normalizador) e número de cópias da molécula 16S rDNA. O programa SELEGEN – REML/BLUP (RESENDE, 2002) foi utilizado para calcular os parâmetros genéticos (herdabilidade, variância, coeficiente de variação) para todas as variáveis mensuradas.

Os dados, também, foram explorados através da análise relativa, a qual utiliza os valores do Cts das amostras para compará-los ao Ct do calibrador (amostra referência). Assim, o calibrador se torna a amostra 1X e todas as outras quantidades são expressas como uma diferença de n vezes em relação ao calibrador. O calibrador utilizado na análise foi a amostra que apresentou um Ct igual a 40, ou seja, não ocorreu detecção da bactéria. Para esta análise foi utilizado o Programa REST (“Relative Expression Software Tool”) v 2.0.7 (PFALL *et al.*, 2002).

### **3.8 Avaliação de sintomas de HLB**

Foi realizada uma análise visual da evolução de sintomas foliares, representado pelo desenvolvimento de clorose e mosqueamento foliar ou alguma anormalidade identificada.

### 3.9 Identificação de QTLs

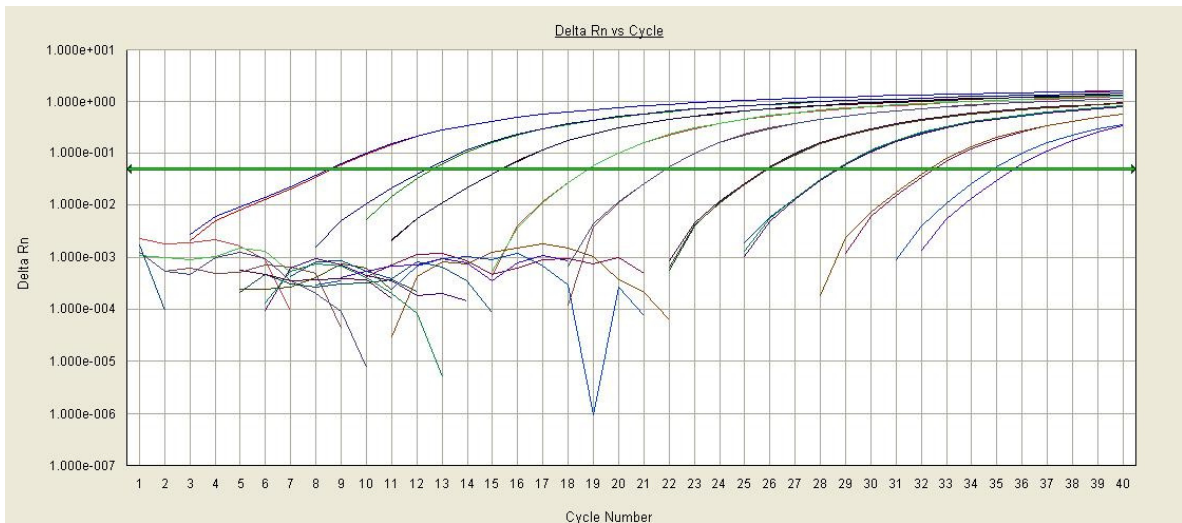
Os dados fenotípicos, como o número de cópias da molécula 16S rDNA bacteriano, valores de Ct (ciclo “threshold”) e valores de delta Ct (o qual é estimado pela diferença entre o Ct do alvo e do normalizador) utilizados foram obtidos através das médias aritméticas dos clones. Para a detecção e mapeamento de QTLs na população derivada de *C. sunki* x *P. trifoliata*, foram realizadas análises através do programa MapQTL v. 4.0 (VAN OOIJEM *et al.*, 2002), utilizando-se os testes paramétricos “Interval Mapping” (IM) e “Multiple QTL Mapping” (MQM). 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 módulo MQM foi então utilizado para detectar possíveis QTLs mascarados pelos QTLs identificados pelo IM. Através da estratégia MQM recorre-se ao uso dos marcadores que flanqueiam os QTLs identificados pelo IM como co-fatores, através da opção “automatic cofactor selection” do aplicativo. O LOD (logaritmo das probabilidades) crítico de cada QTL foi calculado usando-se o teste de permutação randômica (1000 repetições) (CHURCHILL & DODGE, 1994) disponível no MapQTL.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

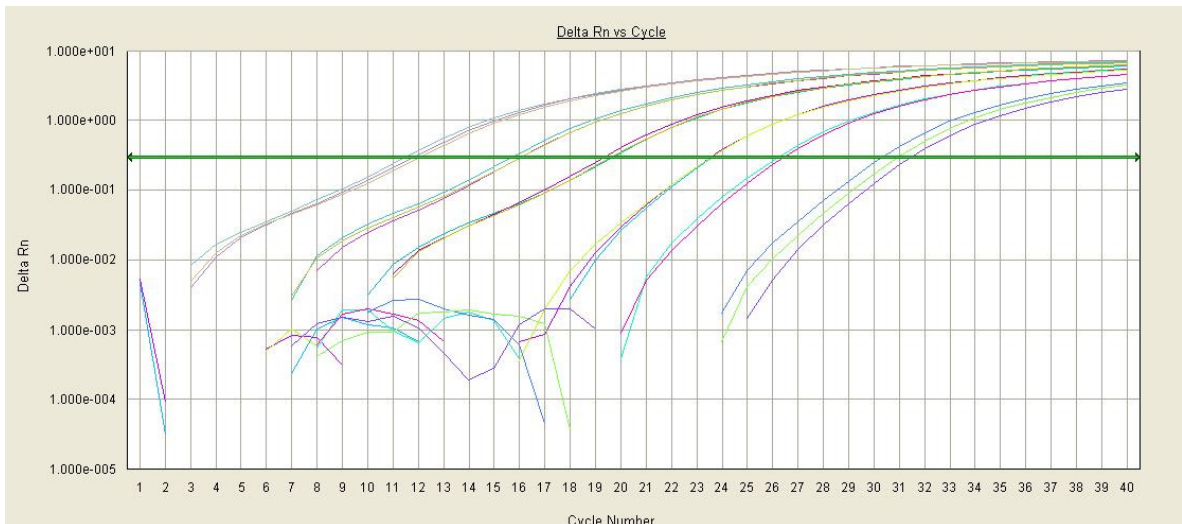
### 4.1 Curva Padrão para qPCR de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

A curva padrão para determinação do título da bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus* foi necessária para estimar do número de cópias da molécula 16S rDNA bacteriano nas amostras, e foi obtida a partir dos valores do Ct das diluições da solução de DNA plasmidial com o inserto 16S rDNA em concentrações conhecidas.

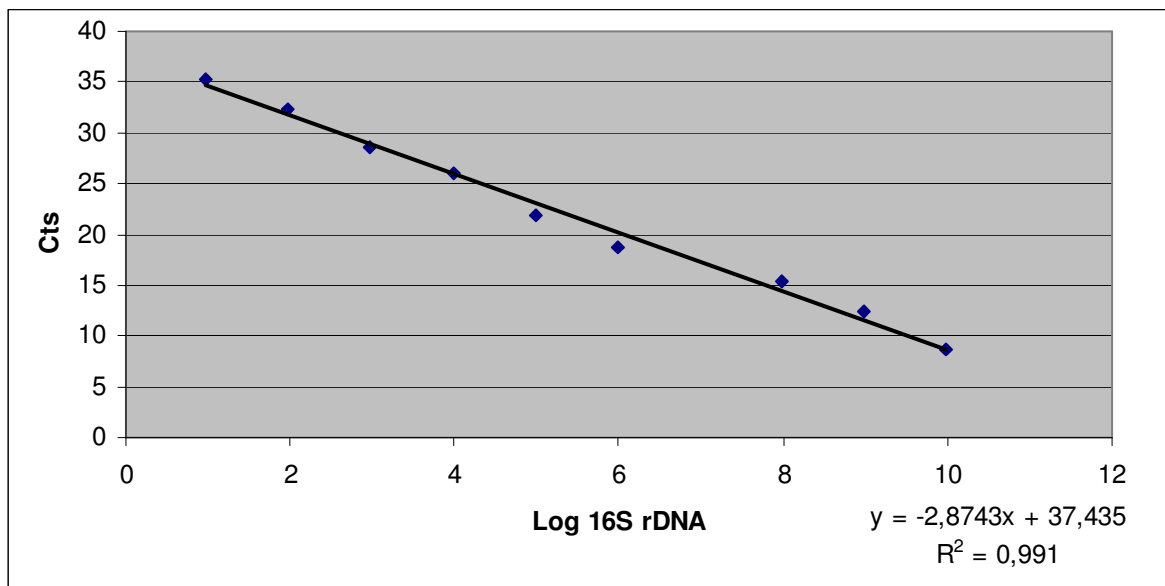
A partir das curvas de amplificação (Figura 3) da diluição serial do DNA plasmidial (11 a  $1,1 \times 10^{-7}$  ng), alguns pontos foram escolhidos para a curva padrão e foram utilizados em todas as determinações por qPCR ( $11$ ;  $1,1 \times 10^{-1}$ ;  $1,1 \times 10^{-3}$ ;  $1,1 \times 10^{-5}$ ;  $1,1 \times 10^{-6}$  ng). DNA de planta sadia foi utilizado para amplificação do gene 18S rDNA e normalização dos dados (Figura 4). De acordo com CHRISTENDEN *et al.* (2004) a normalização é feita dividindo os valores encontrados na curva 16S pelos valores da curva 18S. Tanto para o 16S como 18S, curvas lineares significativas foram obtidas entre a quantidade de DNA e o valor de CT para cada diluição (Figuras 5 e 6). As equações de regressão foram:  $y: -2,87x + 37,43$  ( $r^2 = 0,991$ ) e  $y: -2,96x + 43,65$  ( $r^2 = 0,9861$ ) para o 16S e 18S, respectivamente, onde y é o Ct avaliado e x é log da quantidade de DNA para cada diluição. O Ct máximo para a curva 16S foi de aproximadamente 35, similar ao encontrado por LI *et al.* (2006).



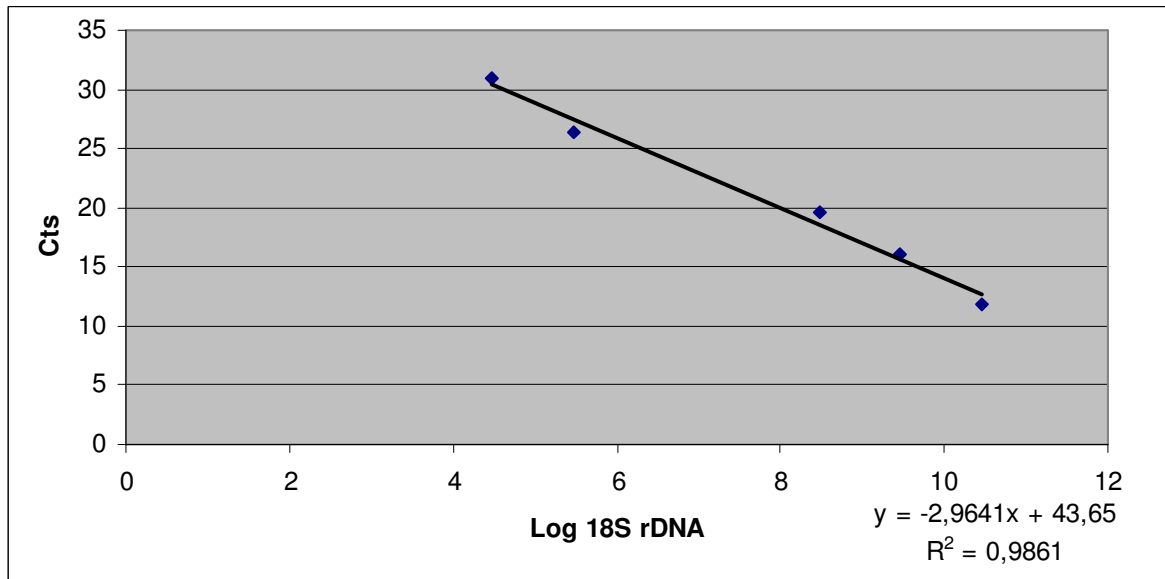
**Figura 3-** PCR quantitativo- Curva de amplificação: diluições seriais ( $11$ ;  $1,1 \times 10^{-1}$ ;  $1,1 \times 10^{-3}$ ;  $1,1 \times 10^{-5}$ ;  $1,1 \times 10^{-6}$  ng) do DNA plasmidial contendo o inserto 16S rDNA da bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus*.



**Figura 4-** PCR quantitativo- Curva de amplificação: diluições seriais ( $34$ ;  $3,4$ ;  $3,4 \times 10^{-1}$ ;  $3,4 \times 10^{-2}$ ;  $3,4 \times 10^{-4}$ ;  $3,4 \times 10^{-5}$  ng) do DNA de uma planta sadia com amplificação de 18S rDNA.



**Figura 5-** PCR quantitativo- Curva padrão para determinação do número de cópias de 16S rDNA da bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus*.



**Figura 6-** PCR quantitativo- Curva padrão para a determinação do gene 18S rDNA em planta sadia.

A técnica de PCR quantitativo monitora a fluorescência emitida durante a reação como um indicador da produção de amplificado em cada ciclo. Logo, quanto maior a quantidade inicial da amostra “template”, mais rápido será observado o aumento significativo na fluorescência. Isso é refletido nos valores de Cts, número do ciclo onde a fluorescência ultrapassa o limiar de detecção. Valores menores de Cts indicam uma maior quantidade de alvo. Portanto, nesse estudo utilizamos o valor do Ct como parâmetro de quantificação, além do número de cópias do fragmento alvo, o qual foi estimado pela análise absoluta através da curva padrão.

#### 4.2 Quantificação da *Liberibacter* nos genitores (*C. sunki* e *P. trifoliata*)

Os resultados obtidos por qPCR indicam que existe diferença na multiplicação da bactéria nas duas espécies estudadas. Na tangerina Sunki foi possível a detecção de *Ca. Liberibacter asiaticus* a partir de 180 dias, em cinco das seis repetições biológicas. No entanto, em *P. trifoliata*, a detecção ocorreu somente aos 240 dias após a inoculação (Tabela 3).

Ao final dos 360 dias verificou-se que a taxa de infecção foi maior em tangerina Sunki, onde as seis repetições biológicas apresentaram-se infectadas e o número médio de cópias da molécula 16S rDNA foi de  $5,0853 \times 10^4$ . Já em *Poncirus*, apenas uma repetição mostrou-se positiva e a média de cópias foi de  $4,7872 \times 10^2$ . Esses dados parecem corroborar com a literatura, mostrando uma maior tolerância dos trifoliatas (*P. trifoliata* Raf.) quando comparados aos citros (DA GRAÇA, 1991).

Os resultados encontrados podem estar relacionados a um possível atraso na infecção e multiplicação da bactéria nos trifoliatas, o que indicaria que essa espécie é mais tolerante à bactéria do HLB do que as tangerinas. Outra hipótese seria também o efeito residual da presença da bactéria na borbulha original que não foi retirada posteriormente, ou seja, a detecção nessa repetição pode ser atribuída à fonte de inóculo.

O padrão do número de cópias da molécula 16S rDNA ao longo dos meses em ambos os genitores (Figura 7), demonstra que em *P. trifoliata* ocorreu um aumento do número de cópias no inverno, isso pode estar associado ao fato de que o *Poncirus* possui um período de dormência e queda das folhas no outono/inverno (temperaturas amenas e menor fotoperíodo) (STATHAKOPOULOS & ERICKSON, 1966). É possível que a queda no metabolismo do trifoliata diminua sua resistência ao HLB e desta maneira,

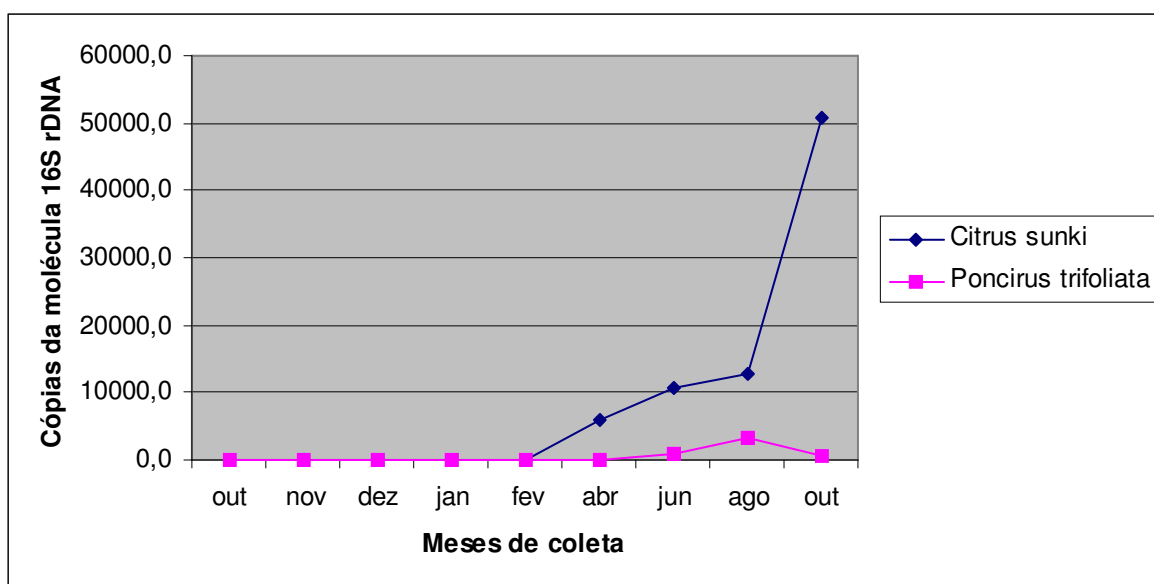
ocorra uma maior multiplicação da bactéria. Quando a planta volta ao metabolismo normal (set/out), o título da bactéria volta a diminuir. Essa hipótese será confirmada através da avaliação da população bacteriana nos genitores por mais um ano. Já, na tangerina Sunki, observou-se que a taxa de multiplicação da bactéria é sempre crescente. (Tabela 3 e Figura 7).

De acordo com WANG *et al.* (2006), a avaliação da população do patógeno que causa o HLB com a técnica de PCR não só mostrou sua dinâmica de variação com as diferentes estações do ano, mas propiciou também sugestões para o manejo integrado da doença em condições de campo. Segundo os autores, o título de *Ca. L. asiaticus* foi maior entre outubro e dezembro (Ct médio de 29,3, número de células=  $3,35 \times 10^7$ ) e menor entre os meses de março a maio (Ct médio de 32, número de células =  $5,10 \times 10^6$ ) em condições de campo na região sudoeste da China.

GASPAROTO *et al.* (2008), estudando a influência da temperatura na taxa de infecção causada pelo patógeno do HLB sob ambiente controlado, verificaram que temperaturas amenas são favoráveis ao desenvolvimento de sintomas e ao crescimento da população de bactérias para *Ca. Liberibacter americanus*, contrariamente, altas temperaturas não afetaram a infecção por *Ca. Liberibacter asiaticus*, a qual apresentou taxas semelhantes de infecção em temperaturas variando de 17 a 32°C.

**Tabela 3-** Taxa de infecção (\*) e média número de cópias da molécula 16S rDNA (\*\*) de *Ca. Liberibacter asiaticus* nas espécies *C. sunki* e *P. trifoliata*.

TEMPO (dias após a inoculação)	<i>Citrus sunki</i>	<i>Poncirus trifoliata</i>
15	0/6*	0/6*
	0	0
30	0/6*	0/6*
	0	0
60	0/6*	0/6*
	0	0
90	0/6*	0/6*
	0	0
120	0/6*	0/6*
	0**	0
180	5/6*	0/6*
	4883,5**	0
240	6/6*	1/6*
	10798,0**	827,49**
300	6/6*	1/6*
	12663,0**	3308,20**
360	6/6*	1/6*
	50853,6**	478,72**



**Figura 7-** Número de cópias da molécula 16S rDNA ao longo dos meses de coleta.

Outro parâmetro analisado foi à variação dos Cts nas nove datas de coleta (Tabela 4). O limite de detecção baseado na curva padrão foi de aproximadamente 10 cópias (valor Ct  $\cong$  34). Valores de Cts maiores que 34 são clara indicação que não ocorreu detecção da bactéria naquelas plantas, seja por seu baixíssimo título ou porque efetivamente ela não se multiplicou. Para a espécie *P. trifoliata* foi feita a média do Cts, sendo que cinco repetições biológicas apresentaram Ct igual a 40 e apenas uma repetição apresentou Ct igual a 25.

**Tabela 4-** Valores médios dos Cts de amplificação da bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus* nas espécies *C. sunki* e *P. trifoliata* nos diferentes tempos de coleta.

Dias após inoculação	Sunki*	Trifoliata*
15	40	40
30	40	40
60	40	40
90	40	40
120	37,40a	40b
180	26,35a	40b
240	21,60a	37,52b
300	24,21a	37,16b
360	22,43a	37,63b

\*Médias dos Cts das repetições biológicas: médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferiram significativamente pelo teste de Scott - Knott ao nível de 5%.



### 4.3 Quantificação da *Ca. Liberibacter asiaticus* na progênie

O número de cópias estimadas de 16S rDNA bacteriano nos híbridos da progênie variou de 0,10 a 330.376,27 cópias da molécula/ng de DNA total, após 240 dias da inoculação. Análise de variância (programa SISVAR) foi realizada para o número de cópias da molécula 16S rDNA (ANEXO 1), valores dos Cts (ANEXO 2) e valores do delta Ct (ANEXO 3). Os dados também foram analisados através do programa REST, que utiliza dados do Ct para fazer comparação relativa. Foram consideradas somente três repetições biológicas das quatro originais no experimento, devido à morte de uma das plantas das repetições de alguns híbridos.

Observou-se que coeficiente de variação para o parâmetro número de cópias foi extremamente elevado. No entanto, isso pode ser explicado por fatores como ausência de controle do título inicial da bactéria nas borbulhas utilizadas como fonte de inóculo. A isso agrava-se o fato da bactéria já apresentar normalmente uma distribuição extremamente irregular dentro da planta. Portanto, existe uma grande fonte de variação entre as repetições biológicas. Estudo realizado por TATINENI *et al.* (2008) demonstrou que a população de *Ca. Liberibacter asiaticus* variou de 14 a 137,03 células/ $\mu$ g de DNA total em diferentes órgãos da planta. A maior concentração foi encontrada no pedúnculo de frutos.

TEIXEIRA *et al.* (2008), também detectaram uma distribuição desigual da população bacteriana na planta. Folhas sintomáticas com alto título de bactérias ( $1,1 \times 10^6$  a  $2,8 \times 10^7$  liberibacters/grama de tecido) estavam próximas de folhas não infectadas. As folhas assintomáticas apresentaram uma concentração variando de  $2,3 \times 10^3$  a  $2 \times 10^6$  Liberibacters/g. Na extremidade proximal dos ramos (próximo ao tronco), também observou-se um título mais baixo decorrente da menor multiplicação das bactérias ou da lenta invasão dos vetores nessa região. Logo, a sensibilidade da técnica e o tipo de folha selecionado para análise afetam diretamente os resultados, devido à distribuição desigual da *Ca. Liberibacter asiaticus*.

Como o resultado da ANOVA apresentou diferença significativa, foi possível estabelecer um teste de comparação de médias utilizando a estatística de Scott-Knott ao nível de 5%. Dessa maneira, foi possível diferenciar três grupos, utilizando-se as análises do número de cópias da molécula 16S rDNA e Ct. No entanto, quando se avalia por delta Ct quatro grupos distintos podem ser observados (ANEXOS 1, 2 e 3).

Na análise relativa, utilizando o Programa REST, o calibrador, ou seja, a amostra usada para fazer a comparação com os híbridos foi a que apresentou maior Ct, neste caso, 40, ou seja, não ocorreu detecção da bactéria. Os valores de Ct nos híbridos variaram de 2,7 a 171.607,3 vezes mais que a amostra calibradora.

Estimativas de parâmetros genéticos foram obtidas para o número de cópias da molécula 16S rDNA, valores de Ct e delta Ct (Tabela 5).

**Tabela 5-** Estimativas de parâmetros genéticos obtidas para as variáveis número de cópias da molécula 16S rDNA, valores do Ct e delta Ct em uma progênie de 94 indivíduos do cruzamento entre *C. sunki* vs *P. trifoliata*.

Variável	$h^2_g$	$h^2_{mc}$	Acclon	CVgi (%)	CVe (%)	$CV_g / CV_e$	Média
Cópias 16S rDNA	0,38	0,65	0,80	174,96	221,18	0,79	30667,69
Ct	0,42	0,69	0,83	12,53	14,46	0,86	30,34
Delta Ct	0,71	0,88	0,94	30,65	19,19	1,59	21,36

Legenda:  $h^2_g$  herdabilidade individual no sentido amplo, ou seja, efeitos genotípicos;  $h^2_{mc}$  : herdabilidade média; Acclon: acurácia da seleção; CVgi(%): coeficiente de variação genotípica em porcentagem; CVe(%): coeficiente de variação ambiental em porcentagem; Média: média geral do experimento.

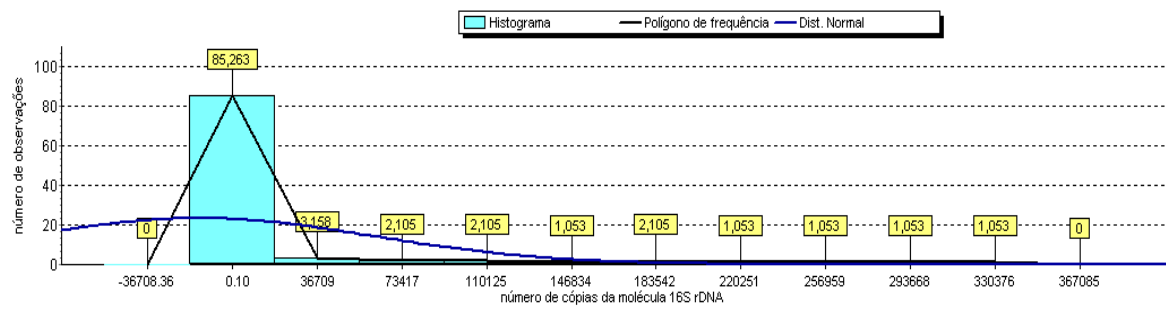
Os coeficientes de herdabilidade individual no sentido amplo ( $h^2_g$ ) para todas as variáveis estudadas variaram de 0,38 a 0,71. A variabilidade genotípica, expressa pelo coeficiente de variação genotípica (CVgi) foi alta apenas para o número de cópias da molécula 16S rDNA. A precisão experimental, inferida pelo coeficiente de variação experimental em associação com o coeficiente de variação genotípica, por meio da razão  $CV_g / CV_e$  (VENCOVSKY, 1987), variou de 0,79 a 1,59. A alta precisão experimental ( $CV_g / CV_e \geq 1$ ) e a alta acurácia na avaliação fenotípica ( $Acclon > 0,85$ ) observados para as características Ct e Delta Ct indicam que o próprio fenótipo é um bom indicador do valor genotípico dos indivíduos (VENCOVSKY, 1987; RESENDE, 1995).

A herdabilidade em nível de média de clone ( $h^2_{mc}$ ) foi moderada para as variáveis. A acurácia na avaliação genotípica (Acclon), que se refere à correlação entre o valor genotípico verdadeiro e aquele predito pelo método estatístico (“Best Linear Unbiased Predictor”- BLUP), foi alta para todas as características. Segundo RESENDE (2002) valores de acurácia superiores a 0,85 propiciam uma alta eficiência seletiva e de

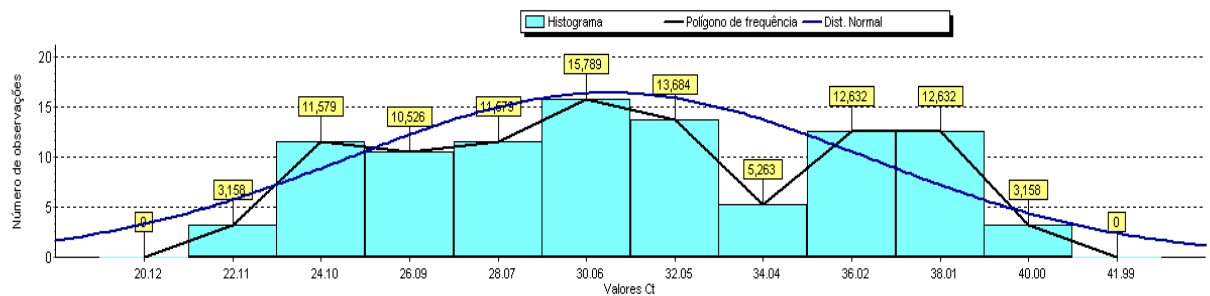
mapeamento. A herdabilidade individual no sentido amplo foi menor para todas as formas de avaliação, indicando a importância da utilização da repetição para reduzir a variação ambiental.

A herdabilidade de uma característica depende de vários fatores: da população de referência, da forma como o fenótipo é mensurado, das condições ambientais em que os genótipos foram selecionados e da unidade experimental (plantas únicas, média de genótipos replicados ou médias de famílias). É possível que a herdabilidade estudada no presente trabalho, possa ser influenciada pela natureza interespecífica dos genitores. Segundo JIN *et al.* (2008), a hibridação interespecífica pode estar envolvida em alterações genéticas e epigenéticas.

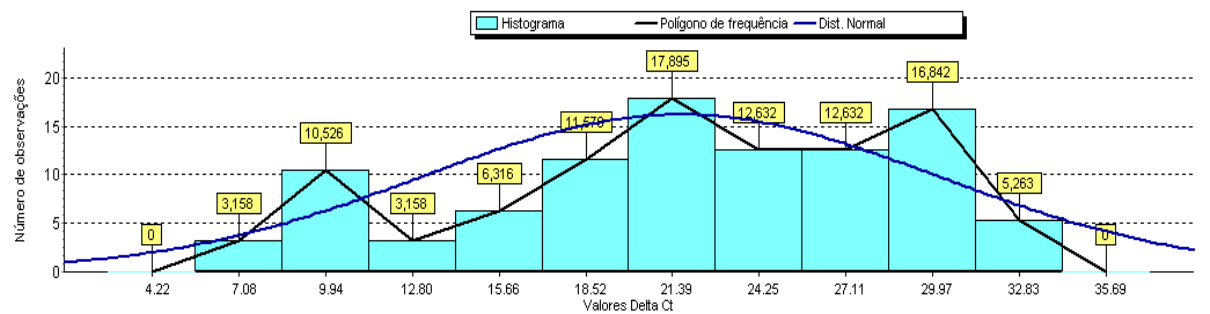
As frequências de distribuição das médias para os valores do Ct e delta Ct (Figura 8) ajustam-se a uma distribuição normal, exceto para o número de cópias da molécula 16S rDNA.



**A**



**B**



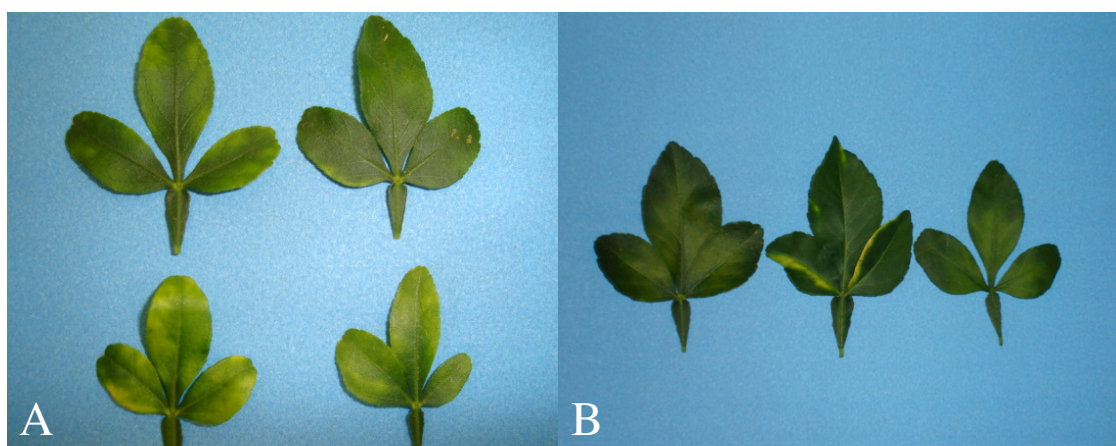
**C**

**Figura 8-** Distribuição de médias para as variáveis: A- número de cópias da molécula 16S rDNA. B- valor do Ct. C- valor do delta Ct (Programa SISVAR, FERREIRA., 2000).

No presente trabalho, diante das estimativas genéticas, distribuição das médias e da análise de variância, fica evidente que a utilização do número de cópias da molécula 16S rDNA não é um bom parâmetro para mapear a resistência ao HLB. Pequenas modificações nos valores de Cts implicam em grande variação no número de cópias, aliado a isso a análise absoluta requer uma precisão dos padrões utilizados para construção da curva padrão, todos esses fatores afetam diretamente a estimação do número de cópias.

#### 4.4 Sintomas de HLB nos genitores (*C. sunki* e *P. trifoliata*)

Sintomas típicos de HLB, como o mosqueamento (manchas de formas irregulares, verde claras ou amarelas) são melhores visualizados em *Citrus*. Os sintomas foliares típicos em laranja doce não são os mesmos de *P. trifoliata* e *C. sunki*. No final do outono, a espécie *P. trifoliata*, tem seu metabolismo reduzido, ocorrendo à queda das folhas trilobadas, além disso, a espécie apresenta problemas nutricionais, particularmente em casa de vegetação. Todos esses fatores contribuem para que os sintomas não sejam típicos de HLB. A Figura 9 ilustra as folhas da repetição biológica da espécie *P. trifoliata* que apresentou a bactéria (A) e o padrão foliar das repetições que não apresentaram a bactéria (B).



**Figura 9-** Padrão das folhas da espécie *P. trifoliata* infectada (A) e não infectadas (B) com *Ca. Liberibacter asiaticus*.

Como os sintomas da doença assemelham-se àqueles desenvolvidos pela deficiência nutricional com clorose internerval clara o diagnóstico do padrão foliar torna-se difícil. Nas repetições biológicas da tangerina *Sunki* (Figura 10) esse padrão parece ser característico de deficiência nutricional. No entanto, essas folhas são uma boa opção para diagnóstico molecular de HLB, principalmente na ausência de folhas com mosqueamento (TEIXEIRA *et al.*, 2008).

LOPES *et al.* (2009) compararam o desenvolvimento dos sintomas, a eficiência de transmissão e quantidades estimadas das bactérias *Ca. Liberibacter asiaticus* e *Ca.*

*Liberibacter americanus*, em plantas de ‘Hamlin’, ‘Natal’, ‘Pera’ e ‘Valência’. Observou-se que apesar do alto título, folhas com mosqueamento típico e sinais de deficiência nutricional estavam ausentes ou menos perceptíveis em plantas inoculadas com a espécie asiática, dificultando a correta identificação do HLB. Em uma perspectiva evolutiva, o alto título associado a uma baixa expressão de sintomas pode indicar uma co-evolução patógeno-hospedeiro. Outra possibilidade é a associação com endofíticos, SAGARAM *et al.* (2009) observaram *Ca. Liberibacter asiaticus* associada a uma diversidade de microorganismos. Em *Xylella fastidiosa*, essa associação é mais freqüente em folhas assintomáticas.

O período de incubação do HLB é de aproximadamente 6 a 36 meses (MILORI, 2009), durante esse período a planta fica assintomática ou com sintomas pouco expressivos. Diante disso, os padrões foliares de *P. trifoliata* e *C. sunki* obtidos com esse estudo não podem ser utilizados para confirmar os resultados de detecção molecular, uma vez que não encontramos a presença de sintomas típicos ao longo dos doze meses.



**Figura 10-** Padrão das folhas da espécie *C. sunki* infectadas com *Ca. Liberibacter asiaticus*.

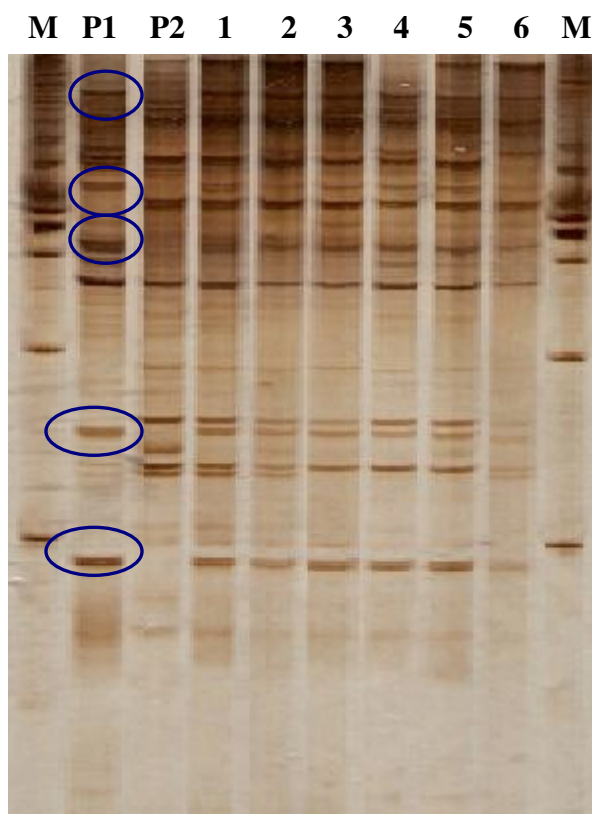
## **4.5 Mapas de Ligação**

A possibilidade de identificar, mapear e medir os efeitos dos genes controladores dos caracteres quantitativos, utilizando-se marcadores moleculares, é uma importante contribuição para o melhoramento de plantas, especialmente para citros. A relativa facilidade com que se obtêm híbridos entre espécies e/ou gêneros de citros, sua condição predominantemente diplóide, reduzido número cromossômico ( $2n = 9$ ) e pequeno tamanho do genoma (GUERRA, 1993), favorecem a construção de mapas genéticos para esse grupo (JARREL *et al.*, 1992; CRISTOFANI *et al.*, 1999).

Mapas de ligação foram previamente construídos para estes mesmos genitores, estabelecidos com marcadores RAPD e AFLP (CRISTOFANI *et al.*, 1999). Marcadores SSRs e TRAPs foram incluídos a esses mapas, no presente trabalho.

### **4.5.1 Marcadores moleculares**

Por intermédio da técnica TRAP (Figura 11) das 18 combinações de “primers” testadas 4 não detectaram polimorfismo na progênie e 14 apresentaram polimorfismo com bandas de pesos moleculares variando entre 0,15 a 5 Kb. Foi gerado um total de 49 marcas e o número médio de marcadores por par de “primer” foi de 3,5.



**Figura 11-** Gel de poliacrilamida 6,5%. Combinação dos “primers” TRAPs F2P3, bandas polimórficas destacadas em azul. **M:** Marcador molecular; **P1:** *C. sunki*; **P2:** *P. trifoliata*; **1 ao 6:** híbridos.

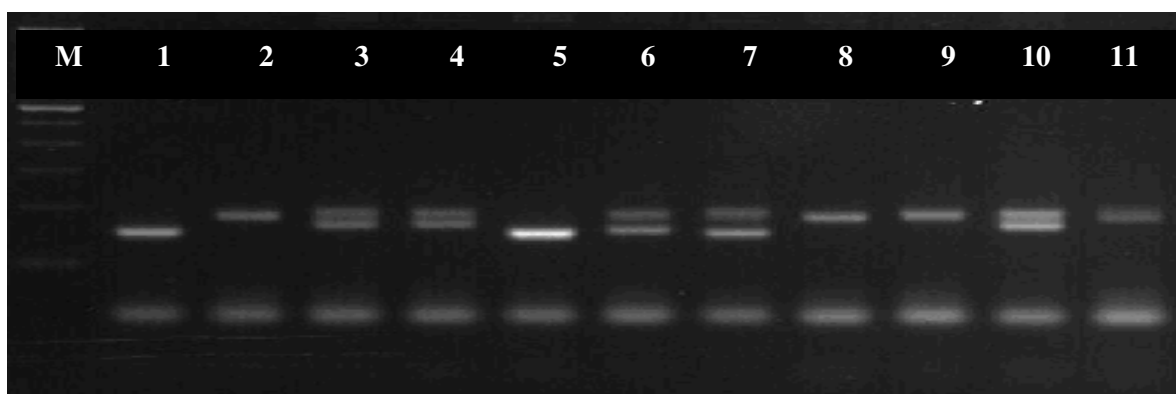
MIKLAS *et al.* (2006) estudaram a aplicação de marcadores TRAPs para mapeamento e localização de marcas associadas a genes de resistência a doenças em feijão (*Phaseolus vulgaris L.*). Grande parte dos TRAPs desenvolvidos a partir de genes de resistência mapearam próximo ou dentro de “clusters” de genes relacionados à resistência a doenças. Outros, mapearam próximos a QTLs relacionados à resistência a doenças. Os autores encontraram de 1,3 a 20 marcadores TRAPs por PCR e atribuíram o alto nível de polimorfismo ao tipo de população de mapeamento. Os cruzamentos entre genitores mais distantes foram os que apresentaram maior polimorfismo para os TRAPs.

A utilização da técnica TRAP permite o aproveitamento de informações sobre as seqüências parciais de genes candidatos para desenhar os “primers” fixos. Sendo, dessa maneira, muito relevante nas investigações de genômica vegetal. O advento do sequenciamento em larga escala gerou um montante de informações importantes de



seqüências de muitos organismos. Com isso, essa é uma técnica rápida e eficiente, baseada em PCR, que utiliza ferramentas de bioinformática e base de dados de ESTs, gerando marcadores em torno de genes candidatos (HU *et al.*, 2003).

Em relação aos marcadores microssatélites (Figura 12) dos 148 pares de “primers” apenas 36 foram selecionados com base no polimorfismo entre os genitores e a segregação na progênie, totalizando 36 SSRs genômicos. Todos os marcadores microssatélites derivados de seqüências expressas (EST-SSRs) não apresentaram polimorfismos. Outros estudos revelam o baixo polimorfismo dos EST-SSRs quando comparados aos SSRs genômicos (VARSHNEY *et al.*, 2005; PALMIERI *et al.*, 2007).



**Figura 12-** Gel agarose 3%; amplificação de fragmentos de DNA utilizando microssatélite CCSM 156. (1) *P. trifoliata*, (2) *C. sunki* (3-11) híbridos. M= marcador de peso molecular.

No presente estudo, observou-se que os SSRs genômicos apresentaram-se pouco polimórficos, gerando um baixo número de marcadores. Resultados similares foram observados por NOVELLI *et al.* (2006), os quais relataram uma grande dificuldade de obter marcadores para a caracterização de alguns cultivares de citros.

Outros estudos realizados com a mesma população de mapeamento, também, observaram uma baixa porcentagem de marcadores polimórficos, demonstrando um indício de uma baixa heterozigosidade (CRISTOFANI *et al.*, 1999). Segundo HERRERO *et al.* (1996), as espécies de citros que mostram valores baixos de heterozigosidade podem indicar que a auto-fecundação tenha desempenhado um importante papel na sua origem e evolução.

NOVELLI *et al.* (2006) discutem que a variabilidade genética dos citros é resultado de vários fatores, como hibridização, mutação e tipo de reprodução. Dessa maneira, a baixa diversidade intraespecífica, como a de laranja doce, é contrastante com a diversidade do período de maturação, cor e tamanho dos frutos. Devido a esses fatores e também, a falta de marcadores moleculares para essas espécies, a distinção entre cultivares é baseada em características morfológicas.

Os 36 pares de “primers” SSR e 18 pares TRAPs resultaram em 85 marcadores polimórficos (Tabela 8), os quais foram avaliados em um total de 94 indivíduos da progênie, além dos genitores. A matriz de dados foi gerada com as colunas representando os diferentes indivíduos da progênie e as linhas constituindo os marcadores moleculares para posterior construção do mapa de ligação (Figuras 13 e 14).

**Tabela 6-** Características dos marcadores moleculares selecionados, no presente trabalho, para integrar os mapas já estabelecidos de *C. sunki* x *P. trifoliata*.

Marcador	Nº total de “primers” avaliados	Nº “primers” polimórficos	Nº total de marcas	Nº de marcadores com distorção Mendeliana	Número de marcadores por par de “primers”
TRAP	18	14	49	23	3,5
SSR	148	36	36	9	1

Em análise reunindo os marcadores selecionados SSRs e TRAPs, a hipótese nula de segregação foi testada ( $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ) para as proporções mendelianas esperadas (1:1 e 1:1:1:1) com o teste de Qui-quadrado individualmente para todos os marcadores selecionados. A maioria dos marcadores segregou na proporção 1:1, exceto os marcadores CCSM 156 e CCSM40, que segregaram na proporção 1:1:1:1.

O estudo da segregação dos TRAPs revelou que 46,9% apresentam uma segregação distorcida em relação à proporção Mendeliana esperada de 1:1 (ANEXO IV). Os SSRs possuem 25% de distorção (ANEXO V). Porcentagem menor foi encontrada por CRISTOFANI *et al.* (1999), com um total de 168 marcadores e 23,21% apresentando desvios na segregação. Altos níveis de desvios foram encontrados em vários cruzamentos, intra e interespecíficos, envolvendo o gênero Citrus, independente da espécie e do tipo de marcador utilizado (OLIVEIRA *et al.*, 2004b).

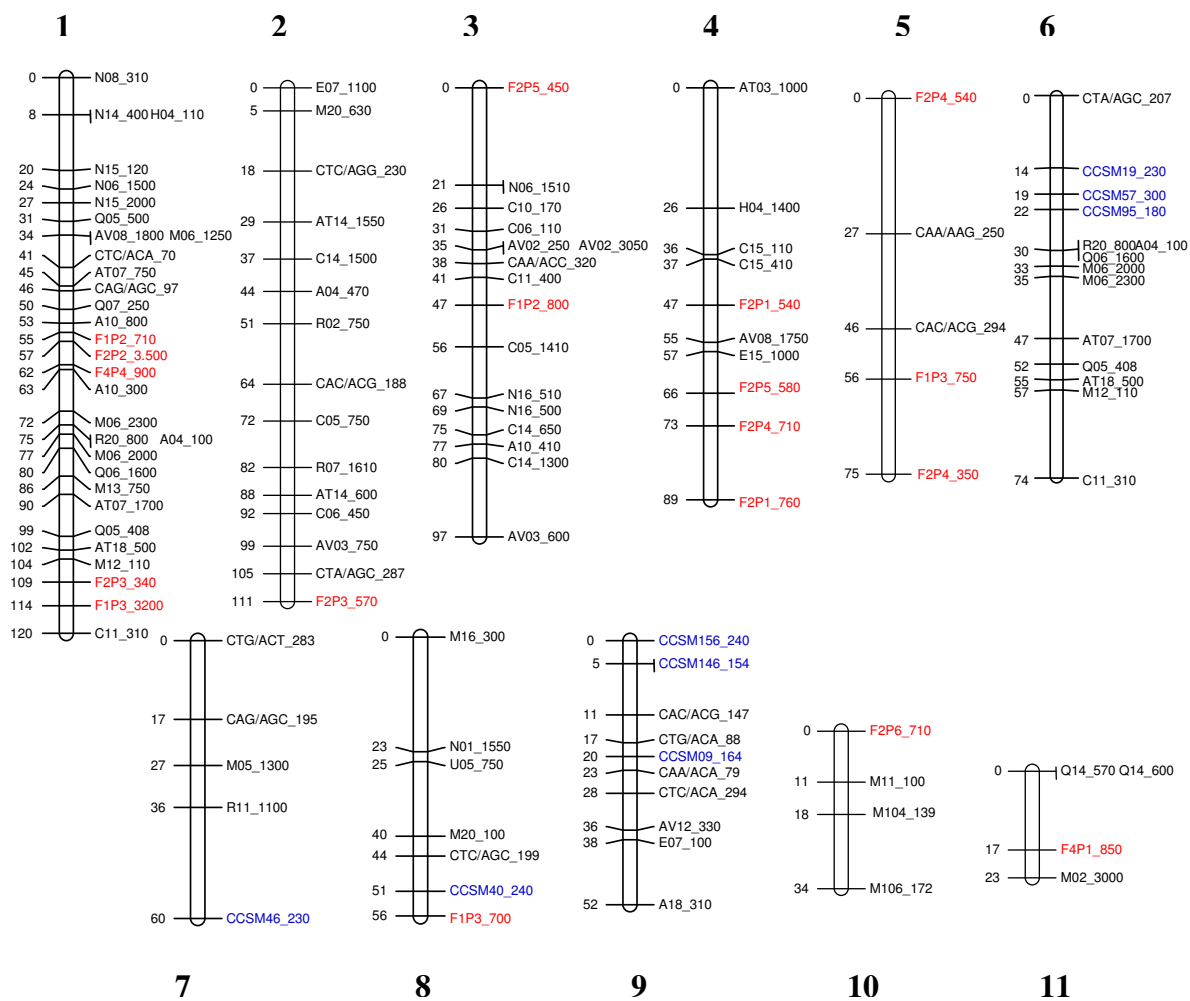
A literatura relata desvios de segregação em marcadores em mapas de ligação genética, TANKSLEY *et al.* (1992) sugeriram que rearranjos cromossômicos, seleção gamética, zigótica e/ou pós-zigótica podem causar desvios de segregação em várias espécies. Segundo RUIZ & ASINS (2003), a presença de fatores letais recessivos e o favorecimento de alguns alelos na seleção gamética ou aborto do embrião, por exemplo, são possíveis causadores de segregação distorcida em citros em nível gamético e zigótico.

#### 4.5.2 Análise de ligação

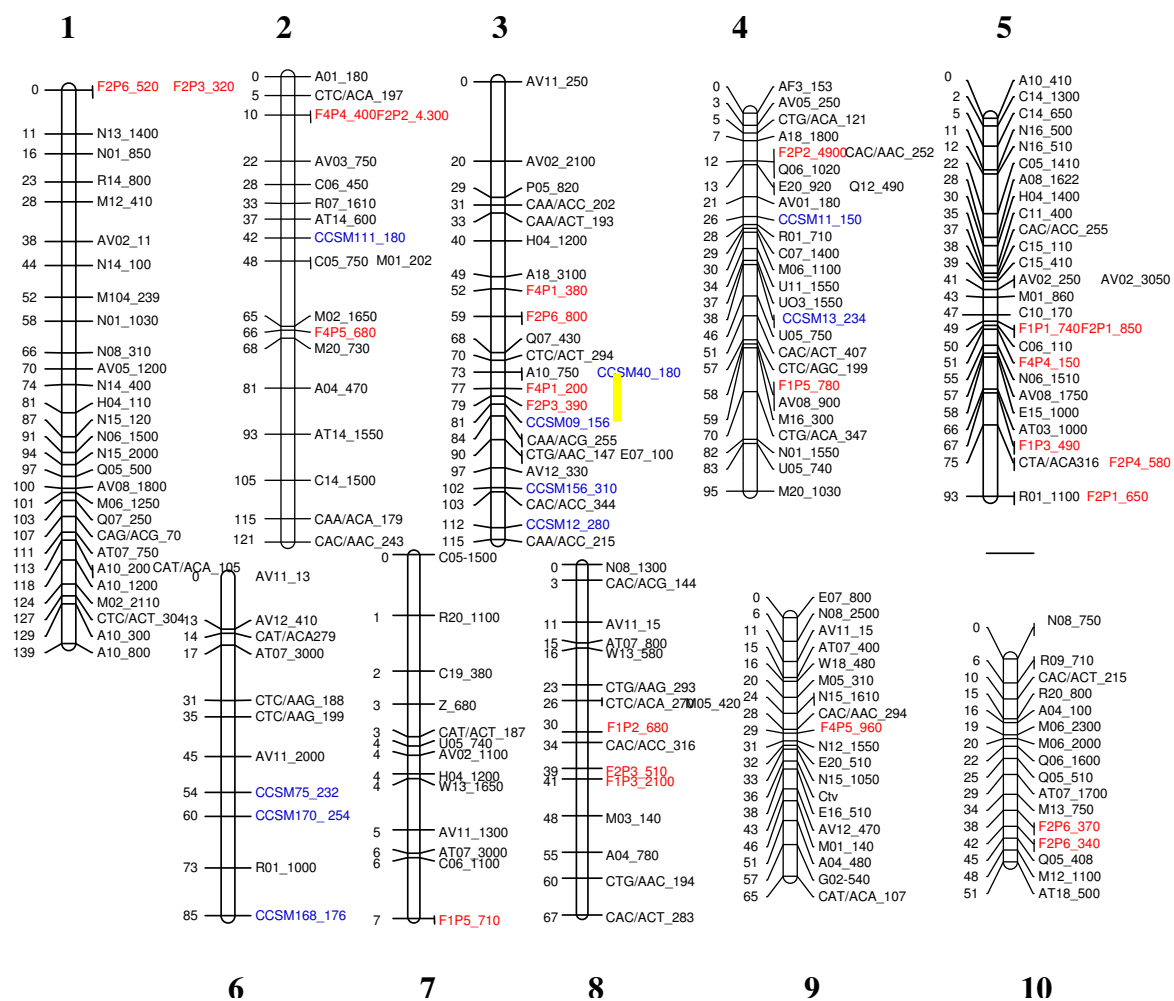
As relações de ligação dos marcadores segregantes foram estabelecidas utilizando-se o programa JoinMap. Com base na análise de ligação, 26 marcadores se agruparam em 11 grupos de ligação de *C. sunki* (Figura 13) e 34 marcadores se ligaram em 10 grupos de ligação de *P. trifoliata* (Figura 14), 25 marcadores não se ligaram em nenhum dos mapas.

À distância entre os marcadores nos grupos de ligação variou de 0 (isto é, dois marcadores que co-segregam completamente ligados) a 27 cM para a tangerina Sunki. Para o mapa do *P. trifoliata*, a distância entre marcadores é de 0 a 20 cM. Os tamanhos individuais dos grupos de ligação variaram de 23 a 120 cM para *C. sunki* e 51 a 139 cM para o *P. trifoliata*. O comprimento total dos mapas foi de 791 cM para *C. sunki* (Tabela 7) e 909 cM para o *P. trifoliata* (Tabela 8).

Essa mesma população foi mapeada por CRISTOFANI *et al.* (1999), 10 grupos de ligação foram encontrados para a espécie *C. sunki* e 8 grupos para *P. trifoliata*, o comprimento total dos mapas foi de 732,32 cM e 866,88 cM, respectivamente.



**Figura 13-** Mapa de ligação de *C. sunki* com 121 marcadores (78 RAPD, 17 AFLP, 8 SSR e 18 TRAP) em 11 grupos de ligação; os marcadores TRAPs estão destacados em vermelho e os SSR em azul.



**Figura 14-** Mapa de ligação de *P. trifoliata* com 202 marcadores (135 RAPD, 33 AFLP, 10 SSR e 24 TRAP) em 10 grupos de ligação; os marcadores TRAPs estão destacados em vermelho e os SSR em azul; os QTLs estão destacados em amarelo.

**Tabela 7-** Número, tipo de marcadores e a distância em centimorgans (cM) de cada grupo de ligação do mapa de *C. sunki*

<b>Grupo de ligação*</b>	<b>Número e tipo de marcadores</b>	<b>Distância (cM)</b>
GL1	24 RAPD, 2 AFLP e 5 TRAP	120
GL2	11 RAPD, 3 AFLP e 1 TRAP	111
GL 3	13 RAPD, 1 AFLP e 2 TRAP	97
GL 4	6 RAPD e 4 TRAP	89
GL 5	2 AFLP e 3 TRAP	75
GL 6	10 RAPD, 1 AFLP e 3 SSR	74
GL 7	2 RAPD, 2 AFLP e 1 SSR	60
GL 8	4 RAPD, 1 AFLP, 1 TRAP e 1 SSR	56
GL 9	3 RAPD, 4 AFLP e 3 SSR	52
GL 10	3 RAPD e 1 TRAP	34
GL 11	3 RAPD e 1 TRAP	23

\* Os grupos de ligação foram numerados seqüencialmente do maior para o menor.

**Tabela 8-** Número, tipo de marcadores e a distância em centimorgans (cM) de cada grupo de ligação do mapa de *P. trifoliata*

<b>Grupo de ligação*</b>	<b>Número e tipo de marcadores</b>	<b>Distância (cM)</b>
GL 1	25 RAPD, 3 AFLP e 2 TRAP	139
GL 2	12 RAPD, 3 AFLP, 3 TRAP e 1 SSR	121
GL 3	9 RAPD, 7 AFLP, 4 TRAP e 4 SSR	115
GL 4	18 RAPD, 5 AFLP, 2 TRAP e 2 SSR	95
GL 5	21 RAPD, 2 AFLP e 6 TRAP	93
GL 6	5 RADP, 3 AFLP e 3 SSR	85
GL 7	10 RAPD, 1 AFLP e 1 TRAP	78
GL 8	7 RAPD, 6 AFLP e 3 TRAP	67
GL 9	15 RAPD, 2 AFLP e 1 TRAP	65
GL 10	13 RADP, 1 AFLP e 2 TRAP	51

\* Os grupos de ligação foram numerados seqüencialmente do maior para o menor.

O tamanho do genoma de *Citrus* foi estimado entre 1.500 cM e 1.700 cM (JARREL et al., 1992), os mapas de ligação construídos no presente trabalho, utilizando o aplicativo JoinMap, cobriram de 46,53 a 52,74% o mapa de *C. sunki* e 53,47 a 60,6% o mapa de *P. trifoliata*.

Neste trabalho, foram construídos dois mapas de ligação totalizando 1.700 cM (909 para o *P. trifoliata* e 791 para a tangerina Sunki). Os mapas de ligação são específicos para cada indivíduo. A estratégia de mapeamento utilizada “pseudo-testcross” é especificamente baseada na seleção de marcadores de dose única presentes em um genitor e ausentes em outro. A obtenção do número de grupos de ligação maior que o número haplóide de cromossomos das duas espécies genitoras e o número de marcadores não ligados demonstram que o nível de saturação do mapa apresentado neste trabalho ainda necessita ser aumentado.

No caso de mapeamento utilizando “pseudo-testcross”, a ocorrência de marcadores comuns aos dois genomas em um mesmo grupo de ligação dependerá da presença do mesmo marcador em ambos os genomas e do seu estado alélico. Enquanto ao nível interespecífico, a sobreposição é muito baixa, ao nível intraespecífico, irá aumentar à medida que indivíduos da mesma população sejam utilizados (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994).

Para integrar mapas de ligação construídos com a estratégia “pseudo-testcross”, marcadores codominantes multialélicos com alelos segregando para ambos os genitores seriam mais eficientes, fornecendo um conjunto comum de locos que poderiam ser utilizados como ponte (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994). No presente trabalho, dois microssatélites foram comuns aos genomas dos genitores, o CCSM 156 localizado no grupo de ligação 3 (102 cM) na espécie *P. trifoliata* e grupo de ligação 9 (0 cM) na espécie *C. sunki* e o CCSM 40 localizado no grupo de ligação 3 (73 cM) na espécie *P. trifoliata* e grupo de ligação 8 (51 cM) na espécie *C. sunki*.

#### **4.5.3 Mapeamento de QTLs**

Para que seja possível implementar um programa de melhoramento com base na seleção assistida por marcadores que aumente a eficiência dos métodos convencionais, deve-se dispor de marcadores fortemente ligados a genes de interesse e que tenham efeito relativamente pronunciado na expressão fenotípica, além de serem estáveis em diversos ambientes (MORAES, 2005).

O mapeamento por intervalo é uma estratégia poderosa que permite a identificação e o mapeamento genético de locos que controlam características quantitativas. O conhecimento do número e dos efeitos dos QTLs pode propiciar aos melhoristas o conhecimento do controle genético destas características e permitir a elaboração de estratégias de seleção mais eficientes (SCHUSTER & CRUZ, 2004).

As análises de segregação dos marcadores na progênie resultaram em 121 marcadores no mapa de *C. sunki* e 202 marcadores no mapa de *P. trifoliata*, sendo 26 (8 SSR e 18 TRAP) e 34 (10 SSR e 24 TRAP) respectivamente, integrados por esse estudo. Para a localização de QTLs no mapa de *P. trifoliata*, os dados fenotípicos avaliados foram analisados separadamente e associados aos mapas de ligação com a utilização do programa MAPQTL v.4.0 (Figura 15).

As análises pelo método de “Multiple QTL Mapping” (MQM) detectaram três QTLs utilizando três formas diferentes de mensurar a característica (análise relativa, delta Ct e Ct). No grupo de ligação 3 (GL 3), um QTL foi detectado entre o intervalo de 73,5 cM (marcador F4P1\_200) a 83,7 cM (marcador CCSM09\_156), utilizando a análise relativa e valores de Ct. No grupo de ligação 5 (GL 5), a análise de delta Ct detectou um QTL entre o intervalo de 42,6 cM (M01\_860) a 50,2 cM (C06\_110), e a análise de Ct detectou um QTLs entre o intervalo 34,9 cM (C11\_400) a 49 cM (F1P1\_740), neste mesmo grupo de ligação.

Os marcadores TRAPs envolvidos com os QTLs estão relacionados à via de fenilpropanóides (cinnamoyl-CoA reductase e caffeic acid-O-methyltransferase). O reforço e espessamento da parede celular, através do aumento da síntese de lignina, são uma resposta eficaz da defesa da planta contra a infecção por patógenos (CRISTOFANI *et al.*, 2007).

O teste de permutação (1000 repetições) detectou um LOD score crítico inferior ( $P < 0,05$ ) ao LOD gerado e foram observadas as presenças de QTLs com efeitos na variação fenotípica de 11,3% e 12,9%, correspondentes ao QTL do grupo de ligação 3, 18,1% e 21,1%, correspondentes aos dois QTLs do grupo de ligação 5 (Tabela 9).



**Tabela 9-** Detalhes dos QTLs detectados nos grupos de ligação de *P. trifoliata*, pelo método “Multiple QTL Mapping” (MQM) associados às variáveis estudadas.

Variáveis*	Grupo de ligação	Intervalo (cM)	LOD	LOD Crítico	Variância	Efeito (%)
AR	3	78,6	1,75	1,6	8,913,39	11,3
Delta Ct	5	47,4	2,39	2,0	45,4201	18,1
Ct	5	40,7	3,46	2,1	19,1498	21,1
Ct	3	76,8-78,6	2,38	2,1	17,9323	12,9

\* Observações: AR: médias das análises relativas (comparação dos Cts dos híbridos com a amostra de menor Ct). Delta Ct (diferença entre o Ct do alvo e do normalizador). Ct (número do ciclo onde a fluorescência ultrapassa o limiar de detecção).

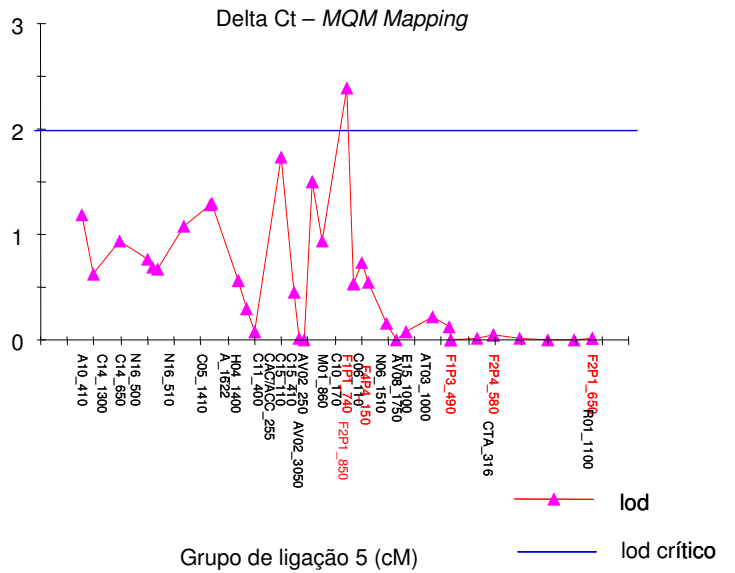
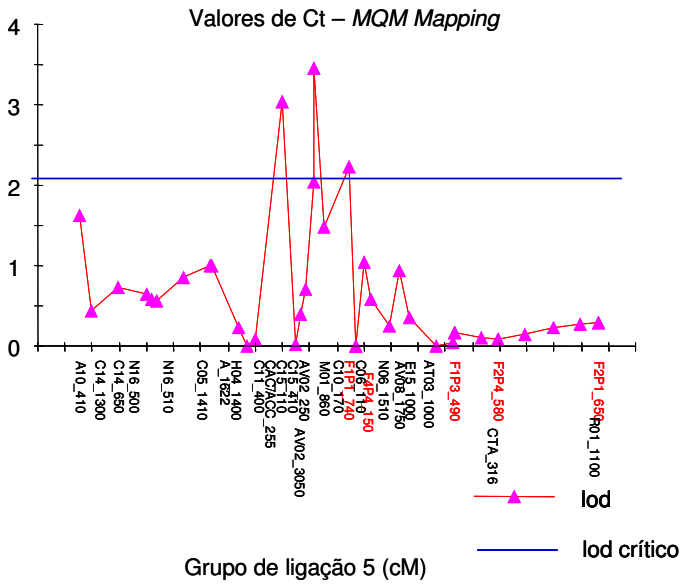
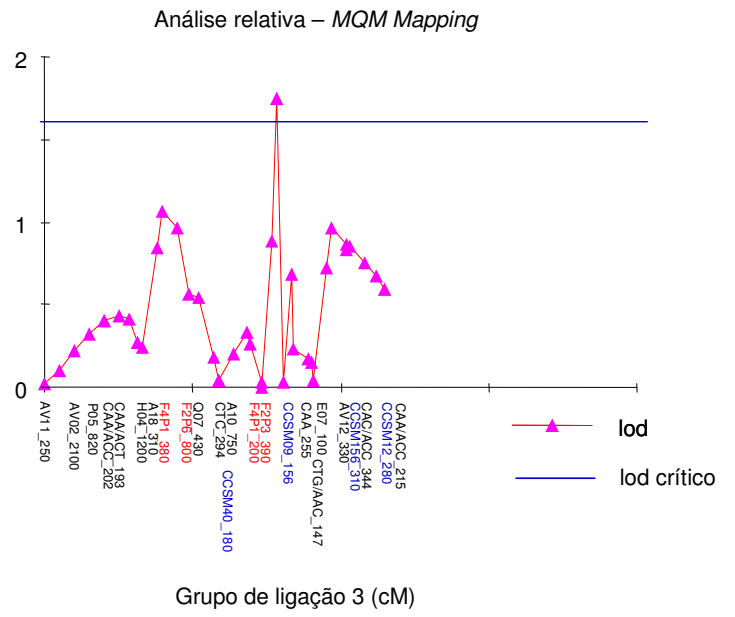
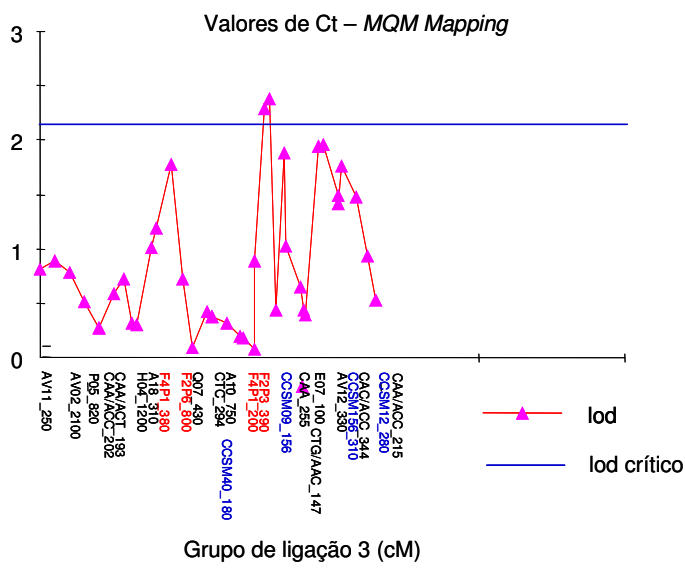
A variável número de cópias da molécula 16S rDNA não detectou nenhum QTL, devido à grande variação das médias entre os híbridos. A análise relativa apresentou uma variância muito grande, também devido à grande variação entre os valores dos híbridos.

De acordo com os dados obtidos na literatura, QTLs de menor efeito geralmente são os responsáveis por menos de 10% da variação fenotípica e foram detectados em trabalhos cuja herança das características em estudo era poligênica ou quantitativa. QTLs considerados de efeito moderado, estariam na faixa de 10 a 30% da variação fenotípica (ASINS et al., 2004) e de grande efeitos seriam os que explicassem mais de 30% da variação fenotípica. BUDAHN *et al.* (2009) encontraram QTL responsável por 46,40% da variação fenotípica para a resistência a nematóides em uma população F<sub>2</sub> de rabanete, concluindo que a resistência é determinada por dominância completa. CALENGE *et al.* (2005) encontraram um QTL de efeito maior explicando 34,4 - 46,6% da variação fenotípica em duas progênes F<sub>1</sub> de macieiras. Um QTL significativo associado à resistência a “Pierce’s disease” (PD) em uva, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* foi localizado no mapa do genitor resistente explicando 72% da variância fenotípica (KRIVANCK *et al.*, 2006). Os autores acreditam que a resistência seja controlada por um alelo dominante em um loco de maior efeito com algumas modificações fenotípicas causadas pelo ambiente ou por genes de menor efeito.

A precisão das estimativas da posição do QTL é influenciada principalmente pela herdabilidade do caráter e pelo tamanho da população analisada. No presente trabalho, a herdabilidade apresentou valores moderados ou intermediários sendo o número de indivíduos o fator limitante. Diante disso, os valores da estatística LOD para a maioria dos QTLs estão próximos ao valor crítico, podendo ser falsos positivos, no

entanto, o fato de terem sido detectados utilizando duas variáveis torna mais provável a presença dos QTLs no grupo de ligação 3 e 5 de *P. trifoliata*. Tais QTLs mostram-se promissores para um maior conhecimento da resistência ao HLB.

Os valores moderados dos coeficientes de herdabilidade individual no sentido amplo (0,42 a 0,77), distribuição contínua das frequências e QTLs associados à resistência explicando entre 11,3 a 21,1% da variação fenotípica indicam que essa é uma característica poligênica. Outro exemplo de herança poligênica em citros é a resistência/tolerância a gomose de *Phytophthora*, em que três QTLs foram detectados explicando de 14 a 24% da variação fenotípica, apresentando coeficiente de herdabilidade de 18,7% (SIVIERO *et al.*, 2006).



**Figura 15-** QTLs associados à resistência ao HLB em mapas de ligação de *Poncirus trifoliata*

## 5- CONCLUSÕES

a) Foi possível confirmar que a característica resistência ao HLB é contrastante para os genitores *C. sunki* e *P. trifoliata*, e que esta característica está segregando na progênie. Como na espécie *P. trifoliata*, a taxa de infecção foi menor, a multiplicação da bactéria foi mais lenta, apresentando menor título, sugere-se que essa espécie apresenta maior resistência à bactéria do HLB.

b) Este é o primeiro estudo envolvendo análise de QTL para esse patossistema de citros. Os mecanismos da herança genética do HLB ainda são desconhecidos, entretanto, com base na distribuição das frequências das características na população  $F_1$  e na detecção de QTLs com efeito moderado, a característica resistência ao HLB em *P. trifoliata* parece ser controlada por vários genes.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BARKLEY, N.A.; ROOSE, M.L.; KRUEGER, R.R.; FEDERICI, C.T. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). **Theoretical and Applied Genetics**, v.112, p.1519-1531, 2006.

BASTIANEL, C.; GARNIER-SEMANCIK, M.; RENAUDIN, J.; BOVE, J.M.; EVEILLARD, S. Diversity of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*,” based on the *omp* gene sequence. **Applied and environmental microbiology**, v.71, n.11, p. 6473–6478, 2005.

BASTIANEL, M.; OLIVEIRA, A.C.; CRISTOFANI, M.; GUERREIRO-FILHO, O.; FREITAS-ASTÚA, J.; RODRIGUES, V.; ASTÚA-MONGE, G.; MACHADO, M.A. Inheritance and heritability of resistance to citrus leprosis. **Phytopathology**, v.96, p.1092-1096, 2006.

BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v.88, n.1, p.7- 37, 2006.

BROOKES AJ. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, p. 177-186, 1999.

BUDAHN, H.; PETERKA, H.; MOUSA, M. A. A.; DING, Y.; ZHANG, S.; LI, J. Molecular mapping in oil radish (*Raphanus sativus* L.) and QTL analysis of resistance against beet cyst nematode (*Heterodera schachtii*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, p. 775-782, 2009.

CALENGE, F.; DROUET, D.; DENANCÉ, C.; VAN DE WEG, W. E.; BRISSET, M. N.; PAULIN, J. P.; DUREL, C. E. Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. **Theoretical and Applied Genetics**, v.111, p. 128-135, 2005.

CARLOS, E. F.; COLETTA-FILHO, H. D.; TARGON, M. L. N.; MACHADO, M. A. Quantitative real time PCR based on Taqman probes to molecular detection of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” and “*Ca. Americanus*”. In: Huanglongbing Greening International Workshop, Ribeirão Preto, 2006.

CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, v.61, p.89-100, 2002.

CHEN, J.; HU, J.; VICK, B.A.; JAN, C.C. Molecular mapping of a nuclear male-sterility gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using TRAP and SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.113, p.122-127, 2006.

CHEN, C.; BOWMAN, K.D.; CHOI, Y.A.; DANG, P.M.; RAO, M.N.; HUANG, S.; SONEJI, J.R.; COLLUM, G.M.; GMITTER, J.F.G. EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. **Tree Genetics & Genomes**, v.4, p.1-10, 2008.

CHRISTENSEN, N.M; NICOLAISEN, M; HANSEN, M; SCHULZ, A. Distribution of Phytoplasmas in Infected Plants as Revealed by Real-Time PCR and Bioimaging. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, n.11, p.1175-1184, 2004.

CHURCHILL, G.A.; DODGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative values for quantitative trait mapping. **Genetics**, v.138, p.963-971, 1994.

COLETTA-FILHO, H. D.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; DE NEGRI, J. D.; POMPEU JR., J.; DO AMARAL, A. M.; MULLER, G. W.; MACHADO, M. A. First Report of the Causal Agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease**, v.88, p.1382, 2004.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeats polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gel by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001.

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

CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A.; NOVELLI, V.M; SOUZA, A.A.; TARGON, M.L.P.N. Construction of linkage maps of *Poncirus trifoliata* and *Citrus sunki* based on microsatellite markers. **Proceedings. Acireale: International Society of Citriculture**, v.1, p.175-178, 2000.

CRISTOFANI-YALY, M.; BERGER, I.J.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DORTA, S.O.; FREITAS-ASTUA, J.; SOUZA, A.A.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; REIS, M.S.; MACHADO, M.A. Differential expression of genes identified from *Poncirus trifoliata* tissue inoculated with CTV through EST analysis and *in silico* hybridization. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.972-979, 2007.

DA GRAÇA, J. Citrus greening disease. **Annual Review Phytopathology**, v.29, p.109-136, 1991.

DENG, Z.; HUANG, S.; LING, P.; YU, C.; TAO, Q. Fine genetic mapping and BAC contig development for the *Citrus tristeza virus* resistance gene locus in *Poncirus trifoliata* (Raf.). **Molecular Genetics and Genomics**, v.265, p.739-747, 2001.

DODDAPANENI, H.; LIAO, H.; LIN, H.; BAI, X.; ZHAO, X.; CIVEROLO, E.L.; IREY, M.; COLETTA-FILHO, H.; PIETERSEN, G. Comparative phylogenomics and multi-gene cluster analyses of the Citrus Huanglongbing (HLB)-associated bacterium “*Candidatus Liberibacter*”. **BMC Research Notes**, 1:72, p.1-9, 2008.

DONG, J.; GUANG-YAN, Z.; QI-BING, H. Analysis of microsatellites in citrus unigenes. **Acta Genetica Sinica**, v.33, n.4, p.345-353, 2006.

FARIA, L.M. Mapeamento genético e detecção de QTLs em um cruzamento de limão 'Cravo' e citrumelo 'Swingle'. 2007. 93p. Dissertação (Mestrado)- Instituto Agrônomo de Campinas.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: Embrapa/Cenargen, p. 220, 1996.

FERREIRA, D.F. SISVAR- Sistema de análises estatísticas para dados balanceados. Lavras, UFLA/ DEX, 2000.

GARCIA, M.R.; ASINS, M.J.; FORNER, J.; CARBONELL, E.A. Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.511-518, 1999.

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J.M. The greening organism is a Gram negative bacterium. Proceedings of 9th Conference of International Organization of Citrus Virologists, Riverside, p. 115-124, 1984.

GASPAROTO, M.C.G.; BASSANEZI, R. B.; LOPES, S.A.; FRARE, G.; MARTINS, E.C.; DELLA COLETA FILHO, H.; AMORIM, L. Influence of temperature on Huanglongbing infection under controlled environment. Proceedings International Research Conference on Huanglongbing, p. 164-165, 2008.

GONG, L.; STIFT, G.; KOFLER, R.; PACHNER, M.; LELLEY, T. Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita pepo* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v.117, n.1, p. 37-48, 2008.

GOTTWALD, T. R., DA GRAÇA, J. V., AND BASSANEZI, R. B. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. Online. **Plant Health Progress**, 2007. <http://www.apsnet.org/online/feature/huanglongbing/> (9 dezembro 2008).

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v.137, p.170-177, 1994.

GUERRA, M.S. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in citrus species revealed by CMA/DAPI staining. **Heredity**, v.71, p.234-241, 1993.

GUERRA, M.; PEDROSA, A.; BARROS E SILVA, A.; CORNÉLIO, M.T.M.; SANTOS, K. G. B.; SOARES-FILHO, W.; ET AL. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germoplasm bank. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p.489-496, 1997.

GUERRA, M.; SANTOS, K.G.; SILVA, A.E.B.; EHRENDORFER, F.; et al. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae - a case of parallel chromosomal evolution. **American Journal of Botany**, v.87, p.735-747, 2000.

HANSEN, B.G.; HALKIER, B.A.; KLIEBENSTEINS, D.J. Identifying the molecular basis of QTLs: eQTLs add a new dimension. **Trends in Plant Science**, v.13, n.2, p.72-77, 2008.

HERRERO, R.; ASÍNS, M.J.; CARBONELL, E.A.; NAVARRO, L. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, p. 599-906, 1996.

HOCQUELLET. A.; BOVÉ, J. M; GARNIER, M. Production and evaluation of non radioactive probes for the detection of two “*Candidatus Liberobacter*” species associated with citrus huanglongbing (greening). **Molecular and Cellular Probes**, v.11, p.433-438, 1997.

HOCQUELLET. A.; TOORAWA, P.; BOVÉ, J. M; GARNIER, M. Detection and identification of the two “*Candidatus Liberobacter*” species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the b operon. **Molecular and Cellular Probes**, v.13, p.373–379, 1999.

HU, J.; VICK, B.A. Target Region Amplification Polymorphism: A novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology**, v.21, p.289-294, 2003.

HU, J.; OCHOA, O.E.; TRUCO, M.J.; VICK, B.A. Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. **Euphytica**, v.144, p.225–235, 2005.

HUNG, T.H.; WU, M.L.; SU, H.J. Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the Polymerase Chain Reaction. **Journal of Phytopathology**, v.147, p.599- 604, 1999.

HUNG, T.H.; WU, M.L.; SU, H.J. Identification of alternative hosts of the fastidious bacterium causing citrus greening disease. **Journal of Phytopathology**, v.148, p.321-326, 2000.

HUNG, T.H.; HUNG, S.C.; CHEN, C.N.; HSU, M.H.; SU, H.J. Detection by PCR of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector–pathogen relationships. **Plant Pathology**, v.53, p.96- 102, 2004.

IGARASHI, M.; ABE, Y.; HATSUYAMA, Y.; UEDA, T.; AKADA, T.F.; KON, T.; KUDO, T.; SATO, T.; SUZUKI, M. Linkage maps of the apple (*Malus 3 domestica* Borkh.) cvs ‘Ralls Janet’ and ‘Delicious’ include newly developed EST markers. **Molecular Breeding**, v.22, p.95–11, 2008.

JAGOUEIX. S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. PCR detection of the two “*Candidatus liberobacter*” species associated with greening disease of citrus. **Molecular and Cellular Probes**, v.10, p.43-50, 1996.

JAGOUEIX. S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. Comparison of the 16S/23S ribosomal intergenic regions of “*Candidatus Liberibacter asiaticum*” and “*Candidatus Liberobacter africanum*,” the two species associated with citrus huanglongbing (greening) disease. **International Journal os Systematic Bacterology**, v.47, n.1, p.224- 227, 1997.



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.

JIN, H.; HU, W.; WEI, Z.; WAN, L.; LI, G.; TAN, G.; ZHU, L.; HE, G. Alterations in cytosine methylation and species-specific transcription induce by interspecific hybridization between *Oryza sativa* and *O. Officinalis*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, p. 1271-1279, 2008.

JOSHI, S.P.; RANJEKAR, P.K.; GUPTA, V.S. Molecular markers in plant genome analysis. **Current Science**, v.77, n.2, p.230-240, 1999.

KAWABE, K.; TRUC, N.T.N.; LAN, B.T.N.; HONG, L.T.T.; ONUKI, M. Quantification of DNA of citrus huanglongbing pathogen in diseased leaves using competitive PCR. **Journal of General Plant Pathology**, v.72, p.355–359, 2006.

KIJAS, J. M.H.; FOWLER, J. C. S.; THOMAS, M. R. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. **Genome**, v.38, p.349-355, 1995.

KIJAS, J.M.H; THOMAS, M. R.; FOWLER, J. C. S.; ROOSE, M. L. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of citrus. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.701-706, 1997.

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

LI, G.; QUIROS, C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. **Theoretical Applied Genetics**, v.103, p.455-461, 2001.

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

LIN, H.; DODDAPANENI, H.; BAI, X.; YAO, J.; ZHAO, X.; CIVEROLO, E.L. Acquisition of uncharacterized sequences from “*Candidatus Liberibacter*”, an unculturable bacterium, using an improved genomic walking method. **Molecular and Cellular Probes**, v.22, p.30–37, 2008.

LOPES, S.A; BERTOLINI, E; FRARE, G.F; MARTINS, E.C; WULFF, N.A; TEIXEIRA, D.C; FERNANDES, N.G; CAMBRA, M. Graft Transmission efficiencies and multiplication of “*Candidatus Liberibacter americanus*” and “*Ca. Liberibacter asiaticus*” in citrus plants. **Phytopathology**, v. 99, n.3, p.301-306, 2009.

LOPEZ, C.E.; ACOSTA, I.F.; JARA, C.; PEDRAZA, F.; GAITAN-SOLIS, E.; GALLEGO, G.; BEEBE, S.; TOHME, J. Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. **Phytopathology**, v. 93, n.1, p.88-95, 2003.

LURO, F.L.; COSTANTINO, G.; TEROL, J.; ARGOUT, X.; ALLARIO, T.; WINCKER, P.; TALON, M.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other citrus species and their effectiveness for genetic mapping. **BMC Genomics**, v.9, n.287, p. 1- 13, 2008.

MACHADO M.A.; COLETTA-Filho, H.D.; TARGON, M.L.N.; POMPEU Jr. J. (1996). Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica**, v.92, p.321-326, 1996.

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 Agronômico e Fundag, 2005.

MALIEPAARD, C.; JANSEN, J.; OOIJEN, J.W.V. Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species : overview and consequences for applications. **Genetics Research Cambridge**, v.70, p.237-250, 1997.

MANJUNATH, K.L.; HALBERT, S.E.; RAMADUGU, C.; WEBB, S.; LEE, R.F. Detection of “Candidatus *Liberibacter asiaticus*” in *Diaphorina citri* and Its Importance in the Management of Citrus Huanglongbing in Florida. **Phytopathology**, v.98, n.4, p.287-389, 2008.

MIKLAS, P.N.; HU, J.; GRUNWALD, N.J.; LARSEN, K.M. Potential application of TRAP (Targeted Region Amplified Polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean. **Crop Science**, v.46, p. 910- 916, 2006.

MILORI, D. A citricultura em risco. [http:// www.agrosoft.org.br/agropag/103543.htm](http://www.agrosoft.org.br/agropag/103543.htm) (10 janeiro 2009).

MORAES, M. C. Mapas de ligação e mapeamento de QTL (Quantitative Trait Loci) em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deng). 2005. 141p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MURRAY, M.G. & W.F. THOMPSON. Rapid isolation of high molecular weight DNA. **Nucleic Acids Res**, v.8, p.4321-4325, 1980.

NOVELLI, V.M.; TAKITA, M.A.; MACHADO, M.A. Identification and analysis of single nucleotide polymorphisms. **Euphytica**, v.227, p.227-137, 2004.

NOVELLI, V.M.; CRISTOFANI, M.; SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.1, p.90-96, 2006.

NICOLOSI, E.; DENG, Z.N.; GENTILR,A.; LA MALFA, S.; CONTINELLA,G.; TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics** , v. 100, p. 1155-1166, 2000.

OLIVEIRA, A.C.; GARCIA, A.N.; NOVELLI, V.M.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Identification of sexual and nucellar citrus seedlings through single and duplex PCR of simple sequence repeat *loci*. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, v.1, p.138-141, 2000.

OLIVEIRA, R.P.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Skewed RAPD markers in linkage maps of citrus. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n.3, p.437-441, 2004a.

OLIVEIRA, R.P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Genetic linkage maps of 'Pera' sweet orange and 'Cravo' mandarin with RAPD markers. **Pequisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n.2, p.159-165, 2004b.

OLIVEIRA, R.P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Integrated genetic map of citrus base on RAPD markers. **Fruits**, v.60, p.187-193, 2005.

PALMIERI D.A., NOVELLI V.M., BASTIANEL M., CRISTOFANI-YALY M., ASTÚA-MONGE G., CARLOS E.F., OLIVEIRA A.C., MACHADO M.A. Frequency and distribution of microsatellites from ESTs of citrus. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, 1009-1018, 2007.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.H.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v.30, n.9, 2002.

REIS, M.S.; TAKITA, M.A.; PALMIERI, D.A.; MACHADO, M.A. Bioinformatics for the Citrus EST Project (CitEST). **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.1024-1029, 2007.

RESENDE, M.D.V. Delineamento de experimentos de seleção para a maximização da acurácia seletiva e progresso genético. **Revista Árbore**, v.19, n.4, p.479-500, 1995.

RESENDE, M.D.V. *Genética Biométrica e Estatística no Melhoramento de Plantas Perenes*, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002, 975p.

RITTER, E.; GEBHARDT, C.; SALAMINI, F. Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. **Genetics**, v.125, p.645-654, 1990.

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

ROOSE, M.L.; CHENG, T.; KUPPER, F. Mapping the citrus genome. **Acta Horticulturae**, v.535, p.25-32, 2000.

RUIZ, C.; ASINS, M.J. Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.826-836, 2003.

SAGARAM, U.S; DEANGELIS, K.M; TRIVEDI, P; ANDERSEN, G.L; LU, S; WANG, N. Bacterial Diversity analysis of huanglongbing pathogen-infected citrus using phyloChips and 16S rDNA clone library sequencing. **Applied and Environmental Microbiology** (in press).

SAITO, K.; MIURA, K.; NAGANO, K.; HAYANO-SAITO, Y.; ARAKI, H.; KATO, A. Identification of two closely linked quantitative trait loci for cold tolerance on chromosome 4 of rice and their association with anther length. **Theoretical and Applied Genetics**, v.103, p.862–868, 2001.

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

SECHLER, A.; SCHUENZEL, E.L.; COOKE, P.; DONNUA, S.; THAVEECHAI, N.; POSTNIKOVA, E.; STONE, A.L.; SCHNEIDER, W.L.; DAMSTEEGT, V.D.; SCHAAD, N.W. Cultivation of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, “*Ca. L. Africanus*”, and “*Ca. L. Americanus*” Associated with Huanglongbing. **Phytopathology**, v.99, n.5, p.480- 486, 2009.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. Estatística Genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados. Viçosa: UFV, 2004.

SHAHSAVAR, A.R.; IZADPANAH, K.; TAFAZOLI, E.; TABATABAEI, B.E.S. Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Scientia Horticulturae**, v.112, p.310–314, 2007.

SIVIERO, A.; CRISTOFANI, M.; BOAVA, L.P.; MACHADO, M.A. Mapeamento de QTLs associados à produção de frutos e semente em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.741-743, 2002.

SIVIERO, A.; CRISTOFANI, M. FURTADO, E.L.; GARCIA, A.A.F.; COELHO, A.S.G.; MACHADO, M.A. Identification of QTLs associated with citrus resistance to *Phytophthora gummosis*. **Journal of Applied Genetics**, v.47, n.1, p.23-38, 2006.

SOARES FILHO, W.S.; MOREIRA, C.S.; CUNHA, M.A.P.; SOBRINHO, A.P.C.; PASSOS, O.S. Poliembrionia e frequência de híbridos em *citrus* ssp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 4, p.857-864, 2000.

SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A. C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. Recursos Genéticos e melhoramento. Fundação MT, p.939-965, 2001.

STATHAKOPOULOS, N.; ERICKSON, L.C. The effect of temperature on bud break in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.89, p.222-227. 1966.

STELL, R.G.D; TORRIE, J.H. Principles and procedures of statistics. A biometrical approach. 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., New York, 1980.

SWINGLE, W.T. The botany of Citrus and its relatives in the orange subfamily. In: WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (eds.). The citrus industry. Berkeley and Los Angeles: University of California Press, v.1, p.128-474, 1943.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (eds.). The citrus industry. Berkeley and Los Angeles: University of California, v.1, p.190-430, 1967.

TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W.; PRINCE, J.P.; de VICENT, M.C.; BONIERBALE, M.W., et al. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, v.132, p.1141-1160, 1992.

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

TATINENI, S.; SAGARAM, U.S.; GOWDA, S.; ROBERTSON, C.J.; DAWSON, W.O.; IWANAMI, T.; WANG, N. In Planta Distribution of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” as revealed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-Time PCR. **Phytopathology**, v.98, n.5, p.592- 599, 2008.

TEXEIRA, D.C.; AYRES, J.; KITAJIMA, E.W.; DANET, L.; JAGOUEIX-EVEILLARD, S.; SAILLARD C.; BOVÉ. J. M. First report of a huanglongbing-like disease of citrus in São Paulo State, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, “*Candidatus Liberibacter americanus*”, with the disease. **Plant Disease**, v.89, p.107, 2005a.

TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J. L.; COSTA, P.I.; AYRES, A.J.; BOVÉ. J. M. “*Candidatus Liberibacter americanus*”, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p. 1857-1862, 2005b.

TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E.C.; WULFF, N.A.; EVEILLARD-JAGOUEIX, S.; YAMAMOTO, P.T.; AYRES, A.J.; BOVE, J.M. Distribution and quantification of “*Candidatus Liberibacter americanus*”, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v.22, p.139–150, 2008.

TEROL, J.; NARANJO, M.A.; OLLITRAULT, P., TALON, M. Development of genomic resources for *Citrus clementina*: Characterization of three deep-coverage BAC libraries and analysis of 46,000 BAC end sequences. **BMC Genomics**, v. 9, p.423, 2008.

VAN OOIJEN J.W.; VOORRIPS, R.E. JoinMap version 3.0: software for the calculation of genetic linkage maps (software). Wageningen. **Plant Research International**, p.51, 2001.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, v.23, n.1, 2005.

- VENCOVSKY, R. Herança quantitativa In: PATERNIANI E.; VIEGAS G.P. (eds.) Melhoramento e Produção de Milho, Campinas, Fundação Cargill, p. 137-214, 1987.
- VOS, P.; HOGERS, R. ; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M; FRIJTERS, A.; POT, J.; JPELEMAN; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, p. 4407-4414, 1995.
- YANG, Z.N.; YE, X.R.; MOLINA, J.; ROOSE, M.L.; MIRKOV, T.E. Sequence analysis of a 282-Kilobase region surrounding the citrus tristeza virus resistance gene (Ctv) locus in *Poncirus trifoliata* Raf. **Plant Physiology**, v.131, p.482-492, 2003.
- YANG, C.; GUO, W.; LI, L.; GAO, F.; LIN, S.; ZHANG, T. QTLs mapping for Verticillium wilt resistance at seedling and maturity stages in *Gossypium barbadense* L. **Plant Science**, v.174, p.290–298, 2008.
- YOUNG, N.D. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. **Annual Review Phytopathology**, v.34, p.479-501, 1996.
- YU J. K., TANG S., SLABAUGH M.B., HEESACKER A. Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower. **Crop Science**, v.43, p.367–387, 2003.
- WANG, Z.; YIN, Y.; HU, H.; YUAN, Q.; PENG, G.; XIA, Y. Development and application of molecular-based diagnosis for “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, the causal pathogen of citrus Huanglongbing. **Plant Pathology**, v.55, p.630–638, 2006.
- WANG, H.M.; LIN, Z.X.; ZHANG, X.L. CHEN, W.; GUO, X.P.; NIE, Y.C.; LI, Y.H. Mapping and QTL analysis of Verticillium wilt resistance genes in cotton. **Plant Science**, v.168, n.6, p.1581-1590, 2007.
- WEISBURG, W. G., BARNS S.M., PELLETIER, D.A. , LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.2, p.697-703, 1991.
- WU J., MAEHARA T., SHIMOKAWA T., YAMAMOTO S., HARADA C., TAKAZAKI Y., ONO N., MUKAI Y., KOIKE K, YAZAKI J, ET AL. A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites. **Plant Cell**, v.14, p.525-535, 2002.
- XU, L.M.; ZHOU, L.; ZENG, Y.W.; WANG, F.M.; ZHANG, H.L.; SHEN, S.Q.; LI, Z.C. Identification and mapping of quantitative trait loci for cold tolerance at the booting stage in a japonica rice near-isogenic line. **Plant Science**, v.174, p. 340–347, 2008.
- XU, S. Quantitative Trait Locus mapping can benefit from segregation distortion. **Genetics**, v.180, p.2201-2208, 2008.

**Anexo 1.** Análise de Variância para os dados do número de cópias da molécula 16S rDNA (Programa SISVAR, FERREIRA., 2000) e teste de comparação de médias (Scott-Knott ao nível de 5% de significância).

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRAS	94	1.107719893E+0012	1.17842541E+0010	3.988	0.0000
erro	188	5.555798781E+0011	2.95521212E+0009		
Total corrigido	282	1.663299771E+0012			
CV (%) =	226.26				
Média geral:	24026.4143110	Número de observações:	283		

Teste Scott-Knott (1974) para a FV AMOSTRAS

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 2,93814432989691  
 Erro padrão: 31714,4925311161

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
103	0.100000	a1
109	0.100000	a1
111	0.100000	a1
90	0.190000	a1
66	0.623333	a1
106	0.810000	a1
78	0.890000	a1
102	1.316667	a1
10	1.650000	a1
133	1.820000	a1
68	1.843333	a1
146	2.276667	a1
2	2.680000	a1
279	4.330000	a1
117	5.056667	a1
42	5.356667	a1
26	5.390000	a1
163	10.246667	a1
141	12.000000	a1
172	13.170000	a1
56	14.080000	a1
1	14.686667	a1
126	18.860000	a1
<i>P. trifoliata</i>	19.740000	a1
179	24.373333	a1
107	25.990000	a1
73	28.360000	a1
108	38.540000	a1
23	41.460000	a1
118	41.776667	a1
135	66.010000	a1
144	70.953333	a1
140	86.540000	a1
293	130.510000	a1
114	158.906667	a1
113	174.486667	a1
20	186.040000	a1
17	208.140000	a1
101	216.533333	a1

**Anexo 1.** Análise de Variância para os dados do número de cópias da molécula 16S rDNA (Programa SISVAR, FERREIRA., 2000) e teste de comparação de médias (Scott-Knott ao nível de 5% de significância). (Continuação)

125	492.400000	a1
70	519.990000	a1
128	544.166667	a1
124	571.356667	a1
19	578.100000	a1
105	655.323333	a1
155	927.676667	a1
190	1041.910000	a1
152	1050.110000	a1
29	1159.840000	a1
148	1249.156667	a1
149	1427.176667	a1
121	1618.156667	a1
24	1639.376667	a1
110	1756.670000	a1
14	2394.330000	a1
4	2405.990000	a1
61	2408.543333	a1
189	2674.236667	a1
145	2806.090000	a1
183	3308.620000	a1
154	3317.130000	a1
191	3461.950000	a1
119	3638.590000	a1
62	3915.140000	a1
184	4162.800000	a1
5	5073.570000	a1
151	5533.723333	a1
150	5760.180000	a1
137	5804.400000	a1
123	6483.186667	a1
116	7635.580000	a1
134	9595.216667	a1
37	11289.406667	a1
131	11663.570000	a1
130	12703.320000	a1
217	13885.240000	a1
49	14959.040000	a1
147	15355.726667	a1
31	15512.330000	a1
35	17001.333333	a1
187	18341.906667	a1
54	28604.070000	a1
136	34567.873333	a1
132	42914.650000	a1
177	71923.206667	a1
176	79581.270000	a1
166	92760.040000	a1
165	118389.366667	a2
160	133091.133333	a2
142	171760.556667	a2
129	174764.930000	a2
143	209123.993333	a2
<i>C. sunki</i>	252278.306667	a3
161	298397.713333	a3
173	330376.270000	a3



**Anexo 2.** Análise de variância para os valores dos Cts (Programa SISVAR, FERREIRA., 2000) e teste de comparação de médias (Scott -Knott ao nível de 5% de significância).

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
SAMPLE_NAM	94	6559.584616	69.782815	4.905	0.0000
erro	190	2703.003067	14.226332		
Total corrigido	284	9262.587683			
CV (%) =	12.16				
Média geral:	31.0062456	Número de observações:	285		

Teste Scott-Knott (1974) para a FV SAMPLE\_NAM

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 2,17763877704151

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
161	22.116667	a1
143	22.470000	a1
173	22.673333	a1
187	23.596667	a1
217	23.910000	a1
54	24.093333	a1
176	24.256667	a1
132	24.440000	a1
142	24.493333	a1
116	24.720000	a1
110	24.723333	a1
165	24.750000	a1
129	24.896667	a1
166	24.920000	a1
160	25.210000	a1
147	25.446667	a1
C. sunki	25.660000	a1
184	25.800000	a1
189	26.280000	a1
123	26.340000	a1
105	26.406667	a1
119	26.493333	a1
4	26.663333	a1
134	26.690000	a1
35	27.146667	a1
145	27.290000	a1
177	27.336667	a1
114	27.400000	a1
14	28.016667	a2
191	28.130000	a2
137	28.190000	a2
31	28.590000	a2
130	28.743333	a2
121	28.886667	a2
62	28.976667	a2
150	29.190000	a2
149	29.270000	a2
154	29.426667	a2

**Anexo 2.** Análise de variância para os valores dos Cts (Programa SISVAR, FERREIRA., 2000) e teste de comparação de médias (Scott -Knott ao nível de 5% de significância). (Continuação)

49	29.470000	a2
155	29.520000	a2
70	29.640000	a2
20	29.690000	a2
17	30.236667	a2
108	30.440000	a2
152	30.526667	a2
131	30.640000	a2
24	30.656667	a2
125	30.676667	a2
5	30.840000	a2
190	30.950000	a2
107	31.266667	a2
128	31.280000	a2
136	31.410000	a2
183	31.426667	a2
37	31.576667	a2
148	31.760000	a3
293	31.880000	a3
101	31.936667	a3
124	32.613333	a3
151	32.653333	a3
113	32.803333	a3
73	32.993333	a3
118	33.030000	a3
61	33.060000	a3
144	33.060000	a3
19	33.863333	a3
126	34.816667	a3
179	34.856667	a3
23	35.073333	a3
68	35.236667	a3
1	35.263333	a3
140	35.833333	a3
42	35.860000	a3
106	35.880000	a3
26	35.970000	a3
102	36.030000	a3
56	36.163333	a3
10	36.380000	a3
2	36.510000	a3
<i>P. trifoliata</i>	36.910000	a3
90	37.150000	a3
135	37.176667	a3
78	37.206667	a3
279	37.316667	a3
146	37.370000	a3
117	37.430000	a3
66	37.573333	a3
172	37.620000	a3
163	37.706667	a3
141	37.833333	a3
133	38.130000	a3
29	38.753333	a3
111	40.000000	a3
103	40.000000	a3
109	40.000000	a3

**Anexo 3.** Análise de variância para os valores do delta Ct (Programa SISVAR, FERREIRA., 2000) e teste de comparação de médias (Scott -Knott ao nível de 5% de significância).

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
SAMPLE_NAM	94	13995.605191	148.889417	9.591	0.0000
erro	190	2949.576667	15.524088		
Total corrigido	284	16945.181858			
CV (%) =	18.00				
Média geral:	21.8862807	Número de observações:	285		

Teste Scott-Knott (1974) para a FV SAMPLE\_NAM

NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3  
 Erro padrão: 2,27479579444678

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
161	7.076667	a1
173	7.483333	a1
143	7.636667	a1
116	9.090000	a1
142	9.100000	a1
176	9.350000	a1
123	9.500000	a1
119	9.580000	a1
165	9.683333	a1
129	9.863333	a1
166	9.873333	a1
160	10.226667	a1
<i>C. sunki</i>	10.653333	a1
177	12.593333	a1
130	13.316667	a1
187	13.793333	a1
128	15.200000	a2
147	15.326667	a2
134	15.933333	a2
54	16.730000	a2
125	16.856667	a2
184	16.910000	a2
155	17.170000	a2
110	17.203333	a2
189	17.246667	a2
137	17.266667	a2
118	17.796667	a2
131	18.466667	a2
121	18.763333	a2
191	18.903333	a2
14	19.376667	a2
4	19.526667	a2
35	19.853333	a2
190	19.973333	a2
62	20.066667	a2
114	20.236667	a2
140	21.030000	a3
70	21.156667	a3
145	21.170000	a3

**Anexo 3.** Análise de variância para os valores do delta Ct (Programa SISVAR, FERREIRA., 2000) e teste de comparação de médias (Scott-Knott ao nível de 5% de significância). (Continuação)

124	21.310000	a3
20	21.470000	a3
154	21.963333	a3
17	21.983333	a3
135	22.110000	a3
<i>P. trifoliata</i>	22.116667	a3
126	22.140000	a3
136	22.233333	a3
183	22.483333	a3
144	22.540000	a3
133	22.730000	a3
141	22.853333	a3
163	23.250000	a3
117	23.316667	a3
37	24.150000	a3
149	24.160000	a3
132	24.370000	a3
172	24.623333	a3
293	24.660000	a3
148	24.906667	a3
150	25.340000	a3
107	25.490000	a3
217	25.556667	a3
179	25.893333	a3
1	25.970000	a3
61	26.016667	a3
49	26.066667	a3
19	26.333333	a3
152	26.483333	a3
5	26.873333	a4
101	27.676667	a4
108	27.736667	a4
279	28.370000	a4
105	28.416667	a4
113	28.480000	a4
73	28.590000	a4
146	28.990000	a4
24	29.036667	a4
102	29.426667	a4
26	29.560000	a4
56	29.586667	a4
66	29.886667	a4
10	29.930000	a4
31	29.946667	a4
42	29.983333	a4
2	30.273333	a4
151	30.280000	a4
106	30.293333	a4
90	30.410000	a4
78	30.443333	a4
68	30.830000	a4
23	31.726667	a4
29	31.726667	a4
109	31.930000	a4
111	32.460000	a4
103	32.830000	a4

**Anexo 4.** Marcadores TRAPs, sequência dos “primers”, tipo de segregação e teste de homogeneidade para segregação mendeliana.

<b>Marcadores</b>	<b>“Forward” (5’→3’)</b>	<b>“Reverse” (5’→3’)</b>	<b>Tipo de segregação**</b>	<b><math>\chi^2</math></b>
F1P1_740***	acagggccaaaggtaaacaca	gactgcgtacgaattaat	--	4,45679012 *
F1P2_800	acagggccaaaggtaaacaca	gactgcgtacgaatttgc	nnxnp	7,19148936*
F1P2_710	acagggccaaaggtaaacaca	gactgcgtacgaatttgc	nnxnp	22,51063828*
F1P2_680	acagggccaaaggtaaacaca	gactgcgtacgaatttgc	lmxll	2,723404254
F1P2_560	acagggccaaaggtaaacaca	gactgcgtacgaatttgc	nnxnp	7,19148936*
F1P3_4.700	acagggccaaaggtaaacaca	gactgcgtacgaattgac	nnxnp	3,130434782
F1P3_3.200	acagggccaaaggtaaacaca	gactgcgtacgaattgac	nnxnp	13,46153846*
F1P3_2.100	acagggccaaaggtaaacaca	gactgcgtacgaattgac	nnxnp	3,967032966*
F1P3_750	acagggccaaaggtaaacaca	gactgcgtacgaattgac	nnxnp	15,69565217*
F1P3_700	acagggccaaaggtaaacaca	gactgcgtacgaattgac	nnxnp	0,04347826
F1P3_490	acagggccaaaggtaaacaca	gactgcgtacgaattgac	lmxll	10,33333333*
F1P3_5.000	acagggccaaaggtaaacaca	gactgcgtacgaattgac	nnxnp	0,103448274
F1P5_780	acagggccaaaggtaaacaca	gactgcgtacgaattaac	lmxll	0,409090908
F1P5_710	acagggccaaaggtaaacaca	gactgcgtacgaattaac	lmxll	37,43010752*
F2P1_850	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattaat	lmxll	0,0114942
F2P1_760	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattaat	nnxnp	5,902439*
F2P1_650	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattaat	lmxll	0,301204818
F2P1_540	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattaat	nnxnp	0,012987012
F2 P2_4.900	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaatttgc	lmxll	0
F2 P2_4.300	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaatttgc	lmxll	20,59574468*
F2 P2_3.500	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaatttgc	nnxnp	30,20430106*
F2P3_610	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattgac	lmxll	13,78723404*
F2P3_570	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattgac	nnxnp	0,170212764
F2P3_390	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattgac	lmxll	0,04255319
F2P3_340	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattgac	nnxnp	8,34042553*
F2P3_320	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattgac	lmxll	0,87096774
F2P4_710	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaatttga	nnxnp	0,103448274
F2P4_580	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaatttga	lmxll	0,550561796
F2P4_540	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaatttga	nnxnp	0,098901098
F2P4_350	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaatttga	nnxnp	2,844444444
F2P5_580	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattaac	nnxnp	0,52688172
F2P5_450	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattaac	nnxnp	0,382978722
F2P5_360	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattaac	lmxll	0,096774192
F2P6_800	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattgca	lmxll	21,04347826*
F2P6_710	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattgca	nnxnp	0,274725274
F2P6_670	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattgca	nnxnp	0,274725274
F2P6_520	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattgca	lmxll	25,6*
F2P6_460	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattgca	lmxll	11,30588235*
F2P6_340	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattgca	lmxll	0,391304346
F2P6_370	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgcgtacgaattgca	lmxll	2,909090908

**Anexo 4.** Marcadores TRAPs, seqüência dos “primers”, tipo de segregação e teste de homogeneidade para segregação mendeliana. (Continuação)

<b>Marcadores</b>	<b>“Forward” (5’→3’)</b>	<b>“Reverse” (5’→3’)</b>	<b>Tipo de segregação**</b>	<b><math>\chi^2</math></b>
F4P1_850	acagggccaaaggtaaac	gactgcgtacgaattaat	nnxnp	9,574468085*
F4P1_380	acagggccaaaggtaaac	gactgcgtacgaattaat	lmxll	26,5957446808*
F4P1_200	acagggccaaaggtaaac	gactgcgtacgaattaat	lmxll	7,1914893617*
F4P3_800	acagggccaaaggtaaac	gactgcgtacgaattgac	lmxll	1,5319148936
F4P4_900	acagggccaaaggtaaac	gactgcgtacgaattga	nnxnp	6,12765957446*
F4P4_400	acagggccaaaggtaaac	gactgcgtacgaattga	lmxll	10,8936170212*
F4P4_150	acagggccaaaggtaaac	gactgcgtacgaattga	lmxll	3,44680851062
F4P5_680	acagggccaaaggtaaac	gactgcgtacgaattaac	lmxll	0,3829787234
F4P5_960	acagggccaaaggtaaac	gactgcgtacgaattaac	lmxll	10,8936170212*

Nível de significância \*  $\alpha = 0,05$  a 1 grau de liberdade (GL), \*\*códigos do programa JoinMap v 3.0 (VAN OOIJEN & VOORRIPS, 2001), referentes aos tipos de segregação para uma população CP (Cross Pollinators) \*\*\* número de pares de base.

**Anexo 5.** Marcadores microssatélites, tipo de repetição, seqüência dos “primers”, tipo de segregação e teste de homogeneidade para segregação Mendeliana.

“Primer”	Repetição	“Forward” (5’→3’)	“Reverse” (5’→3’)	Tipo de segregação**	$\chi^2$
CCSM 09	(AG) <sub>n</sub>	gactggattagattctctg	atggatgtgttatctcactc	lmxll	8,34042553191*
CCSM 11	(TAA) <sub>11</sub>	gatctccctatcatcggcaa	ttttgagggtggatggata	lmxll	0,680851064
CCSM 12	(AG) <sub>n</sub>	gattgaatcttctgtagctc	atcatcatctagtgtcactg	lmxll	3,446808511
CCSM13	(GAA) <sub>7</sub>	gagttgggattctgctgtga	gactgttctctgatgccga	lmxll	5,14893617021*
CCSM 17	(AG) <sub>n</sub>	acatggacaggacaactaag	gttatgatacgtctgtgtcc	lmxll	1,063829787
CCSM 19	(AG) <sub>n</sub>	ggacactgtgactaa	agctaccaagacaccacc	lmxll	0
CCSM 40	(GCAACA) <sub>10</sub>	acaagagtcgcaacaatc	gacaacagtggcaatacc	abxcd	2,085106383
CCSM 46	(GCA) <sub>6</sub> (CAA) <sub>8</sub>	ataccttatcaagtaacacg	tcagaatgagtactagctcc	lmxll	0,042553191
CCSM53	(GTT) <sub>7</sub>	atgacgacatcgacaacg	cgttaccactcaccaatac	lmxll	4,25531914893*
CCSM 57	(CTGCTC) <sub>5</sub>	catctcagactcctgcacca	ccctccaccatatacaagaa	lmxll	0
CCSM 75	(ATC) <sub>8</sub>	ctatcggcaaaggagcagtc	ttctgcaggttaaggttggg	lmxll	7,19148936170*
CCSM 95	(AT) <sub>11</sub>	gcttcttggaaatggagcaag	cgttttctgaggtcacggt	lmxll	22,510638297*
CCSM 111	(GT) <sub>10</sub>	gaagaagaagcagcaggacg	ccccaaaaataaagcagcaa	lmxll	0,170212766
CCSM 146	(ATAG) <sub>5</sub>	gttttcttctgtgtctg	caaaccatctaaagcccaa	lmxll	2,085106383
CCSM 156	(TC) <sub>20</sub>	gtctctgttctgtctcggt	acgaagtgaagtgtgtaatg	abxcd	0,382978723
CCSM 168	(AG) <sub>16</sub>	acttacatgcaaggagagtg	gagacactggaaggtatcaa	lmxll	10,8936170212*
CCSM 170	(GA) <sub>21</sub>	agttgagtactgtgtcgcaa	ctaatggctgagagagttgc	lmxll	3,446808511
CCSM 020	(CTGCTC) <sub>5</sub>	catctcagactcctgcacca	ccctccaccatatacaagaa	nnxnp	0,680851064
CCSM 022	(ATC) <sub>8</sub>	ctatcggcaaaggagcagtc	ttctgcaggttaaggttggg	nnxnp	1,531914894
CCSM 024	(AT) <sub>11</sub>	gcttcttggaaatggagcaag	cgttttctgaggtcacggt	nnxnp	1,531914894
CCSM 026	(GT) <sub>10</sub>	gaagaagaagcagcaggacg	ccccaaaaataaagcagcaa	nnxnp	1,531914894
CCSM 027	(ATAG) <sub>5</sub>	gttttcttctgtgtctg	caaaccatctaaagcccaa	hkxhk	0,042553191
CCSM 049	(GTTGA) <sub>6</sub>	aataagcgtatcagcagcagg	aatcatgaacgggctgaaac	nnxnp	0,170212766
CCSM 050	(GAA) <sub>7</sub>	gagttgggattctgctgtga	gactgttctctgatgccga	lmxll	0,170212766
CCSM 052	(TC) <sub>14</sub>	ctggctcagctctgctcatt	tgtctgtcttctgcttcta	lmxll	1,531914894
CCSM 053	(TAA) <sub>11</sub>	gatctccctatcatcggcaa	ttttgagggtggatggata	nnxnp	2,085106383
CCSM 089	(ATA) <sub>7</sub>	gaggtctcgaagtcacggag	acttatcttgaccgcacga	efxeg	0,680851064
CCSM 091	(GAT) <sub>8</sub>	cggttaataacgccgtcaagt	tacttttaacggcgtcacc	lmxll	0,680851064
CCSM 092	(GCC) <sub>6</sub>	aagcatcgtcaaaagtttggg	ttgatgcatgttctcaaggc	efxeg	9,574468085*
CCSM 097	(TCA) <sub>6</sub>	ccattaacgagaaaacaaaca	caaaaaggggttcaaaagaa	efxeg	0,170212766
CCSM 099	(TCA) <sub>6</sub>	caccacctcgaaaacactt	gccccactgtcacaataaat	lmxll	5,14893617*
CCSM 100	(ATT) <sub>7</sub>	gaaggtgagccaggaccata	cctgatacccggaactgaag	lmxll	0,184568387
CCSM 102	(TCT) <sub>6</sub>	gccccatccaaaaccttatt	gaaggttctgtctctcacc	nnxnp	1,531914894
CCSM 107	(TGG) <sub>6</sub>	ggactccaagcaagcaaaag	ggttgcgtaagtgtggaggt	lmxll	2,723404255
CCSM 109	(AAT) <sub>8</sub>	tcaaagtcgatttctgcacg	catatggttggccgttctt	lmxll	9,5744680851*
CCSM 113	(CAA) <sub>8</sub>	gtgccaacaatagcagcaga	tgtaatgctggcataagcg	lmxll	1,063829787

Níveis de significância: \*  $\alpha= 0,05$  \*\*códigos do programa JoinMap v 3.0 (VAN OOIJEN & VOORRIPS, 2001), referentes aos tipos de segregação para uma população CP (“Cross Pollinators”).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)