

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Biociências
Campus Botucatu

**Mapeamento de QTLs e eQTLs relacionados à resistência à
Phytophthora parasitica (agente causador da gomose dos citros)
em citrandarins**

Rômulo Pedro Macêdo Lima

Botucatu - SP
2016

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Biociências
Campus Botucatu

**Mapeamento de QTLs e eQTLs relacionados à resistência à
Phytophthora parasitica (agente causador da gomose dos citros)
em citrandarins**

Rômulo Pedro Macêdo Lima

Orientador: Dr. Marcos Antonio Machado

Coorientador: Dra. Mariângela Cristofani-Yaly

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do Título de Mestre em Genética.

Botucatu - SP
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lima, Rômulo Pedro Macêdo.

Mapeamento de QTLs e eQTLs relacionados à resistência à *Phytophthora parasitica* (agente causador da gomose dos citros) em citrandarins / Rômulo Pedro Macêdo Lima. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Marcos Antonio Machado

Coorientador: Mariângela Cristofani-Yaly

Capes: 20203004

1. Cítricos - Doenças e pragas - Controle. 2. Expressão gênica. 3. *Phytophthora parasitica*. 4. Mapeamento cromossômico. 5. Fungos.

Palavras-chave: Citros; Expressão gênica; Gomose; Mapas genéticos de ligação; Marcadores DArT-seq.

Agradecimentos

A Deus por minha vida, a de meus familiares e amigos.

Ao meu orientador Dr. Marcos Antonio Machado, pela orientação e confiança.

À minha coorientadora Dra. Mariângela Cristofani-Yaly, pelos ensinamentos passados ao longo desses dois anos e pela imensurável contribuição neste trabalho.

Aos professores Dr. Ivan Maia e Dr. Evandro Schinor, pelas enormes contribuições e sugestões transmitidas no exame geral de qualificação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos; à UNESP em Botucatu e ao Programa de Pós-graduação em Genética, pelo acolhimento e oportunidade de ser membro discente do Mestrado; e ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira, bem como toda sua equipe de funcionários, pelo apoio e exemplo de dedicação à pesquisa na área da citricultura.

Aos estagiários Natália Coelho, Érika Nascimento e Luiz Henrique, pelo auxílio na coleta de folhas e maceração do material vegetal; à Tatiany Soratto, pela ajuda na inoculação das plantas e discussões sobre o trabalho; à Me. Kelly Aparecida, pelas dicas passadas sobre PCR convencional; ao Dr. Leonardo Boava, pelo desenho dos primers e sugestões sobre a doença gomose dos citros; à Carolina Munari e ao Me. Heros Máximo, pelo auxílio na avaliação de genes normalizadores; ao Dr. Ronaldo Dalio, pelas sugestões e contribuições logo quando iniciei o Mestrado; ao Me. Tiago Oliveira, pelo auxílio nas práticas de laboratório e na extração de RNA; à Me. Gabriella Arena, pela grande ajuda na avaliação dos dados e análises estatísticas de RT-qPCR; e à Me. Maiara Curtolo, pela imensurável contribuição na parte do mapeamento de QTLs e eQTLs.

A todos os meus colegas de laboratório e amigos de alojamento, pelas palavras de incentivo, momentos de desespero e relação de carinho, em especial a Inaiara Pacheco, Tatiane Cunha, Diogo Galdeano, Camila Chabi, Larissa Bonevaes, Letícia Mitre, Reinaldo Rodrigues, Simone Cristina, Fábio Barufaldi, Laura Melissa, César Augusto, Nicholas Vinícius, Karina Salomão, Thamara Azevedo e Cristiano Barbalho.

A toda galera da Biologia e professores da UESB, pelos momentos de descontração, ensinamentos e trocas de motivação à distância.

Ao professor Dr. Antonio Carlos de Oliveira, por ter me iniciado nas pesquisas, enfim, por ser meu “pai científico”.

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

À minha mãe, Vanuza Macêdo, pela paciência e amor incondicional, por sempre ter me dado apoio e incentivo; e ao meu pai Eurípedes Rocha Lima (*in memoriam*), por a cada caminho sempre me transmitir forças e coragem para avançar.

À minha eterna namorada e companheira Jakeline Santos, por a cada devaneio e ansiedade me acalmar, pelo amor e ajuda sobre genética durante esses seis anos.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Epígrafe

“Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender.”

Clarice Lispector

Resumo

Phytophthora nicotianae Breda de Haan (*Phytophthora parasitica* Dastur) e *Phytophthora citrophthora* (Smith & Smith), agentes causadores da gomose e podridão radicular, têm trazido graves danos em viveiros e pomares de citros no mundo inteiro. O Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC vem realizando um amplo programa de melhoramento genético de citros via cruzamentos dirigidos com relação ao patossistema *Phytophthora*-citros, em que já foram verificadas diferenças no nível de resistência na progênie do cruzamento entre tangerina Sunki (*Citrus sunki*) e trifoliata Rubidoux (*Poncirus trifoliata*), a partir da detecção de genes diferencialmente expressos utilizando microarranjos, identificando transcritos envolvidos na resistência à *Phytophthora*, e do mapeamento genético. Este trabalho teve como objetivo principal mapear nos grupos de ligação dos mapas de *P. trifoliata* e *C. sunki* as regiões genômicas associadas à resistência à *Phytophthora parasitica* por meio de análise fenotípica (QTLs) e de expressão (eQTLs). Uma população de 110 híbridos, seus genitores e dois porta-enxertos de referência para a citricultura (limão Cravo e citrumelo Swingle), foi enxertada em limão Cravo e estabelecida em casa de vegetação. Cada híbrido foi conduzido com uma única haste e a inoculação foi realizada pelo método do disco a partir do meio de cultura contendo o micélio de *P. parasitica*, a 10 cm e 15 cm acima da região da enxertia, totalizando duas inoculações por genótipo. As plantas foram mantidas em ambiente com iluminação artificial e fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25°C e umidade relativa (UR) de 85%, com irrigações diárias. As lesões decorrentes foram avaliadas após 60 dias da inoculação, medindo-se o comprimento da área lesionada (CL) após a remoção da casca do ramo. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com duas repetições do mesmo genótipo e uma planta por parcela. Constataram-se diferenças entre os híbridos, com os CL variando de 1,15 a 11,13 mm. A herdabilidade do caráter foi de 65%. Para o mapeamento de QTLs e eQTLs (QTLs de expressão), mapas de ligação foram previamente construídos de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux e *Citrus sunki* Hort. ex Tan. com o uso de marcadores DArT-seqTM e utilizando a estratégia *pseudo-testcross*. Foram detectados três QTLs associados à resistência à *Phytophthora* presentes nos grupos de ligação 2, 7 e 10 do mapa de *P. trifoliata*, e apenas um QTL no grupo de ligação 2 de *C. sunki*. A proporção da variação fenotípica, explicada pelo QTL, variou de 1,77% a 7,41% para o genitor trifoliata Rubidoux, enquanto que o QTL detectado no mapa da tangerina Sunki, explicou 16,8% do fenótipo. Esses resultados sugerem que há grande possibilidade de sucesso na seleção de híbridos resistentes dentro do experimento. Além disso, 19 genes possivelmente envolvidos em processo de respostas de defesa da planta à infecção do patógeno foram avaliados e validados na população de 51 híbridos selecionados e genitores. As análises dos dados de expressão gênica, bem como as correlações fenotípicas e genotípicas, demonstram uma enorme variação intra e intergrupos quanto à ativação das vias dos fitormônios relacionados à resistência em plantas, sugerindo que os citrandarins possuem diversas estratégias para controlar a infecção do oomiceto. Essas informações possibilitaram localizar regiões genômicas associadas à resistência pela análise dos dados de expressão gênica. Para identificação dos eQTLs, os genes selecionados foram quantificados por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Foram detectados 74 eQTLs associados à resistência à *Phytophthora* no mapa de *P. trifoliata*, e 90 eQTLs no de *C. sunki*. A proporção da variação genotípica, explicada pelo eQTL, variou de 0 a 13,66% para o genitor trifoliata Rubidoux, enquanto que no mapa da tangerina Sunki, variou de 0 a 18,87%. Os

resultados do mapeamento de QTLs e eQTLs sugerem que a resistência de alguns citrandarins frente à inoculação de *P. parasitica* seja devido a uma combinação favorável de QTLs e eQTLs transmitidos pelos dois genitores, com a tangerina Sunki parecendo ter uma contribuição maior para passar alelos de resistência à progênie.

Palavras-chave: citros, gomose, expressão gênica, marcadores DArT-seq, mapas genéticos.

Abstract

Phytophthora nicotianae Breda de Haan (*Phytophthora parasitica* Dastur) e *Phytophthora citrophthora* (Smith & Smith), causative agents of gummosis and root rot, have brought serious damage in nurseries and citrus groves worldwide. The Citrus Center Sylvio Moreira/IAC has been conducting an extensive citrus breeding program by directing crossings regarding pathosystem *Phytophthora* - citrus, where differences have been observed in the level of resistance in the progeny of the cross between Sunki mandarin (*Citrus sunki*) and trifoliolate Rubidoux (*Poncirus trifoliata*), from the detection of differentially expressed genes using microarray identifying transcripts involved in resistance to *Phytophthora* and genetic mapping. This work aimed to map the binding groups of *P. trifoliata* and *C. sunki* maps the genomic regions related to the resistance of *Phytophthora parasitica* by phenotypic analysis (QTLs) and expression (eQTLs). A population of 110 hybrids, their genitors and two reference rootstocks for citrus (Rangpur lime and Swingle citrumelo) was grafted at Rangpur lime and established in the greenhouse. Each hybrid was conducted with a single rod and the inoculation was performed by the disk method from the culture medium containing the mycelium of *P. Parasitica*, 10 cm and 15 cm above the grafted area, totaling two inoculations per genotype. The plants were kept in a room with artificial light and a 16 hour photoperiod, 25°C and relative humidity (RH) of 85%, with daily irrigations. The resulting lesions were evaluated 60 days after inoculation, by measuring the length of the damaged area (CL) after the branch bark removal. The experimental design was completely randomized with two repetitions of the same genotype and one plant per plot. We observed differences between hybrids, with CL ranging from 1.15 to 11.13 mm. The character's heritability was 65%. For the QTLs and eQTLs (QTL expression) mapping, linkage maps were previously constructed from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux e *Citrus sunki* Hort. ex Tan. by DArT-seqTM markers and using the pseudo-testcross strategy. Three QTLs were identified associated with resistance to *Phytophthora* in the linking groups 2, 7 and 10 of *P. trifoliata* map, and only one QTL on linkage group 2 of *C. sunki*. The proportion of the phenotypic variation explained by QTL ranged from 1.77% to 7.41 % for the genitor trifoliolate Rubidoux while detected at the Sunki mandarin map explain 16.8% of the phenotype. These results suggest that there is great possibility of success in the selection of resistant hybrids within the experiment. Furthermore, 19 genes possibly involved in the process of plant defense responses to pathogen infection were assessed and validated in the population of 51 selected hybrids and genitors. The analysis of gene expression data and the genotypic and phenotypic correlations show a huge variation within and between groups as the activation of plant hormone pathways related to resistance in plants, suggesting that citrandarins have several strategies to control the oomycete infection. These informations made it possible to locate genomic regions associated with resistance by analysis of gene expression data. To identify eQTLs, selected genes were quantified by quantitative real time PCR (RT- qPCR). Seventy-four eQTLs were detected associated with resistance to *Phytophthora* in *P. trifoliata* map, and 90 eQTLs in *C. sunki*. The proportion of genotype variation explained by eQTL ranged from 0 to 13.66% for the genitor trifoliolate Rubidoux while at the Sunki mandarin map ranged from 0 to 18.87 %. QTLs results and eQTLs suggest that the resistance of some citrandarins front of the inoculation of *P. parasitica* is due to a favorable combination of QTLs and eQTLs transmitted by both genitors, with Sunki mandarin seeming to have a greater contribution to pass alleles resistance to progeny.

Keywords: citrus, gummosis, gene expression, DArT-seq markers, genetic maps.

Sumário

1.	Introdução e Justificativa	12
2.	Revisão bibliográfica.....	16
2.1.	Importância da Citricultura.....	16
2.2.	O melhoramento genético de porta-enxertos dos citros	17
2.3.	O gênero <i>Poncirus</i> , a Tangerina Sunki e os citrandarins	19
2.4.	A gomose dos citros	20
2.5.	Controle da gomose dos citros	26
2.6.	Mecanismos de defesa dos citros à gomose	27
2.6.1.	Imunidade vegetal.....	27
2.6.2.	Resistência sistêmica e fitormônios sinalizadores da resposta imune.....	32
2.6.2.1.	Ácido salicílico (SA)	35
2.6.2.2.	Ácido jasmônico (JA), etileno (ET) e ácido abscísico (ABA)	40
2.7.	O uso de marcadores moleculares pelos programas de melhoramento genético e expressão gênica global por RT-qPCR	45
2.7.1.	Marcadores DArT-seq	47
2.7.2.	RT-qPCR para estudos de expressão gênica.....	48
2.8.	A construção de mapas genéticos, o mapeamento de QTLs e eQTLs na interação patógeno-hospedeiro.....	51
3.	Objetivos	57
3.1.	Objetivo geral	57
3.2.	Objetivos específicos	57
4.	Material e métodos.....	58
4.1.	Multiplicação e manutenção do material vegetal.....	58
4.2.	Isolamento e manutenção de <i>P. parasitica</i>	58
4.3.	Inoculação do patógeno	59
4.4.	Fenotipagem – avaliação das lesões	60
4.5.	Análises estatísticas dos dados fenotípicos	60
4.6.	Genotipagem e construção dos mapas genéticos de ligação.....	61
4.7.	Mapeamento de QTLs.....	63
4.8.	Expressão gênica.....	63
4.8.1.	Coleta de folhas, extração de RNA e síntese de cDNA	63
4.8.2.	RT-qPCR (PCR Quantitativo em Tempo Real) para validar a expressão gênica....	64
4.8.3.	Normalização dos dados de RT-qPCR e análises de expressão gênica.....	68
4.8.4.	Análises de correlação e perfil de expressão gênica global.....	70
4.9.	Mapeamento de eQTLs	71
5.	Resultados e discussão	72
5.1.	Avaliação das lesões causadas por <i>Phytophthora parasitica</i>	72
5.2.	Testes de normalidade dos dados fenotípicos.....	73

5.3.	Análises estatísticas dos dados fenotípicos.....	74
5.4.	Construção dos mapas genéticos	80
5.5.	Análise e Mapeamento de QTLs	82
5.6.	Genotipagem para os ensaios de expressão gênica e o mapeamento de eQTLs ..	88
5.6.1.	Avaliação da extração de RNA das plantas	88
5.6.2.	Validação dos <i>primers</i> específicos para os genes candidatos.....	89
5.6.3.	Normalização dos dados de RT-qPCR pela avaliação de genes endógenos	90
5.6.4.	Avaliação dos padrões de expressão em genes candidatos.....	93
5.6.4.1.	Via do SA.....	96
5.6.4.2.	Vias do JA/ET.....	106
5.6.4.3.	Vias do JA/ABA	112
5.6.5.	Teste de normalidade dos dados de expressão gênica	117
5.6.6.	ANOVA dos dados de expressão gênica entre os grupos fenotípicos.....	118
5.6.7.	Análises de correlação linear de Pearson.....	121
5.6.8.	Perfil de expressão gênica global do experimento e matriz de dissimilaridade entre os genes	124
5.6.9.	Análise e mapeamento de eQTLs	128
6.	Considerações Finais.....	141
7.	Referências bibliográficas	144

1. Introdução e Justificativa

A citricultura é uma importante cadeia produtiva do agronegócio brasileiro, em termos econômicos e sociais. Em 2013, a produção mundial de citros situou-se em 121,3 milhões de toneladas, sendo a China (24,4%), Brasil (15,64%) e EUA (7,75%) os principais produtores. O Brasil (24,45%) é o maior produtor de laranja, vindo a seguir a China (11%) e os EUA (9,84%), enquanto que em tangerinas o grande destaque na produção é a China (57,2%) seguindo-se, com parcelas muito inferiores, a Espanha (6,48%) em segundo lugar e o Brasil (3%) em sexto lugar (FAO, 2015).

O plantio de diferentes variedades nos pomares é de extrema importância para a citricultura, pois ganha-se em termos de produtividade, com a estratificação da colheita ao longo do ano, e também em termos fitossanitários, o que faz com que haja um maior controle de doenças e um menor impacto das alterações climáticas. Esse tem sido o enfoque de pesquisas feitas ultimamente em torno da citricultura, com o emprego do melhoramento genético tradicional para diversificar as culturas citrícolas, tendo em vista o combate às doenças que as afetam. Assim, São Paulo se destaca nesse sentido, com o Centro de Citricultura Sylvio Moreira desenvolvendo pesquisas em busca de novas variedades copa e porta-enxertos de citros tolerantes e resistentes a diversas doenças, como por exemplo, ao cancro crítico e ao *huanglongbing* (HLB), além de implementar o melhoramento genético em busca de variedades com épocas de maturação diferentes das tradicionais, mais precoces ou mais tardias (Zulian *et al.*, 2013). Híbridos de *Poncirus trifoliata* e *Citrus sunki* foram obtidos e estão sendo estudados no Centro de Citricultura, os quais já se mostram tolerantes à MSC (morte subida dos citros), gomose e seca, e podem ser indicados como porta-enxertos alternativos para a citricultura brasileira (Cristofani-Yaly *et al.*, 2005).

Pertencentes à família Rutaceae, e principalmente ao gênero *Citrus*, as variedades são constituídas pelas laranjas doces, tangerinas, limões, limas ácidas e pomelos, tendo também outros representantes menos importantes, como as toranjas, limas doces, laranjas azedas e cidras (Donadio *et al.*, 1998).

O *Poncirus*, um gênero relacionado ao *Citrus*, se destaca por apresentar resistência ao frio, possui alta resistência à *Phytophthora*, ao vírus da tristeza dos citros e ao nematoide dos citros *Tylenchulus semipenetrans* (Swingle, 1967; Hutchison & O'Bannon, 1972; Hearn *et al.*, 1974; Yelenosky *et al.*, 1974).

As tangerinas ou mandarinas pertencem ao gênero *Citrus*, que apresenta uma enorme variedade de espécies. Muitas são utilizadas em programas de melhoramento genético como porta-enxertos, merecendo destaque e para fins de citação a tangerina Sunki (*C. sunki* Hort. ex Tan.), que faz parte do grupo das microtangerinas (Donadio *et al.*, 1998). A tangerina Sunki apresenta resistência à tristeza, à MSC e tolerância a solos salinos e à seca. Entretanto, possui alta suscetibilidade à *Phytophthora* (Feichtenberger, 2001; Pompeu Junior, 2005; Schinor *et al.*, 2011).

Gomose e podridão de raízes causada por *Phytophthora* estão entre as doenças de maior importância econômica dos citros. *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (*Phytophthora parasitica* Dastur) e *Phytophthora citrophthora* (Smith & Smith) têm causado graves danos em viveiros e pomares de citros no mundo inteiro. No Brasil, *P. parasitica*, oomiceto que pertence ao reino Stramenopila, é a espécie predominante associada com a doença (Medina Filho *et al.*, 2004). Estes patógenos infectam as principais ramificações das plantas, induzindo a formação de cancrios com exsudação de goma, aparecimento de áreas mortas na casca e ressecamento, bem como fendilhamento longitudinal da casca, conjuntura que faz com que as plantas geralmente percam vigor e possam vir a morrer prematuramente (Alvarez *et al.*, 2009; Queiroz & Melo, 2006). No que diz respeito à área interna, a coloração dos tecidos afetados da casca e do lenho apresenta-se logo de início amarela, para depois ficar pardacenta. Com uma ampla gama de fatores que podem intensificar a incidência da doença, entre os quais o clima e a suscetibilidade da variedade, o desenvolvimento da lesão ocorre no sentido longitudinal, com altura variável, e lateral, podendo abranger grande parte da circunferência do tronco afetado, situação em que a planta morre (Gasparotto *et al.*, 1998).

O emprego de porta-enxertos resistentes a esse patógeno constitui no método mais eficiente para o controle da doença, e isso tem sido feito em programas de melhoramento genético como o desenvolvido pelo Centro de Citricultura Sylvio Moreira - IAC, em Cordeirópolis (SP), de modo a buscar híbridos que tenham características de interesse agrônomo e que ao mesmo tempo, possuam a resistência à *Phytophthora* spp. (Boava *et al.*, 2003; Medina Filho *et al.*, 2003).

Os mecanismos de resistência de citros à *Phytophthora* ainda são mal entendidos. Podem ser divididos em duas categorias, aqueles em que há uma resistência geral (respostas comuns a todas as espécies de plantas afetadas por

fitopatógenos, como as reações de hipersensibilidade, o desenvolvimento de barreiras estruturais e a produção de fitoalexinas) e aqueles que são específicos à planta (respostas específicas a uma dada população de *Phytophthora* e controladas por genes de resistência no hospedeiro) (Hammerschmidt, 1999). Devido às grandes diferenças de tipos de tecido afetado e conseqüentemente, das respostas de diferentes espécies de citros à infecção, sabe-se que há mais de um mecanismo de resistência e/ou tolerância que estão envolvidos. Diversas pesquisas que empregam avaliações quantitativas em genótipos de citros quanto à suscetibilidade para gomose feitas em todo o Brasil, indicam *Poncirus trifoliata* e citrumelo Swingle, um híbrido de trifoliata com pomelo, como tolerantes tanto à podridão do pé quanto ao da raiz, sendo ambos resistentes para conter a infecção (Graham & Timmer, 2003).

Em um estudo sobre o patossistema *Phytophthora*-Citros realizado no Centro de Citricultura Sylvio Moreira, utilizando uma população obtida do cruzamento entre trifoliata Rubidoux (*Poncirus trifoliata*) e tangerina Sunki (*Citrus sunki*), foram verificadas diferenças no nível de sintomas tanto nos genitores quanto na progênie (Siviero *et al.*, 2006).

Existem na literatura científica trabalhos que relatam os últimos esforços feitos por programas de melhoramento genético de citros na busca de resistência à *Phytophthora parasitica* e, conseqüentemente, na tentativa de descrever a base molecular da resposta do hospedeiro à doença da gomose (Boava *et al.*, 2011a; Boava *et al.*, 2011b). Esses estudos relataram sobre as mudanças nos perfis de expressão global de genes e mostraram genes diferencialmente expressos envolvidos em uma série de processos tais como a defesa celular, fotossíntese e metabolismo de carboidratos. Os genes de defesa são ativados em resposta à infecção do patógeno por mecanismos de transdução de sinais regulados pela ação de hormônios vegetais e suas vias bioquímicas, sendo as mais comuns àquelas que pertencem o ácido salicílico (SA), o ácido jasmônico (JA) e o etileno (ET) (Fernandes *et al.*, 2009).

As características agrônômicas quantitativas de culturas vegetais estão submetidas à ação de múltiplos locos, os chamados poligenes, responsáveis por pequenos efeitos no fenótipo, o que ocasiona uma variação contínua dada pela própria segregação genotípica, ao efeito ambiental e também interação entre estes dois fatores: o genótipo e o ambiente. Por esse motivo, os chamados QTLs (Quantitative Trait Loci) têm sido bastante estudados em programas de

melhoramento genético a fim de associá-los a mapas genéticos, os quais, quando construídos, permitem fazer correlações fenotípicas confiáveis a partir da genotipagem de uma progênie. Sendo assim, o estudo da expressão gênica vinculada à interação patógeno-hospedeiro e a identificação, o mapeamento e a quantificação do efeito de QTLs, é de grande importância para a compreensão dos genes potencialmente associados à causa da doença na planta (Siviero *et al.*, 2002b; Boava, 2004b; Toledo *et al.*, 2008).

Entre as várias ferramentas disponíveis de genética molecular para auxílio ao melhoramento, os mapas genéticos baseados na frequência de recombinação entre marcadores polimórficos em uma progênie, tornaram-se ferramentas fundamentais para acelerar o processo de seleção de marcadores associados a caracteres quantitativos (Danan *et al.*, 2011). Dessa forma, o mapeamento genético tem sido empregado em programas de melhoramento de citros, a fim de buscar genes e/ou locos de caracteres quantitativos (QTLs) relacionados à resistência a *Phytophthora*, dentre outros problemas fitossanitários. Além disso, outras técnicas de biologia molecular para análise de expressão gênica diferencial tais como microarranjos, RNA-Seq e RT-qPCR, permitem avaliar junto com os mapas de ligação uma população híbrida e seus genitores, identificando regiões genômicas que, quando acessadas, explicam a variação de transcritos em genes co-regulados quanto à resposta à gomose causada por *Phytophthora* (Oliveira *et al.*, 2014).

A genética genômica surge como uma técnica que engloba o mapeamento de locos quantitativos e análises de expressão gênica para identificar a associação entre o estado alélico de uma região do genoma e a quantificação dos transcritos gênicos (Jansen & Nap, 2001). Tais regiões genômicas são denominadas como QTLs de expressão (eQTLs), e permitem que se mensure a variação da expressão gênica entre populações de indivíduos segregantes, determinando uma região cromossômica que atua no processo de expressão de um gene para uma dada característica (Schadt *et al.*, 2003). Sendo assim, o estudo de eQTLs é de grande importância para o entendimento da interação patógeno-hospedeiro, a fim de compreender os mecanismos de resistência e resposta às doenças.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Importância da Citricultura

No mundo, a citricultura se destaca como uma das atividades agrícolas e agroindustriais mais importantes, devido às frutas cítricas serem amplamente consumidas *in natura* e muito usadas em bebidas industriais. Sendo assim, constitui-se como um dos setores agrícolas mais competitivos do agronegócio, com o Brasil em destaque. Em meados de 2007, o país apresentou 30% da produção mundial de laranja e 59% da de suco de laranja, possuindo um sistema citrícola que movimenta bilhões de reais por ano, de modo a criar milhares de empregos diretos e indiretos, o que gera até hoje várias inovações em pesquisa, tecnologia e logística (Neves *et al.*, 2007).

Com uma grande participação no agronegócio brasileiro, demonstrado pelo seu PIB, que em 2009 chegou a US\$ 6,5 bilhões, o setor citrícola contribui de forma significativa para a economia do Brasil, tanto no interior quanto no exterior. O resultado disso encontra-se na geração de empregos, na formação de capital e renda, na agregação de valor e no desenvolvimento regional. Além disso, a citricultura do país nos últimos tempos tem se tornado mais dinâmica, dando iguais oportunidades de mercado aos pequenos produtores e às grandes empresas, que juntos estão mais coordenados em detrimento a uma maior exigência de qualidade do fruto e acesso a novos mercados (Zulian, 2013).

Dados da FAO (2015) revelam que o maior produtor mundial de laranja é o Brasil, produzindo uma safra de 16,850 milhões de toneladas em 2013, o equivalente a 24,45% do total produzido no mundo. A laranja brasileira é cobiçada por diversos países em diferentes regiões do planeta, sendo que os principais parceiros comerciais para seu destino são a Holanda, a Arábia Saudita e a Espanha.

Com relação às tangerinas, o Brasil apresenta menor participação no mercado mundial, diferindo das laranjas por sua produção se voltar quase que exclusivamente ao consumo de frutas *in natura*. A maior produção brasileira se deu em 2010 quando comparada a anos anteriores e posteriores, com o alcance de 1,122 milhões de toneladas. Em 2013, o país ocupou a posição de 6º lugar entre os maiores produtores mundiais dessa fruta, ficando atrás de países como a China, Espanha, Marrocos, Turquia e Egito (Rappa, 2004; FAO, 2015).

Para atingir a base sólida de eficiência e liderança, a citricultura brasileira passou por fases de prosperidade e declínio, em que chegou a caminhar praticamente sozinha, com intervenção do governo federal e estadual apenas na área de pesquisa e extensão rural. Após o desenvolvimento da indústria de suco concentrado, com início na década de 1960, houve uma expansão da área plantada e de produção da cultura dos citros até fins da década de 1990, em virtude da demanda crescente de matéria-prima. E foi nessa perspectiva que São Paulo passou a ter a citricultura como uma das principais atividades agrícolas do Estado, sendo referência nacional, a ponto de investir constantemente no setor, seja na área de pesquisa, seja em termos de produtividade, buscando se adaptar às condições e ameaças da terra, como doenças, pragas e adversidades causadas por estresse hídrico (Caser & Amaro, 2004).

Em termos de produção mundial de suco de laranja, que é uma das bebidas mais tomadas no mundo, São Paulo deteve no ano de 2010 mais da metade (53%) do total, e a Flórida veio em seguida, nos EUA, com 28%. Demonstra-se, então, o quanto a citricultura é importante para o Estado paulista, o qual faz parte do chamado cinturão citrícola junto com o Triângulo Mineiro, contribuindo para a maior parte das laranjas produzidas no país. Nos últimos tempos, a citricultura brasileira tem passado por mudanças a fim de se manter no patamar da produtividade, e é em São Paulo que essas transformações são mais notáveis, tanto no padrão tecnológico quanto na inovação científica. Dentre os fatores que desencadearam esse cenário, tem-se a utilização de mudas de melhor qualidade, oriundas de viveiros telados com procedência genética, melhores combinações de porta-enxerto, passando a ter variedades mais adaptadas a cada tipo de solo e clima, bem como a qualidade do controle fitossanitário (Neves *et al.*, 2010).

2.2. O melhoramento genético de porta-enxertos dos citros

A influência do uso de porta-enxertos para a cultura dos citros traz vários benefícios à citricultura, contribuindo para a melhoria de uma série de características físico-químicas (absorção, síntese e utilização de nutrientes, transpiração e composição química das folhas, resposta a produtos de abscisão das folhas e frutos, coloração da casca e do suco, bem como acidez e teor de açúcar do suco), biológicas (porte, precocidade de produção e longevidade das plantas, maturação e permanência de frutos na planta, além de tolerância a doenças e pragas agrícolas) e

também àquelas relacionadas a fatores abióticos (frio, salinidade e seca, conservação na pós-colheita, produtividade e qualidade dos frutos) (Pompeu Junior, 1991).

A combinação de porta-enxerto e copa pode garantir ao produtor vantagens para o plantio de determinada espécie de citros menos propensa ao clima e solo de determinada área. Tal fenômeno é possível devido ao desenvolvimento do sistema radicular do porta-enxerto mais adaptado àquela região, característica que está intrinsicamente relacionada à tolerância ao frio, a seca, a doenças e a pragas da copa (Pompeu Junior, 2005).

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

A partir do histórico e evolução da utilização de porta-enxertos para a citricultura, principalmente no Estado de São Paulo, observa-se que o limão Cravo foi líder no *ranking*, devido à precocidade, alta produtividade da variedade-copa, trazendo boas safras a partir de três anos de idade e sendo bem adaptado a períodos de seca, que atinge a citricultura paulista frequentemente, além de ser tolerante ao vírus da tristeza. Entretanto, o limão Cravo é suscetível a doenças como a gomose ou podridão do colo e também à MSC (Morte Súbita dos Citros). Portanto, os programas de melhoramento de citros estão cada vez mais desenvolvendo pesquisas que indiquem o uso de outros porta-enxertos em substituição ao limão Cravo, de forma a aproveitar a variabilidade genética que os citros têm a oferecer (Cristofani-Yaly *et al.*, 2005).

A propagação sexuada por sementes, que se caracteriza pela produção de citros com um período juvenil duradouro e intenso desenvolvimento vegetativo, faz com que a planta não se torne produtiva nos primeiros cinco a oito anos. Como alternativa para os problemas citados acima e para aquelas plantas que possuem frutos sem sementes, como as laranjas-de-umbigo e as tangerinas Satsumas, tem-se a propagação assexuada ou vegetativa, tendo como principal método para fins

comerciais a borbulhia em “T” invertido, que apresenta várias vantagens, a saber: precocidade para a produção, adaptação a vários solos e resistência a doenças. Sendo assim, o melhoramento genético de porta-enxertos é bastante utilizado na citricultura, com a enxertia sendo o principal método de propagação, em que se empregam as melhores combinações de uma variedade-copa com um porta-enxerto mais adequado a uma determinada condição, resultando em ganhos de tolerância e produtividade (Sempionato *et al.*, 1997).

A técnica do melhoramento genético em citros associa, então, a identificação e caracterização de genitores geneticamente distintos, realizando cruzamentos interespecíficos a fim de se obter híbridos, de maneira a contribuir para a ampliação da variabilidade genética nas populações segregantes (Bered *et al.*, 1997; Valle, 2002). Tal prática é feita em programas de melhoramento genético como o realizado pelo Centro APTA Citros Sylvio Moreira, o qual investe cada vez mais em pesquisa e na produção de porta-enxertos sadios e de maior qualidade agrônômica para a citricultura, por intermédio da retirada de borbulhas das plantas-matrizes em seus viveiros telados.

2.3. O gênero *Poncirus*, a Tangerina Sunki e os citrandarins

Dentre os diversos gêneros que constituem as frutas cítricas, tem-se o *Poncirus*, que se destaca por apresentar resistência ao frio. Outro fator característico desse gênero corresponde à formação de plantas com pequeno tamanho e ao mesmo tempo, produção de frutos com alta qualidade (Pompeu Junior & Blumer, 2014).

Espécies desse gênero possuem alta resistência à *Phytophthora*, a exemplo do trifoliata Rubidoux [*P. trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux], considerada também resistente ao vírus da tristeza dos citros. Tal espécie mostra-se altamente tolerante a solos encharcados, e seus híbridos comportam-se como resistentes ao nematoide dos citros *Tylenchulus semipenetrans* (Swingle, 1967; Hearn *et al.*, 1974; Hutchison & O'Bannon, 1972; Yelenosky *et al.*, 1974).

Pertencentes ao gênero *Citrus* e originadas provavelmente do nordeste da Índia e sul da China, as tangerinas ou mandarinas possuem uma ampla diversidade de espécies, sendo usadas frequentemente em programas de melhoramento genético como porta-enxertos. Apresentam grande adaptação a regiões diferentes devido à variedade de espécies existentes e também de híbridos, a ponto das

tangerinas comuns como, por exemplo, a ‘Ponkan’, ter melhor adaptação em clima semitropical a tropical, enquanto outras como as do grupo das mexericas, em climas mediterrâneos subtropicais (Davies & Albrigo, 1994; Donadio *et al.*, 1998).

A tangerina Sunki (*C. sunki* Hort. ex Tan.), membro do grupo das microtangerinas, é bastante indicado como porta-enxerto para copas cítricas por não apresentar problemas de incompatibilidade, apresentando diversos caracteres agrônômicos desejáveis, como vigor, boa produtividade de frutos, resistência a diversas doenças citrícolas (tristeza, declínio dos citros, morte súbita dos citros, entre outras) e tolerância a fatores abióticos (salinidade e seca). Esse cenário veio bastante à tona com o surgimento e expansão da morte súbita dos citros, desencadeando a necessidade de se ter uma maior heterogeneidade de porta-enxertos para a citricultura, a partir de esforços de enxertia principalmente com a tangerina Cléopatra (*C. reshni* Hort. ex Tan.), o citrumelo Swingle [*C. paradisi* Macfad. cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e a tangerina Sunki [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tan.]. Por outro lado, a tangerina Sunki possui como restrição ser altamente suscetível à *Phytophthora*, agente causador da gomose ou podridão das raízes e do tronco (FUNDECITRUS, 2006; Schinor *et al.*, 2011).

Os híbridos de microtangerinas, como a tangerina Sunki, com *Poncirus trifoliata* são chamados de citrandarins, os quais fazem parte de uma nova geração de porta-enxertos para a citricultura, reunindo as características vantajosas das tangerinas, como a tolerância ao declínio e morte súbita dos citros, com as qualidades dos trifoliatas, as quais correspondem à alta resistência à *Phytophthora*, à imunidade à tristeza e ao nematoide dos citros, além da grande capacidade de formarem plantas compactas e produtivas. Muitos citrandarins já foram produzidos pelos EUA e avaliados em São Paulo, com resultados promissores no que diz respeito à boa resistência à *Phytophthora* (Blumer & Pompeu Junior, 2005).

2.4. A gomose dos citros

Causadas por patógenos agressivos e pouco especializados, as podridões de colo e raízes infligem na planta danos que diminuem sua capacidade em absorção de água e nutrientes. Como reflexo disso, ocorre amarelecimento, murcha, além de deficiências nutricionais na copa. Atingem plantas de todas as idades, porém as mais jovens apresentam maior sensibilidade. No que diz respeito à severidade dessas podridões, seja no colo, seja nas raízes, quanto maior for a densidade do

patógeno no solo, maiores serão as chances da planta adquirir a doença (Laranjeira *et al.*, 2005).

Em relação às principais doenças que afetam a citricultura, tendo em vista o complexo *Phytophthora*-citros, ressalta-se a gomose e seus diversos sinônimos, como: podridão do pé, do colo e gomose do tronco. Conhecida desde o século X na península Ibérica, e com grandes surtos em países como Portugal, Espanha, França, Itália e Grécia, bem como no continente americano durante o século XIX, a gomose dos citros foi apenas relatada no Brasil em 1917, e desde então, tem assolado os viveiros e pomares comerciais espalhados pelo país, com perdas significativas principalmente para o Estado de São Paulo, em que a citricultura mais se concentra (Feichtenberger, 2001; Medina Filho *et al.*, 2003). Esse cenário se modificou com a produção de mudas de citros em telado.

As espécies do gênero *Phytophthora* infectam diversas plantas em todo o mundo, sendo patógenos veiculados pelo solo e agentes causadores de várias enfermidades que atingem as radículas, as raízes, o colo do tronco, as folhas, os ponteiros e até os frutos em porta-enxertos suscetíveis. Nas radículas, raízes e colo, causam tombamento e mela. Doze espécies de *Phytophthora* podem infectar citros: *P. nicotianae*, *P. citrophthora*, *P. palmivora*, *P. boehmeria*, *P. cactorum*, *P. capsici*, *P. citrícola*, *P. cinnamomi*, *P. drechsleri*, *P. hibernales*, *P. megasperma* e *P. syringae*. No Brasil, trabalhos relatam a ocorrência de três dentre as espécies relacionadas ao complexo *Phytophthora*-citros: *P. nicotianae*, *P. citrophthora* e *P. palmivora*. A gomose, então, é uma das doenças mais antigas e conhecidas que assolam as culturas cítricas, e as espécies *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (*Phytophthora parasitica* Dastur) e *Phytophthora citrophthora* (Smith & Smith) são as principais causadoras desse mal agrícola (Siviero *et al.*, 2002a; Bergamin Filho *et al.*, 2005; Caixeta *et al.*, 2013).

O reino Stramenopila ou Chromista engloba organismos aquáticos marinhos ou de água doce, bem como terrestres, que podem ser saprófitos, parasitas facultativos, biotróficos ou hemibiotróficos. Pertencente a esse reino e ao filo Oomycota, *P. parasitica* é um oomiceto que compreende um grupo diversificado de organismos (Alexopoulos *et al.*, 1996). Classificados no antigo reino Fungi, esses seres vivos divergem dos chamados fungos verdadeiros devido a uma série de características estruturais, bioquímicas, fisiológicas e moleculares. Diferentemente dos fungos, que possuem parede celular constituída basicamente por quitina, o

gênero *Phytophthora*, assim como outros patogênicos, a exemplo de *Pythium*, *Perenospora* e *Plasmopora*, apresentam paredes celulares compostas por β 1-3 e β 1-6 glucanas, além de celulose (Hawksworth *et al.*, 1995).

Os oomicetos estabelecem relações íntimas com seus hospedeiros pela formação de haustórios durante a infecção, que são estruturas usadas para a obtenção de nutrientes da planta, redirecionando o metabolismo de defesa do hospedeiro. Sendo assim, como mecanismo de defesa e para conter o crescimento tanto longitudinal quanto lateral da lesão ocasionada por esse oomiceto, pode ocorrer a formação de um calo cicatricial pelos tecidos cambiais da planta, localizados na periferia da área lesionada, de modo a limitar o progresso da doença (O'Donnell *et al.*, 2003). As espécies do gênero *Phytophthora* são patógenos hemibiotróficos, isto é, iniciam a infecção como agentes biotróficos nas primeiras 36-48 horas e colonizam o hospedeiro como necrotróficos, alternando o modo de obtenção de nutrientes com o intuito de garantir sua disseminação a partir de tecidos vegetais necrosados, e apresentando distribuição sistêmica na planta devido à infecção se propagar para o câmbio vascular do hospedeiro, o que provoca distúrbios de transporte de seiva para as raízes e radículas, gerando podridões e sintomas na parte aérea da planta (Glazebrook, 2005; Grenville-Briggs & West, 2005).

Whiteside *et al.* (2000) discorrem que a ausência de medidas adequadas de manejo dos pomares e as condições ambientais, como a alta temperatura e a alta umidade relativa do ar, favorecem ao desenvolvimento da lesão ocasionada por *Phytophthora* nos troncos de citros. Entretanto, extremos de temperatura podem limitar a doença, ocasionando redução na infecção. Solos pesados e mal drenados, métodos inadequados de irrigação, presença de outros patógenos como viroses e bacterioses, vigor da planta, além de condições de baixa oxigenação presentes em solos argilosos, também podem aumentar e influenciar na progressão da gomose, contribuindo para o apodrecimento do sistema radicular das plantas no campo e em viveiros, bem como dificultando a regeneração de raízes e radículas infectadas por espécies de *Phytophthora*. De acordo Feichtenberger (1996), a temperatura ideal para o crescimento do micélio de *P. parasitica* é entre 30-32°C, enquanto que para o desenvolvimento da lesão varia de 15°C a 25°C. Já para *P. citrophthora*, a temperatura ideal é de 24 a 28°C e para o desenvolvimento da lesão, varia de 10 a 20°C. Sendo assim, a diferenciação das espécies de *Phytophthora* relacionadas à

gomose dos citros pode ser feita por uma curva de crescimento *in vitro* com variações de temperatura, além de métodos morfológicos e moleculares.

No Brasil, destaca-se o patógeno *P. parasitica*, que ocasiona a gomose em mais de 90% dos casos registrados em pomares e viveiros de citros, apresentando uma vastidão de sintomas, como o escurecimento e morte da casca e do lenho, amarelecimento e queda das folhas, podendo ocasionar necroses foliares e de ponteiros, podridão parda dos frutos na pós-colheita, escurecimento e morte das raízes nutritoras, redução das radículas, baixo desenvolvimento, murcha e até a morte da planta (Figura 1A) (Boava *et al.*, 2003; Medina Filho *et al.*, 2003). Para Feichtenberger *et al.* (2005), os sintomas mais recorrentes da gomose correspondem à exsudação da goma em lesões do colo nos citros (Figura 1B) e o tombamento da planta com fendilhamento longitudinal da casca (Figura 1C), sendo mais evidentes em variedades suscetíveis à doença.



Figura 1. Alguns sintomas da gomose dos citros. **A.** Morte de uma laranjeira. Fonte: www.fundecitrus.com.br; **B.** Exsudação da goma em podridões do colo de laranjeiras. Fonte: agrolink.com.br; **C.** Tombamento de uma laranjeira. Fonte: valedomundauagricola.blogspot.com.

Fungos, oomicetos e nematoides passam por diferentes formas reprodutivas e estruturas de resistência em seus ciclos de vida que garantem a infecção na planta hospedeira, bem como a sobrevivência e perpetuação em condições adversas do meio ambiente. Patógenos do gênero *Phytophthora* sobrevivem no solo, geralmente possuem hifas não septadas e talo micelial bem desenvolvido, podendo produzir esporos sexual e assexual, além das estruturas de resistência chamadas de clamidósporos. Em períodos prolongados de chuva com alta umidade, espécies de *P. parasitica* podem formar os oósporos, oriundos da fertilização do oogônio (gametângio feminino) pelo anterídio (gametângio masculino), além dos clamidósporos (Figura 2A). Tais formas atuam como via primária de infecção e germinam, formando os esporângios persistentes e do tipo papilados (Figura 2B), estruturas produtoras dos zoósporos, que emergem dos esporangióforos na superfície do solo ou nos órgãos afetados da planta sob condições ideais de

temperatura e umidade. Os zoósporos, esporos assexuados e biflagelados com mobilidade, são liberados em abundância pelos esporângios e em contato com o hospedeiro, sofrem diferenciação e formam cistos que germinam, originando hifas capazes de infectar raízes e caule, bem como por meio de respingos, galhos, folhas e frutos da copa. Com a colonização dos tecidos e o aparecimento dos sintomas da gomose, novos esporângios podem ser formados, ocorrendo então um novo ciclo da doença sob condições favoráveis (Feichtenberger, 2001; Tyler, 2002; Laranjeira *et al.*, 2005).

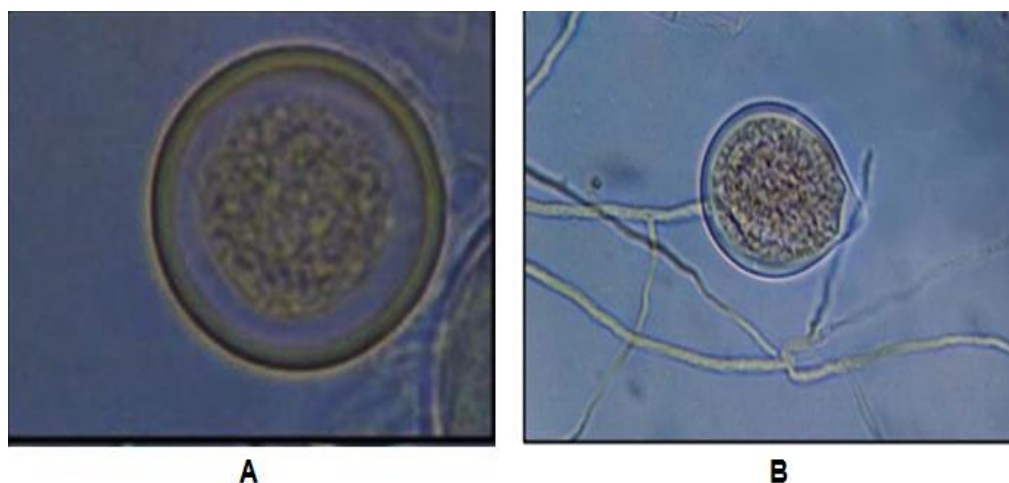


Figura 2. Clamidósforo (A) e Esporangio papilado e persistente (B). Fonte: Santos & Luz (2007).

O isolamento de espécies do gênero *Phytophthora* em meio de cultura não constitui um trabalho simples devido a ser propenso à contaminação por outros patógenos. Duas técnicas são empregadas: o isolamento feito a partir de solo infectado, bastante difícil, pois pode haver interferência de fungos e outros oomicetos de crescimento mais acelerado presentes no solo, a exemplo das espécies do gênero *Pythium*; bem como pelo próprio tecido infectado que apresenta a doença, metodologia mais comumente utilizada. No entanto, essas duas abordagens possuem a mesma proposta no que diz respeito aos meios de cultura seletivos usados posteriormente, que permitem o crescimento rápido apenas de *Phytophthora*. A base nutritiva desses meios (exemplo: cenoura-água) deve conter substâncias inibidoras para eliminar bactérias, fungos e oomicetos indesejados (Boccas & Laville, 1976). Segundo Masago *et al.* (1977), um meio específico para *Phytophthora* capaz de inibir o crescimento de espécies como aquelas pertencentes ao gênero *Pythium* pode ser obtido utilizando o fungicida Benomil e os antibióticos Rifampicina e Ampicilina.

No que diz respeito ao isolamento a partir de tecido infectado, a prática consiste em retirar partes da lesão provenientes de seções de cascas e raízes infectadas com o patógeno ou partes de folhas infectadas com discos de micélio do patógeno crescendo em meio de cultura cenoura-ágar pelo método da isca descrito por Grimm & Alexander (1973). Com o auxílio de bisturi flambado, pequenas porções correspondentes à margem da lesão são tomadas e inoculadas diretamente em frutos específicos para a espécie de *Phytophthora*, como por exemplo, um limão para a gomose dos citros, atuando como um filtro de espécies contaminantes. Os frutos são então incubados em alta temperatura e umidade até que uma boa parte de sua área esteja doente e seja possível atingir as sementes. Posteriormente, seccionam-se em pedaços as sementes contaminadas também com um bisturi esterilizado, a fim de serem transferidas para placas de Petri contendo os meios de cultura seletivos com cenoura-ágar. Após um a seis dias, e com a mistura do meio de cultura mais os pedaços das sementes de limão, incubada a uma temperatura entre 20-25°C, verifica-se a formação do micélio patogênico (Zentmyer & Mitchell, 1986).

O teste imunológico de ELISA (Enzyme Linked Immunology Sorbent Assay), baseado em um anticorpo específico (mono ou policlonal) dirigido contra o antígeno, ou o uso de sondas de DNA espécie-específica que permita a quantificação do oomiceto presente em raízes, podem ser realizados como diagnóstico para detectar a presença de *Phytophthora* relacionada á gomose dos citros (Timmer *et al.*, 1993; Judelson & Messenger-Routh, 1996). Além disso, a aplicação de técnicas moleculares para identificação em nível de espécie vem sendo cada vez mais empregada, pela comparação de regiões ITS dentro da grande diversidade inerente à *Phytophthora*, bem como por intermédio de sistemas baseados na combinação dos testes de ELISA e PCR, melhorando a sensibilidade na detecção desses patógenos (Martin *et al.*, 2000).

Em relação aos métodos de inoculação para avaliar *Phytophthora* associada à gomose dos citros, várias técnicas têm sido descritas na literatura, a saber: avaliação de plântulas *in vitro*, pela inserção de agulha infestada com o micélio do patógeno na região do colo; inoculação usando a casca destacada, infectada com um disco do meio de cultura contendo *Phytophthora*; método do disco, que consiste na inserção de discos de micélio oriundos de meios de cultura colonizados pelo patógeno; método da inserção sob a casca, correspondente ao contato do patógeno

com a planta sem causar o ferimento; método do palito, por meio da introdução de palitos de dente infestados com *Phytophthora* na haste de plantas cítricas; método da agulha, que pode ser realizado com uma agulha de metal ou com um espinho de citros, previamente contaminados com estruturas do patógeno provenientes de colônias de *P. parasitica*; e pela injeção de zoósporos, consistindo no uso de uma suspensão de zoósporos de *Phytophthora* presentes no solo para a inoculação em incisões na parte basal das plantas. A avaliação da doença pode ser efetuada pela incidência, em que se faz a contagem das plantas com sintomas da gomose, e também pela severidade, com a medição da área ou comprimento da lesão no tronco de plantas infectadas (Siviero *et al.*, 2002c). Siviero *et al.* (2002a), testando todos esses sete métodos citados anteriormente, constataram que os métodos mais eficientes para se fazer a inoculação de *P. parasitica* correspondem à avaliação *in vitro* em plântulas, no método do disco e na inserção sob a casca em plantas jovens. Paralelamente, também demonstraram que a medida da área total da lesão ocasionada pelo oomiceto, bem como o seu comprimento, constituem em variáveis ideais para avaliação da doença em plântulas, plantas jovens e no campo.

2.5. Controle da gomose dos citros

Diversas medidas de controle podem ser empregadas tendo como foco a prevenção de *Phytophthora* associada à gomose dos citros no campo, a saber: seleção de áreas para plantio, com solos bem drenados e sem plantio fundo; rotação de culturas, pela limpeza da área e queima dos restos do cultivo anterior; práticas de conservação do solo, com a construção de terraços, o plantio em nível e também de culturas intercalares; adubação orgânica e mineral em quantidade adequada, sem causar injúria na planta; utilização de mudas saudáveis, com boas características genéticas, culturais e fitossanitárias; cuidados durante o plantio, sem o enterro profundo das mudas para evitar o enrolamento das raízes; quebra-ventos, que reduzem a disseminação de propágulos desses patógenos; prevenção contra ferimentos, que destroem a proteção mecânica das plantas contra esses patógenos; manejo do mato, com herbicidas que permitem a formação de cobertura morta no solo; controle químico, que deve ser visto como uma medida complementar, já que pode trazer sérios impactos no próprio cultivo e também aos organismos benéficos ao redor; controle físico via fumigação ou a vapor, além de tratamento térmico das lesões, inativando o patógeno, bem como a remoção física de partes da casca

infectada com posterior aplicação de fungicidas; controle biológico, com o uso de inimigos naturais desses patógenos, pragas, micorrizas e microrganismos fixadores de nitrogênio; controle genético, que constitui na forma mais eficiente de combate à gomose por ser menos custoso e reduzir o impacto do uso de compostos químicos no ambiente, sendo caracterizada pela seleção de combinações de copas e porta-enxertos de citros tolerantes e/ou resistentes ao patógeno; entre outras medidas fitossanitárias (Feichtenberger, 2001). Entretanto, a adoção de medidas de manejo integrada, que empregam o uso conjunto ou sequencial de todas essas práticas citadas anteriormente de controle genético, químico, físico, biológico e cultural, constitui na melhor estratégia de combate à gomose dos citros (Feichtenberger, 2003).

2.6. Mecanismos de defesa dos citros à gomose

2.6.1. Imunidade vegetal

As plantas, desde o surgimento das angiospermas, e mais intensamente com o advento da agricultura, necessitam conviver com as diversas formas de organismos patogênicos (bactérias, vírus, fungos, oomicetos, entre outros) por meio de uma luta constante pela sobrevivência, em que há uma reação em cadeia por parte das células vegetais, tentando desenvolver vários mecanismos estruturais, bioquímicos e/ou genéticos de defesa como resposta à infecção do oomiceto *P. parasitica* em citros, por exemplo, o que constitui um processo coevolutivo (Matiello *et al.*, 1997). Existe toda uma complexidade funcional, espacial e temporal na interação patógeno-hospedeiro, desde o momento inicial em que a planta reconhece o patógeno pelos seus sinais exógenos, o que continua com a transdução desses sinais, até resultar na reprogramação do metabolismo celular vegetal, tudo isso possível por intermédio de alterações na atividade gênica (Stangarlin *et al.*, 2010).

Os mecanismos de defesa nas plantas frente aos patógenos envolvem uma série de compostos químicos como os aminoácidos precursores de proteínas e que fazem parte do metabolismo primário, a exemplo do triptofano, fenilalanina e tirosina, além dos chamados metabólitos secundários, constituídos pelos compostos fenólicos, alcaloides e glicosídeos cianogênicos. A síntese de proteínas é ferramenta indispensável para a sobrevivência e o crescimento das plantas, pois promove o surgimento de enzimas relacionadas à biossíntese e degradação de moléculas, fotossíntese, regulação e formação de barreiras estruturais. Já os compostos

provenientes do metabolismo secundário, embora direcionados também a uma série de processos fisiológicos, apresentam como principal função a defesa contra invasões microbianas. Assim, pode-se afirmar que os metabólitos tanto primários quanto secundários competem diretamente ao exercício de defesa na planta a fatores bióticos e juntos desencadeiam um conjunto de respostas ativas após a infecção, que contribuem para o desenvolvimento de uma barreira inicial à propagação dos patógenos e, portanto, podem exercer uma pressão seletiva sobre esses microrganismos. Tais respostas ativas constituem processos rápidos, como a deposição de glicoproteínas, calose e outros compostos fenólicos, necessária ao fortalecimento da parede celular; e tardios, como a indução de β -glucanases e quitinases (enzimas hidrolíticas), e inibidores de proteinases (Nurnberger *et al.*, 2004; Vivanco *et al.*, 2005).

Por apresentarem um complexo e eficiente sistema imune, igualmente aos animais, as plantas exibem estratégias de defesa que podem ser classificadas em dois tipos: as defesas pré-formadas e as induzidas. Vale ressaltar que os dois mecanismos promovem processos fisiológicos contínuos e muitas vezes a distinção exata torna-se irrelevante (Agrios, 1988).

As defesas pré-formadas estão relacionadas a estruturas celulares e teciduais pré-existentes (parede celular, estômatos e tricomas) e formadas ativamente após a infecção (agregação citoplasmática, halos, papilas, lignificação, tiloses, camadas de abscisão e de cortiça), que atuam como barreiras contra os microrganismos externos, juntamente com os compostos químicos formadores dessas estruturas (pectina, calose, lignina, quitina, celulose, derivados fenólicos, entre outros), os quais devem se encontrar numa concentração suficiente para conter o crescimento e colonização do organismo invasor. Já as defesas induzidas correspondem aos mecanismos pós-invasivos que ocorrem devido aos agressores superarem a defesa pré-invasiva, representados pelas respostas ativas da planta por meio do reconhecimento do patógeno. Compreendem dois tipos: a defesa basal, que consiste basicamente no reconhecimento por parte das membranas celulares de moléculas estruturais altamente conservadas e associadas principalmente aos agentes bióticos; e a defesa baseada na interação gene-a-gene, que é mediada pelos genes de resistência (genes *R*) dentro das células para o reconhecimento dos chamados fatores de avirulência ou efetores expressos direta ou indiretamente pelos genes de avirulência (genes *Avr*). De forma geral, após o processo de

reconhecimento do patógeno quer seja pela defesa basal ou pela ativação de genes específicos, há formação de barreiras bioquímicas, físicas e/ou estruturais no sítio local da infecção, sistemicamente em tecidos não infectados ou ambas as situações (Jones & Dangle, 2006; Menezes, 2009).

No que diz respeito à defesa basal, as plantas tendem a desenvolver uma primeira linha de defesa que seja ativa e dependente do reconhecimento genético do patógeno, em que as células vegetais passam a reconhecer padrões moleculares associados aos patógenos/microrganismos (PAMPs ou MAMPs), definidos por moléculas com elementos invariantes fundamentais para adaptabilidade dos diferentes patógenos. Esses elicitores podem ser partes extracelulares dos invasores, como fragmentos de quitina, flagelinas, lipopolissacarídeos e peptideoglicanos, ou proteínas intracelulares, tais como proteína de choque frio (CSP) e fatores de elongação (EF-Tu). Os PAMPs/MAMPs são percebidos pelos receptores moleculares chamados de PRRs (receptores de reconhecimento padrão), proteínas transmembrana na célula vegetal semelhantes a receptores quinases (RLKs), contendo uma típica cadeia LRR (repetições ricas em leucina) em seu domínio extracelular (Schwessinger & Zipfel, 2008; Henry *et al.*, 2012). Por intermédio da interação PAMP-PRR, ocorre o desenvolvimento da PTI (imunidade desencadeada por PAMP), primeira linha de defesa que envolve uma cascata de eventos de sinalização dos efetores por proteínas quinases, o que irá determinar o potencial avirulento do patógeno. Dessa forma, o organismo invasor pode ou não suprimir a PTI pela ação desses fatores de avirulência, e caso seja bem-sucedido, faz com que a planta seja suscetível, fenômeno denominado de ETS (suscetibilidade desencadeada por efector) (Chisholm *et al.*, 2006).

Trabalhos relacionados ao reconhecimento de oomicetos e fungos filamentosos em *Arabidopsis* e tabaco identificaram um elicitor chamado lecitina, que é encontrado normalmente ligado à celulose da parede celular desses microrganismos e utilizado provavelmente para estimular a adesão celular durante a infecção, como responsável por desencadear o turbilhão de respostas de defesa. Além disso, outros PAMPs derivados da parede celular de fungos e oomicetos, também podem induzir defesa na planta, a exemplo das β -glucanas, quitina e ergosterol (Cavalcante *et al.*, 2013).

Os porta-enxertos *P. trifoliata* e Citrumelo Swingle possuem a capacidade de regenerar raízes na presença de *P. nicotianae* a partir da ponta das próprias raízes

infectadas. Não se sabe ainda quais os fatores de resistência que limitam a infecção para a ponta das raízes, mas acredita-se que possa haver alguma relação com as chamadas fitoalexinas encontradas nos tecidos lenhosos de citros infectados com *Phytophthora* (Graham & Timmer, 2003). Tais compostos antimicrobianos de baixo peso molecular atuam como antibióticos naturais e são restritos ao local de infecção do patógeno, chegando a compreender cerca de 300 diferentes tipos de metabólitos secundários (Vivanco *et al.*, 2005; Menezes, 2009).

A base genética da imunidade em plantas, conhecida como modelo “Gene-for-Gene” e originalmente descrita por Flor (1971), descreve uma resposta integrada de defesa contra a infecção do patógeno por intermédio de interações específicas entre os genes de resistência *R* encontrados nos vegetais e os genes de avirulência *Avr* nos parasitas condicionadores da patogenicidade. Sendo assim, o *locus Avr* codifica uma proteína efetora (fator de avirulência ou efector) que pode ser reconhecida por uma proteína *R* citoplasmática expressa pelo *locus R* correspondente na planta. O que irá determinar a resistência da planta ao patógeno é justamente se ocorre essa interação incompatível gene *R-Avr* pela ativação rápida dos mecanismos de defesa, os quais promovem a sobrevivência da planta. Essa resposta imune secundária, acelerada e amplificada compreende uma segunda linha de defesa, e é denominada de ETI (imunidade induzida por efector). Caso o patógeno seja virulento e não possua o gene *Avr*, não ocorrerá o reconhecimento pelo hospedeiro com ou sem gene *R* cognato, ocasionando a interação compatível pela ativação lenta dos mecanismos de defesa e o desenvolvimento da doença na planta (suscetibilidade). Além disso, se o patógeno for avirulento e o hospedeiro não possuir gene *R*, ocorrerá a doença e a planta será suscetível, caracterizando também uma interação compatível (Bespalkok *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008; Menezes, 2009).

A PTI e a ETI constituem processos fisiológicos contínuos, apresentando respostas ativas de defesa que podem complementar uma em relação à outra no combate ao fitopatógenos. A PTI normalmente resulta em uma explosão oxidativa de espécies reativas de oxigênio (ROS) e na expressão de genes de defesa envolvidos com a biossíntese de peptídeos e compostos antimicrobianos, como as fitoalexinas. Acontece que muitas vezes, a PTI é superada pela ação dos efetores, o que faz com que a planta ative a ETI e desencadeie, além da produção também de ROS, a chamada resposta de hipersensibilidade (HR), caracterizada por uma rápida e

programada morte celular no local da infecção. Sabe-se que a principal consequência da HR é a restrição de nutrientes e água ao organismo patogênico, limitando assim o campo de ação do microrganismo (Thomma *et al.*, 2011; Cavalcante *et al.*, 2013; Dalio *et al.*, 2014).

Nas interações planta-patógeno que são incompatíveis, os processos resultantes da imunidade gene-a-gene no hospedeiro restringem os danos causados pelo invasor, por meio de um sistema coordenado de sinais que implicam na ativação de fatores de transcrição, como por exemplo, os expressos por genes da família WRKY, e de um grupo de proteínas de resistência denominadas de PRs (*pathogenesis-related proteins*), tais como quitinases (codificadas pelo gene PR3) e glucanases (codificadas pelo gene PR2), enzimas que degradam parede celular. Ao contrário dos efetores, que são altamente diversos em estrutura e função molecular, as proteínas PR compreendem moléculas conservadas, cuja estrutura básica possui uma região com domínio central de ligação a nucleotídeos NBS (*nucleotide binding site*), outra com domínio do tipo repetições ricas em leucina LRR (*leucin rich repeats*), bem como um terceiro domínio variável associado à extremidade N-terminal, sendo comuns as do tipo TIR (*toll and human interleukin receptor*) e CC (*coiled-coil*) (Meyers *et al.*, 2003; Dalio *et al.*, 2014). Em um trabalho de expressão gênica que buscou avaliar a resposta de genótipos suscetíveis (*Citrus sunki*) e resistentes (*Poncirus trifoliata*) à infecção causada por *Phytophthora parasitica*, genes PR, tais como PR2 e PR3, foram mais *up-regulated* no *Poncirus trifoliata* do que na tangerina Sunki, o que pode evidenciar o envolvimento desses transcritos nos mecanismos de resistência à doença gomose dos citros (Boava *et al.*, 2011a).

O estudo da interação patógeno-hospedeiro se configura como um sistema complexo, fruto das forças evolutivas no processo de co-evolução entre plantas e microrganismos (Figura 3). Essa interação abrange diferentes fases numa dinâmica contínua, cujas principais são: reconhecimento genético planta-patógeno; processo de transdução de sinal; ativação de genes; e ativação dos mecanismos de resistência local e/ou sistêmica. Tais fases podem ser desencadeadas tanto pela PTI, a qual caso seja suprimida pela secreção de efetores, gera a ETS; quanto pela ETI. Por outro lado, os patógenos podem sofrer mutações em genes *Avr* e escapar da ETI, resultando no restabelecimento da ETS. Para dá continuidade a essa rivalidade inerente ao invasor e hospedeiro, novos genes *R* podem surgir por meio

de mutações nas plantas, e isso restabelecer a ETI (Cordeiro & Sá, 1999; Dalio *et al.*, 2014).

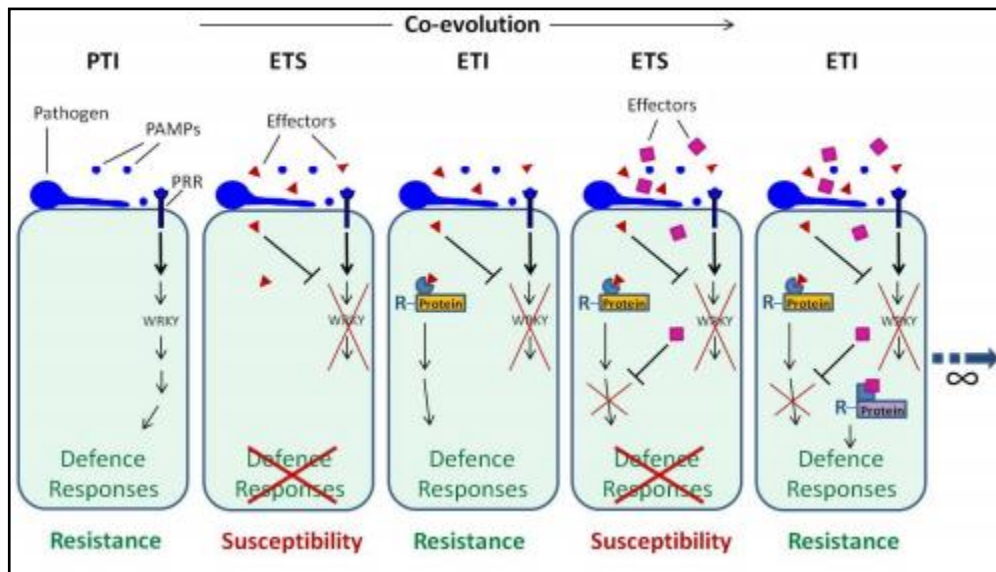


Figura 3. Esquema ilustrativo da co-evolução planta-patógeno. Fonte: Dalio, 2013.

Uma grande variedade de porta-enxertos utilizados na citricultura é suscetível à *Phytophthora* causador da doença gomose dos citros, inclusive o limão-cravo, que tem sido durante anos o mais usado nos pomares do Estado de São Paulo. A seleção e melhoramento de plantas, juntamente com o emprego das técnicas modernas de biotecnologia vegetal (Marcadores Moleculares, PCR, RT-qPCR clonagem de genes, entre outras), para buscar resistência às espécies de *Phytophthora* em citros são considerados a abordagem mais eficiente para controlar a doença, uma vez que existem diferentes graus de resistência dentro do gênero *Citrus*. Neste contexto, *Poncirus trifoliata* é um genótipo importante devido suas vantajosas características agronômicas, incluindo a resistência a *Phytophthora*, Tristeza dos Citros (CTV) e nematoide dos citros *Tylenchulus semipenetrans*. Para que haja o controle da doença, apesar das várias medidas preventivas, como o uso de defensivos químicos e aeração do solo, o emprego de genótipos de citros tolerantes e/ou resistentes torna-se a forma ideal de controle e estudo do patógeno. Como perspectiva inovadora, o isolamento de novos genes relacionados com a defesa e a transformação genética dos citros com esses genes de resistência consistem em duas estratégias combinadas para a obtenção de plantas resistentes a patógenos (Cordeiro & Sá, 1999; Talon & Gmitter, 2008).

2.6.2. Resistência sistêmica e fitormônios sinalizadores da resposta imune

Com a ativação da resposta de hipersensibilidade (HR) no local de infecção pelo patógeno, outras formas de resistência da planta podem ser desenvolvidas sistematicamente, ou seja, em regiões mais distantes da área infectada, por meio da transdução de sinais. Esse fenômeno de resistência em larga escala compreende a resistência sistêmica, dividida em dois tipos, com base na forma que os diferentes mecanismos bioquímicos os induzem, embora no fenótipo final sejam bastante semelhantes, pois resultam numa indução de resistência. São eles: SAR (Resistência Sistêmica Adquirida) e ISR (Resistência Sistêmica Induzida) (Silva *et al.*, 2008).

A SAR é mais comumente induzida por ETI logo após a HR, mas também pode ser ativada por PTI. Seus principais mecanismos de defesa envolvem a lignificação da parede celular, a produção de fitoalexinas, além da produção e acúmulo de proteínas PR envolvidas com a patogênese, como por exemplo, as β -1,3-glucanases e quitinases. Patógenos ou ativadores químicos geralmente induzem a SAR, cujos efeitos podem provocar alterações visuais (cloroses e necroses) na planta. Além disso, o amplo espectro de seus compostos contra uma vastidão de microrganismos comumente desencadeia um sistema imune integrado e de resistência duradoura (por um longo período e atuação), que pode ser transmissível às próximas gerações por reprodução sexuada ou assexuada (via enxertia) e dependente de condições ambientais (luz, temperatura, entre outros). Tem sido descrita em várias espécies de planta (tabaco, *Arabidopsis*, pepino, entre outras culturas) (Silva *et al.*, 2008; Carvalho, 2012; Spoel & Dong, 2012).

No caso da ISR, as proteínas PR não são produzidas e a planta não exhibe alterações visuais, sendo que geralmente o agente biótico é um microrganismo não patogênico. Um clássico exemplo dessa forma de resistência foi demonstrado em vegetais tendo associação com fungos micorrízicos e rizobactérias promotoras do crescimento de plantas PGPR (*plant growth promoting rhizobacteria*). Esses organismos comumente são encontrados no solo, e quando foram colocados em contato com as raízes de *Arabidopsis*, induziram resistência sistêmica nas folhas e caules (Pieterse *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2008; Van Wees *et al.*, 2008).

Independente da SAR induzida por patógenos ou da ISR induzida por PGPRs, ambos os tipos de resistência sistêmica são eficientes no combate a uma gama de patógenos que atacam plantas, e já foi demonstrada tanto uma sobreposição quanto uma comunicação cruzada no sentido de divergência entre

suas diferentes rotas bioquímicas (Pieterse *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2008; Carvalho, 2012). Por exemplo, a ação aditiva e independente da SAR e ISR pode conferir um nível de proteção mais efetivo contra os diversos fitopatógenos, como o que aconteceu em genótipos de *Arabidopsis* inoculados com a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* para indução da SAR e tratados com rizobactérias indutoras da ISR (Van Wees *et al.*, 2000). Em contrapartida, há trabalhos que relatam sobre as diferenças na efetividade da SAR e ISR em *Arabidopsis* com outros patógenos, sem que haja esse efeito aditivo e sim nenhuma eficiência da SAR sobre a ISR ou vice-versa. Plantas de *Arabidopsis* infectadas com o fungo *Alternaria brassicicola* demonstraram um aumento na resistência pela ação única da ISR, enquanto tal resistência induzida não possui efeito nenhum para esses vegetais quando infectados pelo *Turnip crinkle vírus* (TCV), o qual é inibido apenas pela expressão de mecanismos da SAR (Ton *et al.*, 2002). Esses dois tipos de resistência induzida, quando combinados, podem contribuir para a melhoria do controle de doenças em plantas (Carvalho, 2012).

Após o processo de reconhecimento do patógeno pela planta, para que haja a ativação de respostas de defesa é necessário haver antes eventos bioquímicos de reprogramação das células vegetais que correspondem à transdução de sinais. Essa sinalização envolve inicialmente um influxo de íons (tais como H^+ e cálcio) e também o acúmulo citoplasmático de intermediários reativos de oxigênio, conhecidos como ROS, que incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais livres $OH^\cdot$. Sabe-se, por exemplo, que o H_2O_2 se difunde rapidamente pela membrana celular devido ser uma molécula estável e livre de carga, o que favorece a rápida indução de mecanismos de defesa vegetal (Resende *et al.*, 2003; Barros *et al.*, 2010).

Posteriormente, a transdução de sinais progride pelo estímulo à biossíntese de fitormônios, que são importantes fatores das vias de sinalização em resposta à doença e promovem a ativação de genes de defesa. Tais hormônios são reguladores em várias atividades vitais da planta (desenvolvimento e crescimento), e também são conhecidos por executarem indução de resposta sistêmica a fatores bióticos e abióticos. Assim, os principais hormônios vegetais envolvidos na sinalização de defesa contra os diferentes tipos de patógenos são os pertencentes às vias do ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) (Figura 4) (Cordeiro & Sá, 1999; Koornneef & Pieterse, 2008). Dependendo do tipo de invasor, as plantas são capazes de ativar vias específicas de sinalização e

consequentemente, induzir diferentes mecanismos de defesa. Agentes biotróficos e hemibiotróficos, que causam danos menos drásticos às células, geralmente ativam a via do ácido salicílico. Por outro lado, agentes necrotróficos, que geram danos mais expressivos nas células, ativam as vias do ácido jasmônico e etileno (Diaz-Puentes, 2012). Pieterse *et al.* (2005) discorre sobre a interconexão existente entre essas três vias que confere à planta uma resposta de defesa mais direcionada frente aos diversos agressores, de modo que no geral ocorre uma sinergia entre as vias de JA e ET, enquanto há uma repressão mútua entre essas duas vias e a do SA. Dessa forma, a natureza antagonística entre SA e JA já foi reportada em plantas que diminuíram sua resistência a patógenos necrotróficos quando tratadas com SA. Entretanto, também já ficou constatado que alguns genes podem ser induzidos de modo sinérgico pelos dois ácidos (Ballaré, 2011).

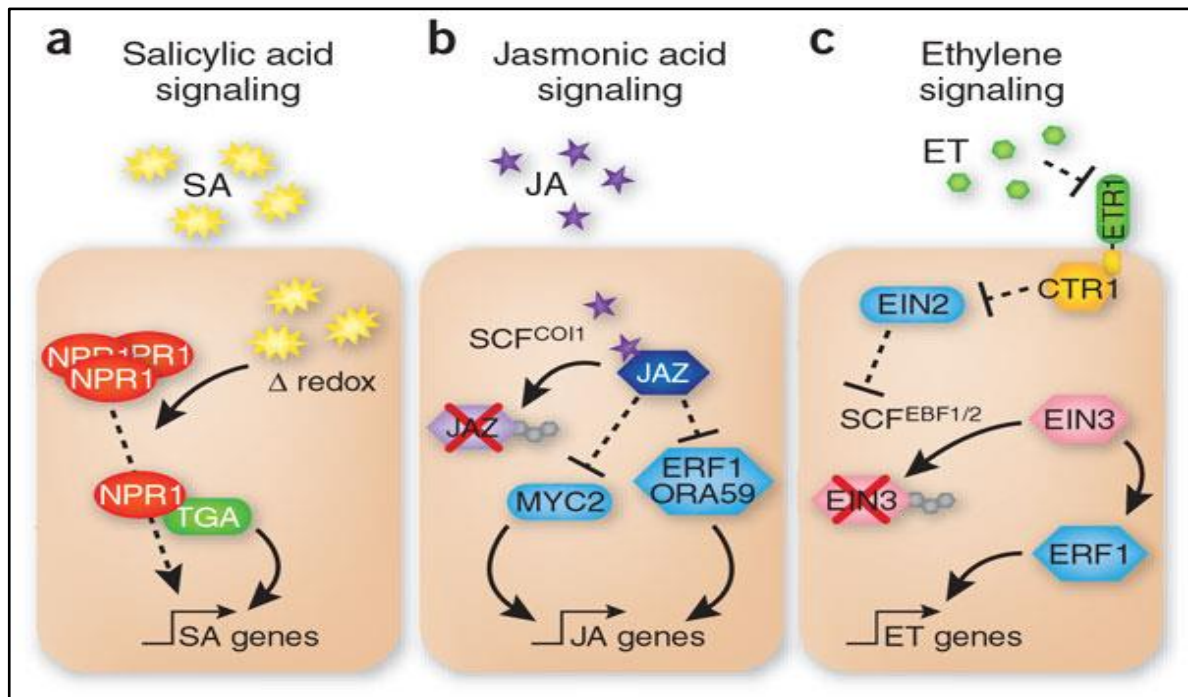


Figura 4. Representação esquemática das principais vias de sinalização em resposta à infecção por patógenos nas plantas. (a) ácido salicílico (SA); (b) ácido jasmônico (JA) e (c) etileno (ET). Fonte: Pieterse *et al.*, 2009.

2.6.2.1. Ácido salicílico (SA)

O SA faz parte de uma ampla família de metabólitos secundários produzidos pelas plantas, sendo um composto fenólico regulador de diversas funções vitais, que incluem o florescimento, a termogênese e a resistência contra doenças provocadas por patógenos biotróficos e hemibiotróficos. O papel do SA na sinalização de defesa a fitopatógenos foi inicialmente proposto por meio de sua injeção juntamente com ácido acetilsalicílico (aspirina) em folhas de tabaco, conferindo acúmulo de proteínas

PR e maior resistência ao *Tobacco mosaic virus* (TMV) pela redução de 90% no número de lesões. Sabe-se que a produção de SA está envolvida nos mecanismos de resistência que induzem a SAR. Portanto, o aumento nos níveis desse hormônio a nível local e sistêmico constitui etapa crítica para a expressão de genes de defesa ligados à SAR e codificadores de proteínas PR (Vlot *et al.*, 2009).

A biossíntese de SA em plantas pode ser realizada a partir de duas vias distintas, ambas dependentes da molécula precursora corismato. Em uma das vias, sob a ação enzimática da proteína PAL (*phenylalanine ammonia lyase*), a fenilalanina, composto derivado do corismato, é convertida em ácido cinâmico. Em *Arabidopsis*, dois genes PAL (PAL1 e PAL2), são estruturalmente similares, apresentando regiões altamente conservadas. O ácido cinâmico pode ser hidroxilado para ácido coumárico, o qual posteriormente é oxidado ao SA; ou forma o ácido benzoico que pela reação catalisada pela enzima ácido benzoico 2-hidroxilase, converte-se em SA. Por outro lado, na outra via o corismato é convertido em isocorismato por meio da enzima ICS (*isochorismate synthase*) localizada no cloroplasto. O isocorismato, por fim, produz SA num processo enzimático que envolve a enzima IPL (*isochorismate pyruvate lyase*) (Fernandes *et al.*, 2009; Vlot *et al.*, 2009). Sabe-se que *Arabidopsis* codifica duas enzimas ICS (ICS1 e ICS2) e essa segunda via apresenta provavelmente um papel maior no SA acumulado em respostas induzidas por patógenos, tendo em vista que 90% da produção de SA foi comprometido em experimentos com mutantes de *Arabidopsis* que carecem do gene funcional ICS1 (Garcion *et al.*, 2008). Posteriormente, a maior parte do SA produzido na planta é convertida em SAG (SA *O*- β -glucoside) pela enzima SAGT (SA *glucosyltransferase*). Outra forma da SAGT menos abundante pode também converter SA em SGE (*salicyloyl glucose ester*). Além disso, foi constatado em células de tabaco que MeSA (*methyl salicylate*) e sua molécula derivada MeSAG (*methyl salicylate O*- β -glucoside) podem ser originados a partir do SA, por uma reação catalisada pela enzima SAMT (SA *methyltransferase*). Tais produtos conjugados do SA, como por exemplo, o MeSA, podem simular sua ação de sinal sistemicamente, quando a planta possui inabilidade em acumulá-lo no sítio local de infecção. Entretanto, o SA é requerido novamente pelos tecidos mais distantes para atuar na SAR, sendo o MeSA desconvertido em SA pela enzima SABP2 (SA *binding protein 2*) (Dean *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007; Vlot *et al.*, 2009).

Uma rede complexa de regulação genética mediada pelo SA foi descoberta (Figura 5), que envolve uma via *upstream* de SA promotora de seu acúmulo e outra via *downstream* de SA, cuja ação promove a expressão de genes associados à SAR, como aqueles relacionados às proteínas PR. Uma variedade de estudos com mutantes de *Arabidopsis* tem demonstrado que as proteínas sinalizadoras EDS1, NDR1 e PAD4 (*enhanced disease susceptibility 1*, *nonspecific disease resistance 1* e *phytoalexin deficient 4*, respectivamente) atuam na via *upstream* de SA, mais precisamente na reação catalisada pela proteína cloroplástica ICS1, estimulando sua biossíntese por ETI iniciada a partir de PRRs. Logo após, a proteína EDS5 (*enhanced disease susceptibility 5*) regula o acúmulo de SA, fazendo com que seja transportado ao citoplasma pela membrana dos cloroplastos. O SA, então, medeia uma mudança no potencial de oxirredução da célula, o que desencadeia a redução da proteína oligomérica NPR1 (*non-expressor of PR genes 1*) a sua forma monomérica ativa. Os monômeros de NPR1, posteriormente, migram para o núcleo, de modo a atuar junto com fatores de transcrição, sendo os mais comuns àqueles relacionados à família de genes TGA e WRKY. Essa interação resulta na indução de genes *PR* de defesa, a exemplo da família de genes PR2 (*pathogenesis-related protein 2*), que codificam uma proteína com propriedades anti-oomicetos, a β -1,3-glucanase. Portanto, o principal regulador da via *downstream* de SA constitui a proteína NPR1 (Glazebrook, 2001; Vlot *et al.*, 2009; Dempsey *et al.*, 2011; Diaz-Puentes, 2012).

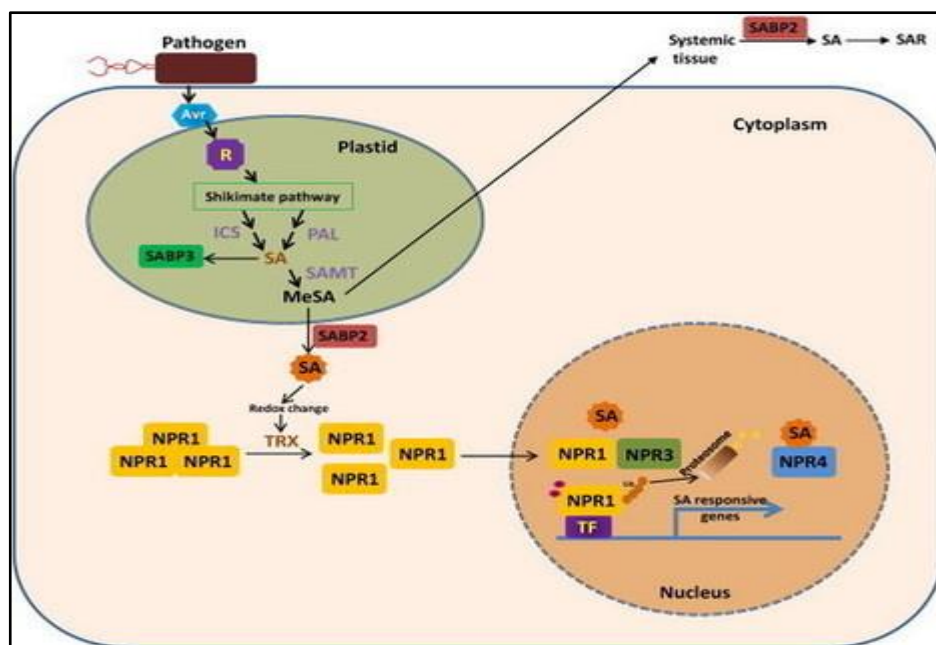


Figura 5. Representação esquemática de um modelo da via de sinalização do ácido salicílico (SA) numa célula vegetal (Kumar, 2014).

Genes parálogos ao NPR1, tal como NPR3 e NPR4, codificam proteínas receptoras que se ligam ao SA em diferentes condições. Sob baixa concentração do SA, NPR1 não está disponível para induzir genes de defesa, pois se encontra ligado à NPR4 para sua degradação no proteassomo 26S dependente de ATP. Com o aumento da concentração do SA após uma infecção, esse hormônio se liga a NPR4, o que interrompe a interação NPR1-NPR4. Dessa forma, NPR1 livre pode desempenhar seu papel na ativação de genes de defesa, a partir de sua ligação com a proteína NPR3, vínculo desencadeado pelos níveis altos do SA (Fu *et al.*, 2012; Moreau *et al.*, 2012).

Os fatores de transcrição da família WRKY fazem parte de uma série de redes sinalizadoras que modulam muitos processos vitais à planta, como a resistência a diversos tipos de patógenos. Vários membros dessa superfamília regulam a via de sinalização *downstream* do SA. WRKY70, por exemplo, é requerido para a resistência mediada por SA em várias interações patógeno-hospedeira, atuando como um regulador positivo dessa via pela ativação de genes responsivos ao SA, como aqueles relacionados à expressão de proteínas PR (a exemplo do PR2); e um regulador negativo da via do JA, reprimindo genes responsivos ao jasmonato (Li *et al.*, 2004; Vlot *et al.*, 2009). Já em relação ao WRKY46, estudos de expressão gênica com *Pseudomonas* spp. em mutantes de *Arabidopsis* comprovam que esse fator de transcrição, juntamente com outros dois membros da família WRKY (WRKY70 e WRKY53), atuam como reguladores positivos da via de sinalização mediada por SA (Hu *et al.*, 2012). Em contrapartida, outros trabalhos afirmam que alguns fatores de transcrição da família WRKY, tais como WRKY38 e WRKY62, reprimem a defesa mediada por SA, com a superexpressão de seus genes em transgênicos de *Arabidopsis* reduzindo a resistência à *Pseudomonas* spp. e a expressão de genes *PR*. Essa repressão desencadeada por WRKY62, cuja ação é dependente de SA e NPR1 na planta infectada, ocorre devido sua interação com um regulador negativo da via *downstream* do SA, chamado HDA19 (*histone deacetylase 19*). HDA19 pode, então, regular positivamente uma resposta típica da PTI pela repressão do WRKY62, o qual passa a reprimir indiretamente a via de sinalização do SA (Kim *et al.*, 2008; Vlot *et al.*, 2009).

Estudos em transgênicos de *Arabidopsis* e tabaco inoculadas com o vírus TMV e bactérias *Pseudomonas* spp., respectivamente, revelam que a superexpressão de enzimas envolvidas na biossíntese de SA, a exemplo do PAL,

confere níveis elevados do SA e consequentemente, a expressão de genes *PR*, garantindo maior resistência. Em contrapartida, a superexpressão de enzimas relacionadas ao metabolismo do SA, tais como AtSGT1 (*SA glucosyltransferase 1*) ou OsBSMT1 (*SA/benzoic acid methyltransferase 1*) levou à redução dos níveis do SA, reduzindo a expressão de genes *PR* e um aumento da suscetibilidade aos patógenos (Koo *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2008; Vlot *et al.*, 2009). Por outro lado, outros trabalhos dizem que SGT1 regula positivamente o processo de morte celular desencadeado por HR durante a interação planta-patógeno. Em *Arabidopsis*, existem dois tipos de proteínas SGT1 (AtSGT1a e AtSGT1b), que são estruturalmente similares (Azevedo *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010). E mais: sabe-se que BSMT1 atua na conversão do SA em um de seus produtos conjugados, o metilsalicilato MeSA. Alguns estudos comprovam que o aumento da produção do MeSA, produzido pela superexpressão do gene OsBSMT1, pode funcionar como um sinal de defesa, induzindo a expressão de genes de defesa responsivos ao JA em plantas de tabaco infectadas com o vírus TMV, evidenciando então a ação antagonística entre SA e JA como uma estratégia de defesa (Koo *et al.*, 2007; Shah & Zeier, 2013).

A ativação de proteínas MAP quinases (MAPK) constitui em um dos primeiros eventos de sinalização após a planta reconhecer moléculas amplamente conservadas, os PAMPs/MAMPs, que atuam como elicitores. MAPKs estão envolvidas na transdução de sinais para o desenvolvimento de inúmeras respostas de defesa, incluindo a biossíntese e sinalização de fitormônios relacionados à resistência da planta, a ativação de genes de defesa, bem como a geração de HR. Já as MKPs (*MAP kinase phosphatases*), membros de uma superfamília de proteínas fosfatases, são conhecidas por serem importantes reguladores da sinalização desencadeada por MAPKs (Koornneef & Pieterse, 2008). Estudos com mutantes de *Arabidopsis* mostraram que uma fosfatase MKP1 (*MAP kinase phosphatase 1*) atua como regulador negativo de respostas PAMPs e também de respostas mediadas pelo SA, suprimindo-as pela interação com uma proteína MAPK, a MPK6 (*MAP kinase 6*) (Anderson *et al.*, 2011; Meng & Zhang, 2013). Entretanto, outro trabalho indica que mutantes de *Arabidopsis* infectados com *Pseudomonas* spp. para o gene MKP1, apresentam uma resposta de defesa dependente de uma proteína do tipo TIR-NBS-LRR, que atua como receptor de genes de resistência, a SNC1 (*suppressor of NPR1, constitutive 1*). Dessa forma,

SNC1 age como um modificador natural da função de MKP1, o que resulta na modulação da biossíntese do SA para a geração de uma resposta autoimune (Bartels *et al.*, 2009).

2.6.2.2. Ácido jasmônico (JA), etileno (ET) e ácido abscísico (ABA)

O JA se encontra bastante abundante nas plantas, regulando uma série de processos fisiológicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento vegetal (germinação de sementes, alongamento de raízes, abertura de estômatos, senescência foliar, maturação de frutos, entre outros), bem como à defesa contra fitopatógenos. Assim como o JA, o ET também atua nas respostas de resistência a doenças, sendo um hormônio vegetal volátil que regula múltiplas funções biológicas, a exemplo do crescimento de mudas, senescência e abscisão foliar, maturação de frutos etc. Muitos estudos mostram que a via de sinalização hormonal do ET atua junto com a do JA na indução de genes de defesa (Figura 6). Além disso, a produção do JA e ET está envolvida nos mecanismos de defesa que induzem a ISR, resistência sistêmica normalmente associada a patógenos necrotróficos; ao contrário do SA, que predominantemente desencadeia respostas imunes indutoras da SAR contra patógenos biotróficos e hemibiotróficos (Silva *et al.*, 2008; Pieterse *et al.*, 2009; Dodds & Rathjen, 2010).

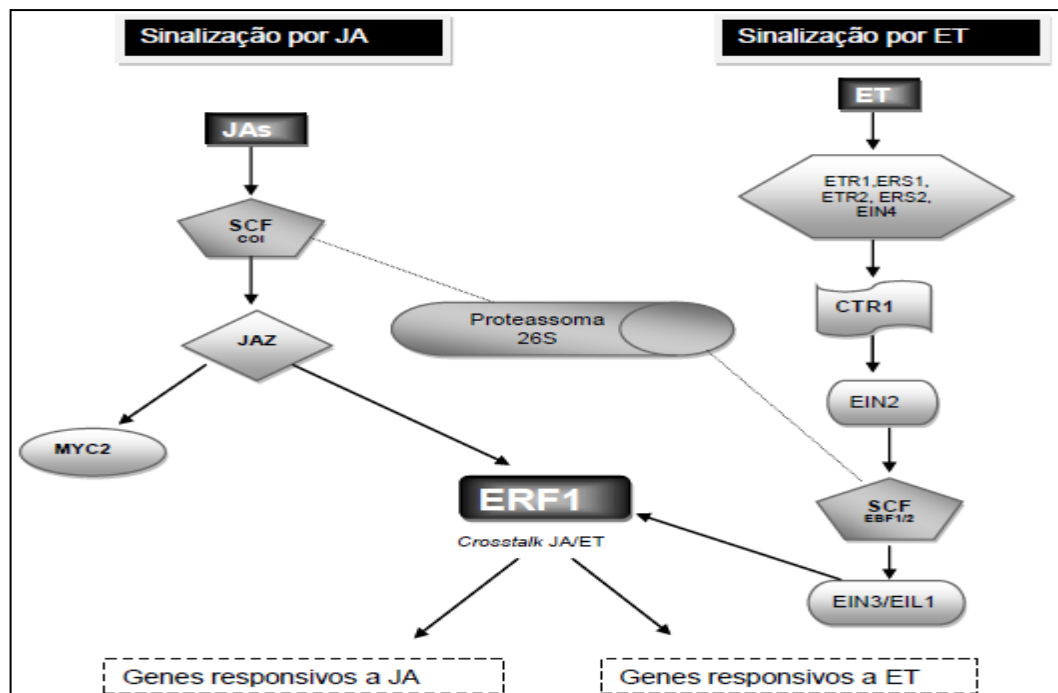


Figura 6. Representação esquemática de um modelo da via de sinalização comum entre o ácido jasmônico (JA) e o etileno (ET) (Coerini, 2014).

A produção do JA em plantas tem sido bastante investigada pelos avanços obtidos em *Arabidopsis* e plantas monocotiledôneas. Sua biossíntese tem início por meio do ácido linolênico, molécula precursora liberada a partir dos lipídios de membrana numa reação enzimática mediada por PLDs (*phospholipases*). O ácido linolênico, então, é convertido em HPODEs (*hydroperoxy octadecadienoic acids*) por enzimas LOXs (*lipoxygenases*). HPODEs são os substratos para os passos seguintes, que envolvem a conversão para 12-OPDA (*12-oxo-phytodienoic acid*) nos cloroplastos por meio da ação dos catalisadores AOS (*allene oxide synthase*) e AOC (*allene oxide cyclase*). O 12-OPDA migra para os peroxissomos, em que é reduzido pela primeira vez pela enzima 12-OPR (*12-oxo-phytodienoic acid reductase*) e logo após passa por três ciclos de β -oxidação para ser convertido em JA. No citosol, o JA pode ser modificado em produtos conjugados moduladores de respostas na planta a estresses bióticos, seguindo principalmente dois caminhos: a composição para JA-Ile (*jasmonate-isoleucine*) pela enzima JAR1 (*jasmonate resistant 1*) ou a volatilização para MeJA (*methyl jasmonate*) pela JMT (*JA-carboxymethyl transferase*). Estudos afirmam que a JA-Ile é a forma bioativa do JA, que é reconhecida pela proteína COI1 (*coronate-insensitive 1*) (Wasternack, 2007; Fonseca *et al.*, 2009; Lyons *et al.*, 2013).

A biossíntese do ET nas plantas envolve uma via metabólica relativamente simples, sendo bem estudada e documentada. Inicialmente, o ET é derivado do aminoácido metionina, molécula precursora que logo após é convertida em AdoMet (*S-adenosylmethionine*) pela ação enzimática da proteína *S-adenosylmethionine synthetase*. AdoMet, então, por meio da enzima ACS (*1-aminocyclopropane-1-carboxylase*), produz ACC (*1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid*) ou MTA (*5'-deoxy-5'-methylthioadenosine*). MTA é reciclado para metionina em um ciclo independente, o que pode reiniciar a síntese novamente de ET e permitir altas taxas desse gás na planta. Por fim, ACC gera o ET por intermédio da enzima ACO (*ACC oxidase*), numa reação que também libera como produto CO₂ e gás cianeto. Para evitar a toxicidade em condições de alta concentração de ET na planta, o cianeto produzido é convertido em β -cyanoalanine pelo catalisador β -cyanoalanine synthase (Kende, 1993; Argueso *et al.*, 2007).

A via de sinalização por JA tem início com o conjugado bioativo JA-Ile, que se liga à proteína COI1 (*coronatine insensitive 1*). COI1 faz parte de um complexo ubiquitina ligase SCF^{COI1}, sendo então componente da proteína SCF (*Skp1-Cul-F-box*). Na ausência de um elicitor, proteínas denominadas de JAZ (*jasmonate ZIM*

domain) atuam como repressoras de fatores de transcrição relacionados às respostas de defesa do JA, a partir da interação COI1-JAZ. Quando os domínios da proteína COI1 reconhece JA-Ile (produzido rapidamente em resposta a estímulos bióticos ou abióticos pela presença de um elicitador e acúmulo de JA), o complexo SCF^{COI1} induz a ubiquitinação e consequente degradação das JAZ pelo proteassomo 26S dependente de ATP. Com a degradação dessas proteínas, o estado de repressão é desativado pela liberação de fatores de transcrição (tais como MYC2, ERF1 e ORA59), o que desencadeia a expressão de genes de defesa associados ao JA (Katsir *et al.*, 2008; Pieterse *et al.*, 2009; Ballaré, 2011; Lyons *et al.*, 2013). A partir daí, a via de sinalização se divide em dois ramos principais: o ramo da superfamília de fatores de transcrição ERFs (*ethylene response factors*), como o ERF1 e ORA59; e o ramo dos fatores de transcrição MYC, como o MYC2 (originalmente chamado JIN1 [*jasmonate insensitive 1*]). Com relação ao ramo ERF, sabe-se que a expressão de ERF1 e ORA59 é induzida tanto por JA quanto por ET, sendo ativada de modo sinérgico por ambos os hormônios, o que corrobora para a convergência de sinalização entre JA e ET e desencadeia a expressão de alguns genes de defesa responsivos ao JA, tal como PDF1.2 (*plant defensive 1.2*). Portanto, o ET participa na indução do ramo ERF e inibe o ramo MYC2, fenômeno característico de uma resposta vegetal contra patógenos necrotróficos. Já o ramo MYC2 é caracterizado por desempenhar também um papel importante na ativação de alguns genes de defesa responsivos ao JA, a exemplo do gene VSP2 (*vegetative storage protein 2*) e LOX2 (*lipoxigenase 2*), inibindo a expressão de outros associados ao ramo ERF, como o PDF1.2. Assim, esse ramo regula a via de sinalização do JA quando ET está ausente, sendo associado principalmente à defesa contra herbívoros. Além disso, foi demonstrado que o hormônio ácido abscísico (ABA) regula o ramo MYC2, sendo um ponto de convergência entre a sinalização de ABA e JA, o que ativa a expressão de genes regulados por ABA e inibe um conjunto de genes de defesa responsivos ao JA (Lorenzo & Solano, 2005; Mauch-Mani & Mauch, 2005; Pieterse *et al.*, 2009; Wasternack & Hause, 2013). Diversos Genes *PR* podem ser ativados pela via de JA no ramo ERF, gerando como respostas de defesa algumas proteínas PR que atacam a parede celular do organismo invasor, a exemplo das quitinases codificadas por duas famílias de genes (PR3 [*pathogenesis-related protein 3*] e PR4 [*pathogenesis-related protein 4*]), além de inibidores de proteases, capazes de suprimir a atividade enzimática de

fitopatógenos. Em contrapartida, o ramo MYC parece reprimir a expressão desses genes *PR* (Van Loon & Van Strien, 1999; Lorenzo *et al.*, 2003; Lorenzo *et al.*, 2004). Outros genes responsivos ao JA incluem aqueles que codificam proteínas relacionadas ao processo de oxirredução e membros da família GST (*glutathione S-transferase*), tal como o gene GST22. Em um estudo prévio para avaliar a função do JA na regulação de respostas ao pulgão da couve (*Brevicoryne brassicae*) em plantas mutantes de *Arabidopsis*, ficou constatado que em um mutante para o gene AOS (enzima que atua na biossíntese de JA), deficiente na produção de jasmonato, houve mudanças induzidas pelo pulgão, com o comprometimento de genes ligados à oxirredução, a exemplo do GST22. E isso resultou numa proteção menos eficaz ao pulgão nesses mutantes, evidenciando então a importância de genes responsivos ao JA na indução de resistência em plantas (Kusnierczk *et al.*, 2011).

Estudos revelaram que a proteína NPR1 exerce um papel chave na interação antagonística entre JA e SA, sendo um regulador de fatores de transcrição que leva tanto à ativação de genes responsivos ao SA, fenômeno essencial para o estabelecimento da SAR, quanto à repressão de genes JA-dependentes que estabelecem a ISR (Ton *et al.*, 2002; Lorenzo & Solano, 2005; Pieterse *et al.*, 2009). Entretanto, outros refutam esse fato, de modo a dizer que pode haver uma sinergia entre as vias de SA e JA/ET para ativação simultânea da SAR e ISR, o que contribui num maior controle de doenças em plantas (Van Wees *et al.*, 2000; Ton *et al.*, 2002).

A rede de sinalização que envolve o ET se inicia com a captação desse hormônio gasoso por receptores de membrana plasmática, a exemplo do ETR1 e ETR2 (*ethylene response 1* e *ethylene response 2*, respectivamente). Esses receptores são reguladores negativos da resposta ao ET, pois em sua ausência atuam como ativadores do regulador negativo CTR1, o qual por sua vez reprime o regulador positivo EIN2 (*ethylene insensitive 2*). Com o acúmulo do ET na presença de um elicitor, a repressão do sinal de ET por CTR é liberada, fazendo com que esse gás se associe aos domínios transmembrana dos receptores ETR e permitindo a sinalização *downstream* da via por intermédio da consequente ativação do regulador positivo EIN2. Posteriormente, EIN2 ativa fatores de transcrição responsivos ao ET, tais como o EIN3 (*ethylene insensitive 3*). Geneticamente, EIN3 é ubiquitinado por um complexo ubiquitina ligase SCF^{EBF1/2}, contendo duas proteínas da família EBF (*EIN3-binding F-box protein*), EBF1 e EBF2; e então degradado pelo proteassomo 26S dependente de ATP. O ET inibe a ação do complexo SCF^{EBF1/2}, de

maneira ao acúmulo de EIN3 ativar outros fatores de transcrição, a exemplo do ERF, o que resulta na expressão de genes de defesa responsivos ao ET. Além disso, o EIN3 pode ao mesmo tempo se ligar e ativar as proteínas EBF, que são então recrutadas na formação do complexo SCF^{EBF1/2} e assim ocorrer a ubiquitinação e posterior degradação do EIN3. Por isso, EIN3 constitui num essencial regulador da via *downstream* do ET, promovendo uma série de mecanismos de defesa vegetal ao gás (Chao *et al.*, 1997; Konishi & Yanagisawa, 2008; Pieterse *et al.*, 2012).

Muito se fala sobre o papel do ácido abscísico (ABA) como o hormônio do estresse abiótico em plantas, sendo considerado um regulador negativo de resistência a fitopatógenos. Isso parece ocorrer devido ao efeito negativo gerado por sua interação com as vias de sinalização dos fitormônios mais estudados quando se trata de estresse biótico (SA, JA e ET). Entretanto, pesquisas mostram que o ABA pode está envolvido no aumento da resistência de plantas a doenças por meio do seu efeito positivo sobre a deposição de calose (Mauch-Mani & Mauch, 2005). Recentes avanços na identificação e caracterização de uma nova classe de proteínas, as RCARs/PYR1/PYLs, que atuam como receptores do ABA, permitem uma melhor compreensão acerca da via de sinalização mediada por esse hormônio em resposta a fatores bióticos e abióticos. Dois componentes centrais para que haja a transdução de sinais desencadeada por ABA, as PP2Cs (*2C protein phosphatases*) e as SnRKs (*SNF1-related protein kinases*), também foram descobertos e agem como reguladores negativos e positivos da via, respectivamente. Na ausência do ABA, as PP2Cs interagem com as SnRKs, o que resulta na desfosforilação dessas proteínas quinases e consequentemente, na sua repressão. Com o estímulo do ABA, RCARs/PYR1/PYLs interagem com PP2Cs, e essa interação promove a ativação (fosforilação) das SnRKs, inibindo a atividade das PP2Cs. Em seguida, as SnRKs ativam fatores de transcrição conhecidos como ABREs (*abscisic acid-responsive elements*), tais como ABFs (*ABRE binding factors*), que são componentes da via *downstream* do ABA e induzem a expressão de um grande número de genes ABA-dependentes (Choi *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2014). Um trabalho, que buscou avaliar a expressão gênica desses genes codificadores das proteínas principais da via de sinalização do ABA após três tratamentos (estresse abiótico, aplicação exógena de ABA e estresse biótico), mostrou um aumento da biossíntese, do metabolismo e catabolismo do ABA tanto na injúria abiótica quanto biótica; e também um aumento nos níveis de expressão de genes da sinalização do

ABA, tais como PP2Cs e ABFs, em todas as condições (Chan, 2012). Portanto, ABA e a sinalização de estresse biótico nem sempre tem efeitos opostos, sugerindo que se tenha uma sobreposição nas redes de sinais que controlam a tolerância ao estresse abiótico e a resistência a doenças (Mauch-Mani & Mauch, 2005).

Genes responsivos ao ABA, tais como os do grupo LEA (*late embryogenesis abundant*), estão envolvidos na resistência a estresses tanto bióticos quanto abióticos em plantas. Foi demonstrado que o gene LEA5, um membro dessa família, teve um aumento na sua expressão tanto em plantas transgênicas de arroz infectadas com uma bactéria *Xanthomonas* quanto no estresse abiótico desencadeado por duas condições: seca e anaerobiose. Essas plantas transgênicas para um gene que codifica o fator de transcrição OsEREBP1 (*ethylene responsive element binding protein 1*), importante componente da via *downstream* de sinalização gerada pela interação específica entre a bactéria e o arroz, mostraram aumento nos níveis de JA e ABA, com a doença sendo atenuada (Amara *et al.*, 2014; Jisha *et al.*, 2015). Por outro lado, outros genes parecem atuar como reguladores negativos da via do ABA, como é o caso do gene RPS4, que codifica uma proteína R. Em uma prévia pesquisa que avaliou mutantes de *Arabidopsis* infectados com bactéria *Pseudomonas syringae* sensíveis a temperatura e deficientes de ABA, foi mostrado que a temperatura elevada e a deficiência do ABA promoveu a atividade e o acúmulo nuclear de proteínas RPS4 na geração de uma resposta autoimune, sugerindo que haja uma modulação da biossíntese de ABA para que ocorra o combate à infecção (Mang *et al.*, 2012). Boava *et al.* (2011b) mostrou que genes diferencialmente expressos (tais como LEA5 e RPS4) a partir da técnica de microarranjos entre os genitores resistente (*Poncirus trifoliata*), suscetível (*Citrus sunki*) e nos híbridos, são candidatos promissores para a identificação de transcritos envolvidos na resistência à *Phytophthora*, causadora da gomose dos citros.

2.7. O uso de marcadores moleculares pelos programas de melhoramento genético e expressão gênica global por RT-qPCR

A aplicação de tecnologias moleculares tem oferecido ganhos adicionais na eficiência dos programas de melhoramento de plantas. Dentre as diferentes técnicas, tem-se o estudo do polimorfismo genético, que constitui o alvo da aplicação dos marcadores moleculares ao nível do DNA, fenômeno capaz de avaliar

diferenças genéticas entre dois ou mais indivíduos de uma dada população. Nesse contexto, o termo marcador molecular é definido como sequências de nucleotídeos ao longo dos cromossomos que determina e caracteriza um fenótipo, o que possibilita a identificação do genótipo, a localização no genoma dos genes relacionados ao tipo de herança e assim, permite a análise da variabilidade genética. Os marcadores moleculares reduziram o tempo para a caracterização de genótipos superiores em programas de melhoramento genético, auxiliando em métodos como a seleção assistida por marcador, o mapeamento genético e a impressão digital de DNA (*fingerprinting* molecular) (Bered *et al.*, 1997; Borém & Fritsche-Neto, 2013).

A variação existente entre os marcadores moleculares se dá pela detecção dos polimorfismos (diferenças entre os indivíduos), além de outros fatores como custo, facilidade de uso, consistência e reprodutibilidade. Os marcadores moleculares do tipo dominante são aqueles que detectam apenas o alelo dominante, ou seja, não permitem distinguir o homozigoto dominante do heterozigoto, tendo como exemplos os RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e os AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*). Inúmeros genes de resistência a doenças em plantas já foram caracterizados e clonados, bem como vários marcadores moleculares ligados a genes de resistência e à construção de bibliotecas BAC (Cromossomo Artificial de Bactéria) têm sido utilizados em melhoramento genético a fim de se estudar as várias doenças que assolam a agricultura. Com o advento do sequenciamento em larga escala, o acesso às sequências de diferentes organismos mostrou-se promissor à geração de marcadores moleculares como os do tipo codominante, capazes de visualizar e diferenciar todas as classes genotípicas (homozigoto e heterozigoto), a saber: RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*), polimorfismos de base única ou SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) e análogos a genes de resistência ou RGAs (*Resistance Gene Analogs*) (Carneiro *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2011).

Os microssatélites, também chamados de SSR (*simple sequence repeats*) e STR (*short tandem repeats*), são sequências repetidas em *tandem* que variam de 1 a 6 pares de bases e são classificados de diferentes maneiras, dependendo de seu tamanho, tipo de unidade de repetição e sua localização no genoma. Abundantes e bem distribuídos nos eucariotos, os SSR destacam-se pela grande variação no

número de repetições, resultantes de eventos mutagênicos dinâmicos e complexos, o que proporciona maior conteúdo informativo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

2.7.1. Marcadores DArT-seq

Os marcadores moleculares, então, têm contribuído para o entendimento da organização do genoma e da variação genética. Entretanto, muitos são limitados por sua dependência com os géis de eletroforese, proporcionando baixa reprodutibilidade. Além disso, os SSRs, por exemplo, necessitam de uma pré-identificação de um polimorfismo, o que requer o isolamento e o desenvolvimento de *primers* específicos para cada espécie, sendo esse processo demorado, trabalhoso e de alto custo. Diante disso, métodos baseados em genotipagem por sequenciamento (GBS) e que aliam enzimas de restrição mais hibridização de ácidos nucleicos imobilizados por *chips* de DNA, tem sido desenvolvidos. Duas tecnologias associadas à hibridização foram cada vez mais intensificadas, a saber: SNP e DArT (*Diversity Arrays Technology*). Em contraste com o SNP, que requer um intenso sequenciamento do genoma e um alto custo de análise, o DArT independe de qualquer informação da sequência de DNA genômico e pode ser implantado com uma fração dos recursos utilizados para as plataformas de SNP, satisfazendo os quesitos de custo, reprodutibilidade e cobertura do genoma. Utilizando mínima informação do sequenciamento de DNA e plataformas de microarranjos (baixo custo e alta reprodutibilidade), os marcadores DArT são obtidos por meio da redução da complexidade genômica pela captura de fragmentos de DNA com o uso de enzimas de restrição de cortes raro e frequente. Esses fragmentos, fruto da digestão do DNA, são em seguida amplificados e clonados. A partir da clonagem, é feita uma nova amplificação para a geração das sondas representativas do *pool* genético da espécie, que ficam dispostas em um *chip*, gerador dos microarranjos. Assim, o DNA a ser analisado é complementar às sondas e hibridizado ao *chip*, sendo marcado com fluoróforos para identificação em um aparelho apropriado. A detecção do polimorfismo ocorre presença ou ausência de hibridização dos fragmentos de DNA pelos microarranjos (Jaccoud *et al.*, 2001; Wenzl *et al.*, 2004).

Os marcadores DArT-seq, derivados dos marcadores DArT por microarranjos, surgiram aliados à técnica do sequenciamento de última geração (NGS), apresentando boa aplicabilidade para a construção de mapas genéticos de alta resolução por meio da genotipagem via sequenciamento. Sendo assim, a tecnologia

DArT-seq utiliza o sequenciamento do DNA e a clivagem pelas enzimas de restrição, permitindo o alinhamento dessas sequências cortadas com o genoma de referência da espécie, o que resulta na detecção dos polimorfismos. Esse procedimento pode desenvolver duas aplicações: a detecção da presença ou ausência de fragmentos em comum entre as amostras analisadas, com os marcadores DArT-seq atuando como dominantes; e/ou a identificação de polimorfismos de base única (SNPs), quando se compara as sequências de cada amostra, sendo então marcadores codominantes. Devido ao amplo polimorfismo gerado, os DArT-seq possibilitam novas oportunidades para o melhoramento e mapeamento genético de plantas no estudo das características de herança complexa (Sansaloni *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2013).

2.7.2. RT-qPCR para estudos de expressão gênica

A descoberta da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), durante o século XX, contribuiu para o desenvolvimento de enormes inovações técnico-científicas no campo das ciências biológicas, tais como o estudo da genética molecular, o sequenciamento genômico e a análise serial da expressão de genes com suas funções essenciais na caracterização do fenótipo. A identificação dos genes responsáveis pelos processos vitais em sistemas recombinantes constitui um importante passo na interação planta-patógeno, sendo possível traçar o perfil de expressão gênica dos genótipos contrastantes (suscetível x resistente) em resposta a uma dada doença. A quantificação da expressão global de genes foi inicialmente feita pelo sequenciamento massivo de transcritos (ESTs), útil na descoberta de novos genes associados a várias características, porém era trabalhosa e dispendiosa. Assim, uma variante da técnica de PCR, denominada de PCR em Tempo Real (RT-qPCR), vem cada vez mais abrindo espaço na detecção dos níveis de expressão gênica, a partir da análise de fragmentos de DNA codificante (cDNA) amplificados. O acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados oriundos dessa técnica ocorrem de forma mais rápida e precisa, em comparação ao PCR tradicional com sua análise qualitativa. Além disso, outras técnicas de expressão gênica diferencial, como RNA-Seq e microarranjos, permitem explicar a variação de transcritos em genes relacionados com os mecanismos de defesa em plantas (Calsa Junior *et al.*, 2004; Novais & Pires-Alves, 2004).

Um ensaio de expressão gênica via RT-qPCR consiste basicamente em: extração de RNA total das amostras; síntese de cDNA por meio da transcrição reversa, que é mediada pela enzima *transcriptase reversa*; e posterior aplicação da reação de qPCR em tempo real para amplificação, detecção e quantificação desse cDNA com *primers* específicos ao gene de interesse. A base da técnica é a mesma da PCR convencional; a diferença se encontra no acréscimo dos fluoróforos, os quais quando excitados, emitem sinais de fluorescência captados por fotodetectores do aparelho de qPCR, o que permite a quantificação dos produtos durante a fase exponencial da reação. Dessa forma, quanto maior for a quantidade de fluorescência emitida, maior será o número de fragmentos amplificados. Um gráfico, que se refere ao sinal de fluorescência em relação ao número de ciclos, é gerado por um *software* que captura e analisa os dados. O número de ciclos de amplificação necessário para atingir um limiar fixo determina o ponto no qual ocorre a quantificação exata de interesse estatístico. Esse ciclo limite é chamado de *Cycle Threshold* (C_T), essencial para a quantificação relativa de cada uma das amostras, de modo que quanto menor for o valor de C_T , maior será a amplificação e consequentemente, o gene alvo apresenta maior expressão para aquela amostra. A marcação do DNA/cDNA para a emissão de fluorescência pode ser realizada por diversos fluoróforos, de maneira ao mais comum ser feito por meio de corantes intercalantes, como o SYBR Green, que possui facilidade no uso, baixo custo e boa sensibilidade, chegando a aumentar cerca de 1000 vezes o sinal fluorescente quando está ligado ao DNA/cDNA. Sondas de hibridização marcadas com fluoróforos (TaqMan e *beacons*) também podem ser utilizados pela técnica de RT-qPCR (Schmittgen & Livak, 2008; Ladeira *et al.*, 2011; Maluf & Guerreiro Filho, 2011; Lobo & Lobo, 2014).

Portanto, a tecnologia do RT-qPCR é uma ferramenta poderosa para quantificar a expressão de genes-alvo, com grande aplicabilidade no estudo da interação patógeno-hospedeiro, apresentando alta sensibilidade quando comparada com a PCR qualitativa, além de alta acurácia e reprodutibilidade, velocidade na análise dos transcritos e menor possibilidade de contaminação (Novais e Pires-Alves, 2004).

Para a validação da expressão gênica relativa via RT-qPCR, é muito importante se ter um controle negativo (sem a amostra de cDNA), com o propósito de detectar possíveis contaminações; e um positivo, a fim de se padronizar variações inerentes às diversas etapas da técnica (tais como eficiência da

transcrição reversa, flutuações na quantidade inicial das amostras, integridade dos RNAs, erros de pipetagem, além de oscilações na expressão gênica dos tecidos e células analisados), garantindo uma correta interpretação dos resultados. Essa normalização é obtida comparando os valores de expressão do gene-alvo com os daqueles provenientes de genes endógenos (*housekeeping genes*), os quais se mantêm uniformes na maioria das células de espécies em estudo com diferentes condições ambientais e de desenvolvimento do organismo. Também denominados de genes de referência, são normalmente escolhidos devido serem destinados a processos celulares básicos (metabolismo primário ou manutenção da estrutura celular), de modo a terem uma expressão estável, possuindo pouca ou nenhuma variação. Na literatura, ocorre o relato de vários genes endógenos utilizados para a normalização dos dados de RT-qPCR em plantas submetidas tanto a estresse biótico quanto abiótico, a exemplo dos tradicionais GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e GAPC2 (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2*), que codifica uma isoenzima citosólica ao GAPDH e bem conservada nos organismos vivos. Entretanto, muitas pesquisas têm demonstrado que os níveis de expressão desses genes para várias espécies e condições experimentais são na verdade altamente variáveis. Assim, torna-se cada vez mais necessário a identificação de novos genes de referência, tais como SAND (*SAND Family protein*) e F-BOX (*F-box Family protein*), com o intuito de ocorrer uma escolha adequada para a normalização de dados por RT-qPCR antes das análises de expressão dos genes-alvo (Schmittgen & Livak, 2008; Lobo & Lobo, 2014; He *et al.*, 2016). Em virtude disso, o uso de ferramentas estatísticas, como o *software* GeNorm, apresenta uma grande contribuição para a seleção de genes candidatos a normalizadores em experimentos de qPCR, calculando o valor do *m-value*, indicando a estabilidade de expressão para cada gene de referência num determinado tamanho amostral e o uso de dois ou mais normalizadores dentre todos que foram testados, o que resulta numa acurácia maior dos dados (Spiegelaere *et al.*, 2015).

Lilly *et al.* (2011), num estudo com *Arabidopsis*, verificaram a estabilidade de alguns genes previamente identificados como endógenos em folhas de plantas infectadas com cinco tipos de vírus (*Cauliflower mosaic virus*, *Tobacco mosaic virus*, *Tomato spotted wilt virus*, *Turnip mosaic virus* e *Turnip yellow mosaic vírus*). Dentre os genes considerados mais estáveis pelo *software* GeNorm, estava F-BOX e

SAND, enquanto genes tradicionalmente considerados de referência, tal como ACT8 (*Actin 8*), foram menos estáveis pelas condições do experimento. Em outro trabalho, que envolveu a validação de *housekeeping genes* para estudos de expressão gênica em plantas de tabaco (modelo para interações patógeno-hospedeiro como *Arabidopsis*) infectadas com também cinco vírus (*Tobacco necrosis virus A*, *Beet black scorch virus*, *Beet necrotic yellow vein virus*, *Barley stripe mosaic vírus* e *Potato virus X*), a partir de três programas comumente utilizados (GeNorm, NormFinder e BestKeeper), foi encontrado o gene F-BOX como sendo um dos mais estáveis de forma geral (Liu et al., 2012). Além disso, genes como F-BOX, SAND e GAPC2 foram recomendados como controle endógeno para a expressão gênica via RT-qPCR em espécies de citros, num trabalho que buscou avaliar a estabilidade de genes de referência para a identificação de normalizadores adequados em estudos de citros desafiados com diferentes patógenos, incluindo o oomiceto *Phytophthora parasitica* (Mafra et al., 2012). Esses resultados fornecem informações valiosas para a seleção de genes de referência em plantas de citros sob várias condições de estresse biótico.

2.8. A construção de mapas genéticos, o mapeamento de QTLs e eQTLs na interação patógeno-hospedeiro

O princípio básico para o desenvolvimento de mapas genéticos foi estabelecido no curso da ciência por Thomas H. Morgan e seus colaboradores, que observaram distorções na segunda lei de Mendel quando trabalhavam com cruzamentos experimentais na mosca *Drosophila melanogaster*. Segundo Morgan, em um único cromossomo genes podem estar ordenados a tal ponto de ocorrer o processo de *crossing-over* entre cromossomos homólogos durante a meiose, e isso fazer com que a proporção da prole recombinante varie intensamente em relação à da não recombinante. Assim, sugeriu que a distância entre os genes situados no mesmo cromossomo promovia essa variação, de modo a mais tarde, um de seus colaboradores, Alfred H. Sturtevant, indicar que a estimativa da distância linear entre dois genes é dada pela porcentagem dos recombinantes. Os alelos de genes ligados, então, podem ser recombinados por *crossing-over*, o que despertou no meio científico a ideia do estabelecimento de mapas genéticos, que pudessem mostrar a posição dos genes nos cromossomos para uma determinada espécie. O efeito produzido pelos mapas genéticos, refletindo a localização e o ordenamento linear

dos genes, passou a ser parte da Teoria Cromossômica da Herança (Snustad & Simmons, 2013).

A utilização de marcadores moleculares revolucionou a área da genética, inclusive no sentido de ser tecnologia para a construção de mapas genéticos em diversas espécies, a partir do pressuposto de que a frequência de recombinação mede a intensidade da ligação gênica, e nunca é maior que 50% para dois locos marcadores considerados próximos ou ligados. Os primeiros mapas genéticos de plantas, baseados em marcadores morfológicos e citológicos, foram construídos para milho, tomate e arroz, entre os anos de 1986 e 1988. Desde então, a determinação de grupos de ligação no genoma de vários organismos pelo desenvolvimento de mapas genéticos saturados vem contribuindo para o estudo de características com herança complexa em diversas espécies vegetais, de maneira ao mapa transmitir informação genética que é base de várias técnicas, como por exemplo, o *chromosome walking* (“o caminhar” no cromossomo em direção aos genes de interesse). Portanto, a construção de mapas genéticos possui uma grande importância para o melhoramento de plantas, na medida em que permite analisar genótipos completos por meio da associação entre regiões do genoma com diversas características agronômicas (Borém & Frietsche-Neto, 2013; Snustad & Simmons, 2013).

Vale ressaltar que para a construção de mapas genéticos, premissas importantes devem ser consideradas, as quais constituem: seleção da população apropriada, com a escolha de genitores que sejam contrastantes e a determinação do tipo de cruzamento, sabendo que o desequilíbrio de ligação (associação não aleatória entre alelos de diferentes locos) alcança seu máximo em populações oriundas de cruzamentos controlados; tipo e número de marcadores genéticos usados; verificação dos marcadores que apresentam distorções da segregação mendeliana; mensuração da frequência de recombinação entre dois locos/marcadores, admitindo-se que a distância entre dois locos ao longo do qual se espera ocorrer *crossing-over* é expressa em centiMorgans (cM), medida derivada de Morgan (M); escolha da função de mapeamento, que irá relacionar as distâncias genéticas entre pares de marcadores no mapa com a frequência de recombinantes; estabelecimento dos grupos de ligação pelo *LOD score*; e o ordenamento dos marcadores nos grupos de ligação (Staub *et al.*, 1996; Liu, 1998; Carneiro & Vieira, 2002).

Em plantas perenes, como os citros, geralmente ocorre a construção de mapas genéticos pela genotipagem de uma progênie F_1 , já que é muito difícil a obtenção de gerações sucessivas (F_2 , F_3 , ...) em um curto período de tempo. O mapeamento em espécies do gênero *Citrus* é bastante favorável, pois apresentam uma série de particularidades tais como serem diploides ($2n$), com um n (número de cromossomos haploides) relativamente pequeno e igual a nove; apresentam alto polimorfismo; e possuem facilidade na produção de híbridos originados de cruzamentos interespecíficos e intergenéricos. Sendo assim, vários mapas de ligação já foram construídos em citros, utilizando inúmeros marcadores moleculares como os do tipo RFLP, RAPD, AFLP, SSR e SNP, com o intuito de buscar genes e/ou caracteres de locos quantitativos associados a múltiplas características, que incluem acidez de frutos, porte e vigor da planta, além de tolerância e/ou resistência a estresses abióticos (frio, salinidade, entre outros) e bióticos (vírus da tristeza dos citros, gomose causada por *Phytophthora*, entre outros) (Oliveira, 2013; Oliveira et al., 2014). Em adição a isso, dois mapas de ligação foram previamente construídos com a utilização de marcadores DArT-seq a partir da genotipagem de 272 híbridos F_1 , fruto de cruzamentos controlados entre duas espécies altamente contrastantes em relação à resistência de *Phytophthora*, que consistem no *Poncirus trifoliata* (genitor resistente) e *Citrus sunki* (genitor suscetível) (Lima et al., 2015).

A análise de segregação por centenas de marcadores é necessária para a construção dos mapas de ligação. Portanto, vários programas computadorizados foram desenvolvidos para auxiliar no amplo volume de dados genéticos a serem estabelecidos nos mapas em construção, dos quais vale citar o JoinMap (Stam, 1993) e o mais recente OneMap (Margarido et al., 2007), que permitem a utilização simultânea de diversas classes de marcadores com vários padrões de segregação. Além disso, duas estratégias podem ser feitas na construção de mapas genéticos: a integração do mapa, permitindo o uso de marcadores com tipos diferentes de segregação (1:1; 3:1; 1:2:1) ou a estratégia *pseudo-testcross*, que utiliza apenas a segregação de marcadores 1:1 (exclusivos para cada genitor) para a construção de dois mapas de ligação, sendo um para cada genitor (Gazaffi, 2009).

Em plantas, a maioria dos caracteres agrônômicos de interesse econômico é passível de medição, ou seja, de cunho quantitativo, tendo como exemplos o peso, teor de açúcar e acidez dos frutos, tempo de floração, além da resistência a doenças, resultantes da segregação de muitos genes e influenciados pela interação

do genótipo com o ambiente. Os locos individuais controladores da variação/expressão dessas características são os chamados QTLs (*Quantitative Trait Loci*), que constituem a matéria-prima do mapeamento genético, pois permitem correlacionar dados relativos de uma região genômica com a variabilidade fenotípica inerente a populações segregantes (Liu, 1997; Paran & Zamir, 2003).

Enquanto os QTLs têm sido estudados há anos, o mapeamento de QTLs só foi realizado após o desenvolvimento de marcadores moleculares e técnicas tais como o sequenciamento, além de uma melhoria de métodos estatísticos e programas computadorizados. A ligação entre marcadores genéticos e QTLs é avaliada em experimentos de fenotipagem e genotipagem, que faça uma análise associativa entre cada região do genoma com o fenótipo. Por isso, o mapeamento de QTLs proporciona resultados mensuráveis como o número de locos envolvidos na herança, as estimativas de variação fenotípica explicada por cada QTL e de seus efeitos genéticos (positivos ou negativos) quanto à expressão da característica estudada, além de possibilitar a posição desses QTLs ao longo das regiões cromossômicas representadas pelos grupos de ligação no mapa e a identificação de marcadores fortemente ligados aos QTLs. Fatores diversos podem influenciar na capacidade para detectar QTLs, os quais estão relacionados à magnitude do seu efeito sobre a característica; ao tamanho amostral, sendo que quanto maior for a quantidade de indivíduos fenotipados e o valor de herdabilidade do caráter, maior será o poder de detecção; e ao número de marcadores disponíveis juntamente com os indivíduos genotipados para a construção do mapa (Tanksley, 1993; Parmentier *et al.*, 1999; Carneiro & Vieira, 2002; Salvi & Tuberosa, 2005). Assim, metodologias aplicadas ao mapeamento de QTLs podem aumentar as chances para detectar QTLs. Dentre esses métodos, destaca-se o mapeamento por intervalo composto (*composite interval mapping*), que faz uma busca incessante por QTLs tanto dentro quanto fora do intervalo em questão utilizando um modelo de regressão linear múltipla (Zeng, 1994).

A identificação e localização de QTLs em mapas genéticos de ligação constituem alvos de estudo em vários programas de melhoramento de plantas e consequentemente, de citros. Trabalhos desenvolvidos no Centro APTA Citros Sylvio Moreira, com o emprego do mapeamento genético a fim de detectar QTLs ligados à resistência para diversas doenças que assolam a cultura dos citros e trazem enormes prejuízos à citricultura brasileira e mundial, já identificaram locos de

resistência ao CTV (vírus da tristeza dos citros), com a utilização da estratégia *pseudo-testcross* e dos marcadores RAPDs, o que resultou na construção de dois mapas de ligação, um para o genitor *Poncirus trifoliata* e outro para *Citrus sunki*, tendo um comprimento total de 732,32 cM e 866,88 cM, respectivamente (Cristofani-Yaly, 1999); e QTLs associados com a resistência de *Phytophthora* em *Poncirus trifoliata* e *Citrus sunki*, com a mesma progênie F₁ do estudo anterior, sendo detectados um total de dois no mapa do genitor resistente trifoliata e apenas um no mapa da tangerina Sunki, suscetível ao patógeno (Siviero *et al.*, 2006).

O estudo da genômica, a partir do sequenciamento do material genético de vários organismos e seu armazenamento em uma série de banco de dados disponíveis, tem avançado profundamente com técnicas de robotização e análises de expressão gênica global (RNA-Seq e microarranjos). Dessa forma, o conjunto de informações genéticas referentes a fenótipos, relações de parentesco, marcadores moleculares e expressão de genes de interesse fazem parte de delineamentos clássicos em genética genômica, termo que engloba o estudo de mecanismos biológicos controladores das múltiplas características fenotípicas de natureza complexa. Indivíduos genotipados com marcadores moleculares podem ser avaliados quanto a padrões de expressão gênica em experimentos com microarranjos de cDNA, o que contribui para a análise dos níveis de transcrição dos genes candidatos diferencialmente expressos. Os valores de expressão, então, passam a ser tratados de maneira similar a caracteres fenotípicos em típicos procedimentos do mapeamento de QTLs, detectando polimorfismos nos mapas genéticos de ligação em relação à ampla variação dos perfis de expressão para cada gene. Esses perfis de transcrição diferencial permitem associar o estado alélico de uma região do genoma com a quantificação dos transcritos gênicos, identificando regiões genômicas chamadas de QTLs de expressão (eQTLs - *expression quantitative trait locus*). A determinação de uma região cromossômica que atua no processo de expressão de um gene para um dado caráter fenotípico em populações segregantes pelo mapeamento de eQTLs é de extrema importância para o melhoramento de plantas, partindo do pressuposto de que a transcrição de um gene consiste no intermediário entre a informação codificada no genoma e o fenótipo final (Jason & Nap, 2001; Rosa, 2007; Kujur *et al.*, 2013).

A maioria dos estudos de mapeamento de eQTLs são desenvolvidos com experimentos de expressão gênica utilizando a técnica de microarranjos e com

mapas de ligação contendo um modelo de localização do gene entre as marcas genéticas distribuídas pelo genoma. Nesse sentido, esforços podem ser feitos para a identificação de eQTLs que representam um polimorfismo próximo ao gene, de maior efeito, já que tem influência direta na expressão do gene (Hansen *et al.*, 2008; Ackermann *et al.*, 2013). De qualquer forma, muitos trabalhos já foram conduzidos com eQTLs em várias culturas vegetais, relatando grandes diferenças nos valores de expressão entre os indivíduos segregantes para um único gene, o que resultou na detecção de eQTLs tanto próximos quanto distantes à sequência gênica (West *et al.*, 2007; Drost *et al.*, 2010; Holloway *et al.*, 2011).

Para mapear eQTLs em mapas de ligação, ensaios de expressão gênica com RT-qPCR podem ser estabelecidos para quantificar os valores de expressão de genes candidatos em muitos indivíduos que compõem a população. O mapeamento de eQTLs denota o quanto uma região cromossômica afeta o nível de transcrição de um gene, a ponto de em populações segregantes oriundas de cruzamentos entre genitores altamente contrastantes, a construção de dois mapas genéticos ser bastante interessante, já que pode revelar eQTLs identificados em ambos os mapas parentais, comprovando que diferentes genótipos possuem distintos locos reguladores e sugerindo qual combinação favorável de eQTLs é passada para os indivíduos da progênie, com a variação existente, por exemplo na resposta de genótipos de plantas frente aos patógenos, podendo se atribuir à presença/ausência de QTLs e/ou eQTLs. O mapeamento de um grande conjunto de genes diferencialmente expressos corrobora para a compreensão da complexidade de fenótipos, apoiando o estudo de extensas redes regulatórias, em que a integração/sobreposição de múltiplos eQTLs, bem como a co-localização eQTL/QTL, evidenciam a identificação de genes valiosos no controle da variabilidade fenotípica (Rosa, 2007; Cubillos *et al.*, 2012; Lukens & Downs, 2012). Assim, o mapeamento de QTLs (dados fenotípicos) e eQTLs (dados de expressão) compreendem ferramentas inovadoras para a compreensão da interação patógeno-hospedeiro e dos mecanismos de resistência e resposta da planta às doenças.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Mapear nos grupos de ligação dos mapas de *Poncirus trifoliata* e *Citrus sunki* as regiões genômicas associadas à resistência à *Phytophthora parasitica* por meio de análise fenotípica (QTLs) e de expressão (eQTLs).

3.2. Objetivos específicos

Avaliar a resistência dos híbridos de *Poncirus trifoliata* e *Citrus sunki* à *Phytophthora parasitica*;

Analisar pela técnica de RT-qPCR (PCR Quantitativo em Tempo Real) a expressão de genes candidatos relacionados à resistência à *Phytophthora parasitica*, oriundos de ensaios de microarranjos e trabalhos anteriores nos genitores, nos híbridos e em todos os indivíduos do experimento.

4. Material e métodos

4.1. Multiplicação e manutenção do material vegetal

Uma população de 110 híbridos de *Poncirus trifoliata* (resistente à *Phytophthora*) x *Citrus sunki* (suscetível) e genitores provenientes da coleção de Germoplasma (BAG – Citros) do Centro de Citricultura Sylvio Moreira foi estabelecida em casa de vegetação (Figura 1). Os genitores foram escolhidos baseando-se na hipótese de que genes diferencialmente expressos entre plantas resistentes e suscetíveis, bem como entre os seus híbridos resistentes e suscetíveis, seriam candidatos promissores envolvidos na resistência. Foram avaliados também o limão Cravo (*Citrus limonia*) e o citrumelo Swingle [*C. paradisi* Macfad. cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], dois porta-enxertos de referência na citricultura. Assim, duas repetições de cada híbrido, de seus genitores, de limão Cravo e de citrumelo Swingle foram obtidas pela enxertia de borbulhas em porta-enxerto limão Cravo, com as plantas sendo mantidas em casa de vegetação até o caule atingir o diâmetro de aproximadamente 0,8 a 1,0 cm.



Figura 7. População de plantas obtidas pela enxertia de borbulhas em porta-enxerto limão Cravo. Foto: Rômulo Lima

As plantas foram acondicionadas em sacos de polietileno de 3 litros contendo substrato comercial utilizado para formação de mudas cítricas ('Rendimax' + adubo peletizado de liberação lenta 'Osmocote', na formulação 18-05-09) e recebendo irrigações diárias e adubação foliar de reposição com fosfato monoamônico (MAP) e nitrocálcio na dosagem de 500 e 300 g para cada 20 litros de água, respectivamente.

4.2. Isolamento e manutenção de *P. parasitica*

O isolamento e manutenção dos isolados de *P. parasitica* foram realizados na Clínica de Fitopatologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira. Utilizou-se o isolado

IAC-01/95, pertencente à coleção de isolados da Clínica Fitopatológica e obtido a partir de solo infectado. Discos de micélio do patógeno crescendo em meio de cultura cenoura-ágar (CA) (Kaosiri *et al.*, 1978), contendo 1 mL de Rifampicina, 1 mL de Ampicilina e 2 mL de Benomil a cada 1000 mL do meio foram retirados das colônias e transferidos para placas de Petri com 15 mL desse meio (Figura 2). As placas foram mantidas a 25°C, no escuro, durante seis dias, até o crescimento do micélio em toda a superfície do meio. Posteriormente, foi feita uma pré-inoculação na região do colo de algumas plantas, com a retirada de parte do micélio mantido em meio de cultura após o crescimento.

Para ativar a patogenicidade do isolado, foi realizado um re-isolamento a partir das secções de lesão provenientes do tecido infectado com o micélio do patógeno (pré-inoculação). Pequenas porções de cascas da lesão foram tomadas e inoculadas em frutos de limão Siciliano (*Citrus limon*) utilizando palitos-de-dente autoclavados. Esses frutos, então, foram incubados à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas durante nove dias, sendo em seguida, abertos cuidadosamente sob breve assepsia em câmara de fluxo. Com a manifestação da doença em boa parte da área dos frutos, as sementes contaminadas foram retiradas e transferidas para placas de Petri contendo os meios de cultura seletivos com cenoura-ágar, de maneira a posteriormente serem mantidas a 25°C, no escuro, durante seis dias, até a formação do micélio patogênico.



Figura 8. Crescimento do micélio de *P. parasitica* após seis dias em placa de Petri com meio de cultura cenoura-ágar (CA). **Foto:** Rômulo Lima

4.3. Inoculação do patógeno

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com duas repetições do mesmo genótipo e uma planta por parcela. Cada híbrido foi conduzido com uma única haste e a inoculação foi realizada a 10 cm e 15 cm acima da região da enxertia, totalizando duas inoculações por genótipo, segundo o método descrito

por Siviero *et al.* (2006). Essa metodologia consiste em: desinfestação com álcool da superfície da região do tronco a ser inoculada; incisão na casca com furador de rolhas, retirando-se um disco de 5 mm de diâmetro, expondo assim, a zona cambial (Figura 3A); introdução de um disco de igual diâmetro de micélio de *Phytophthora parasitica* virulento mantido em meio de cultura (Figura 3B); recolocação do mesmo disco da casca e proteção do local do ferimento causado pela inoculação com algodão e esparadrapo (Figura 3C).

Como controle, e para retirar o efeito do estresse causado pelo ferimento, foi feito apenas a incisão na casca com furador de rolhas, sem a inoculação do patógeno, em cada genótipo da população do experimento.

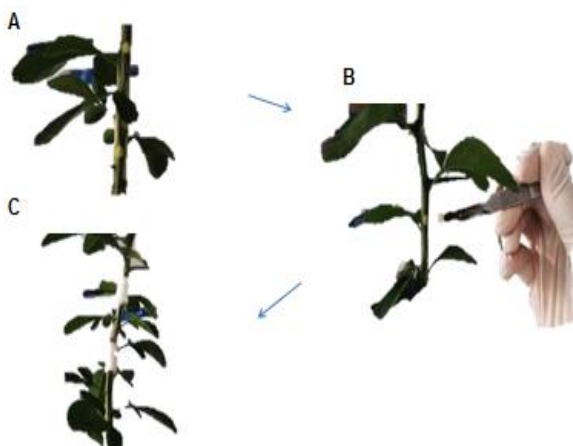


Figura 9. Inoculação de *Phytophthora parasitica* pelo método descrito por Siviero *et al.* (2006). (A) Abertura da casca com furador de rolhas; (B) Introdução do disco de micélio de *P. parasitica*; (C) Proteção do local do ferimento causado pela inoculação de *P. parasitica* com algodão e esparadrapo. **Fotos:** Rômulo Lima

4.4. Fenotipagem – avaliação das lesões

Para a avaliação das lesões, as plantas foram mantidas em ambiente com iluminação artificial e fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25°C e umidade relativa (UR) de 85%, com irrigações diárias. As lesões decorrentes foram avaliadas após 60 dias da inoculação, medindo-se o comprimento da área lesionada após a remoção da casca do tronco com auxílio de um paquímetro digital, expondo-se totalmente a lesão desenvolvida.

4.5. Análises estatísticas dos dados fenotípicos

Para a hipótese de normalidade dos dados e para as análises estatísticas, os comprimentos médios das lesões do grupo de indivíduos inoculados (CL_I) foram subtraídos dos comprimentos médios obtidos do grupo controle de indivíduos (CL_C), que geralmente girava em torno de 5 mm, devido ao diâmetro do furador de rolhas

usado para causar o ferimento na planta, surgindo a variável CL_R (comprimento real da lesão) [$CL_I - CL_C = CL_R$]. Assim, os 5 mm já obtidos pela injúria no momento da inoculação para expor a zona cambial nas plantas eram eliminados, demonstrando a lesão real ocasionada pela gomose dos citros. Um histograma de distribuição das médias das lesões foi obtido pelo uso do *software* Minitab 14, a partir dos testes de normalidade Anderson-Darling e Kolmogorov-Smirnov, com os dados fenotípicos em transformação logarítmica (base 10).

As análises estatísticas foram realizadas com o uso do programa computacional SASM-AGRI (Canteri, 2001), aplicando-se o teste F para análise de variância e utilizando-se o modelo estatístico apropriado em delineamento inteiramente casualizado, bem como o teste Scott-Knott para a comparação de médias dos tratamentos.

Com as médias dos dados fenotípicos de avaliação dos CL_R da progênie do cruzamento *P. trifoliata* x *C. sunki*, foram calculados os parâmetros genéticos (herdabilidade, variância, coeficiente de variação, ganho genético) para a variável mensurada utilizando o aplicativo SELEGEN-REML/BLUP. Essa metodologia promove a maximização dos ganhos genéticos com seleção, o que favorece ao melhoramento genético de plantas perenes (Resende, 2002).

4.6. Genotipagem e construção dos mapas genéticos de ligação

O DNA total de 272 híbridos e dos dois genitores *P. trifoliata* e *C. sunki* foi extraído, tratado com RNase, quantificado em *NanoDrop ND-8000 spectrophotometer* (Thermo Scientific) com concentração desejável de no mínimo 1 µg (100 ng/µL) e sua integridade avaliada com eletroforese em gel de agarose a 1%. As soluções contendo DNA de cada amostra foram distribuídas em placas de 96 poços e armazenadas em freezer a -20°C até o envio para a genotipagem do material.

A técnica DArT-seqTM foi aplicada para a genotipagem dos 274 indivíduos (híbridos e genitores) pela empresa prestadora de serviços *Diversity Arrays Technology Pty Ltd* (DART P/L), com sede na Austrália. Essa metodologia utiliza duas enzimas de restrição (uma de corte raro e outra de corte frequente) para a redução da complexidade do genoma, seguido do sequenciamento de última geração (NGS) para a obtenção dos marcadores DArT-seqTM. Primeiramente, os fragmentos de restrição resultantes foram ligados a adaptadores específicos,

amplificados usando *primers* seletivos contendo sequências complementares aos adaptadores e analisados quanto à pureza, a fim de ocorrer a formação da “representação genômica” da espécie. As sequências desses adaptadores contêm iniciadores de sequenciamento, sendo os fragmentos lidos a partir do sítio de restrição de uma das enzimas (geralmente a de corte raro). Os fragmentos, então, foram analisados quanto à qualidade em arquivo FASTA e alinhados com o genoma de referência da tangerina Clementina, disponível em *Phytozome* v. 0.9. Os DNAs de indivíduos a serem genotipados foram sequenciados em equipamento Illumina® HiSeq 2000. Dessa forma, houve a obtenção de 7851 marcadores DArT-seqTM associados à população dos 272 híbridos F₁. Tais marcadores foram codificados como “0”, se ausente; e “1”, se presente, sendo analisados quanto ao padrão de segregação mendeliana esperado para uma progênie F₁, que pode ser de dose única 1:1 (oo x ao ou vice-versa) e 3:1 (ao x ao). Marcas que apresentaram distorções de segregação foram retiradas da análise pelo teste de aderência do Qui-Quadrado (χ^2).

Mapas genéticos de ligação altamente saturados de *Poncirus trifoliata* e tangerina Sunki foram previamente construídos utilizando a estratégia *pseudo-testcross*, em que são feitos dois mapas, um para cada genitor contrastante e complementar, pelo uso de marcadores que segregam na proporção mendeliana 1:1. Marcadores exclusivos para o genitor *P. trifoliata* foram selecionados e chamados D1 (oo x ao), assim como aqueles informativos apenas para o genitor *C. sunki* foram denominados D2 (ao x oo). Todos os *loci* DArT que não apresentaram segregação 1:1 foram eliminados da análise. A escolha dos genitores foi feita com base na resistência/suscetibilidade à *Phytophthora*, e os mapas de ligação foram desenvolvidos utilizando os 272 híbridos F₁ provenientes de cruzamentos controlados, por meio do *software* OneMap (Margarido *et al.*, 2007). Para tanto, os critérios usados foram: LOD score = 8 e máxima fração de recombinação = 0,3 para a formação dos grupos de ligação nos dois mapas, além de informação genômica com o genoma de referência de *Citrus sinensis* disponível em *Phytozome* v. 0.9. A função de mapeamento proposta por Kosambi (1944) foi utilizada para a conversão em cM (centiMorgans) dos valores das frações de recombinação entre as marcas. A ordenação preliminar dos marcadores de cada genitor foi efetuada a partir do algoritmo de RCD (Delineação rápida em cadeia) para a remoção de marcadores redundantes, que apresentam fração de recombinação igual a zero (Doerge, 1996).

Em seguida, foi utilizado o algoritmo de ordenação para os dois grupos contendo os marcadores informativos 1:1, havendo a geração dos dois mapas de ligação dos genitores contrastantes.

4.7. Mapeamento de QTLs

Para as análises do mapeamento de QTLs, foram consideradas as médias de avaliação dos dados fenotípicos de CL_R em transformação logarítmica (base 10) levantados pelo presente trabalho na população segregante dos 110 híbridos. Sendo assim, os QTLs foram mapeados nos dois mapas de ligação existentes dos genitores por meio da estratégia do mapeamento de intervalo composto (CIM) (Zeng, 1994) com o uso do pacote FullsibQTL da linguagem de programação R (Gazaffi *et al.*, 2014). O CIM permite que se faça uma busca contínua de QTLs ao longo dos mapas de ligação, considerando os pares de marcadores adjacentes e também a inclusão dos chamados cofatores (marcadores localizados em outras regiões do genoma), o que aumenta o poder de detecção de QTLs e a precisão das estimativas de efeito e posição (Gazaffi, 2009). Assim, um máximo de 20 cofatores foi estipulado com vistas a localizar QTLs fora do intervalo de mapeamento, buscando evitar também superparametrizações do modelo proposto pelo método de mapeamento. O teste estatístico LOD score (LD), usado para detectar a presença ou ausência de cada QTL, foi feito pelo teste de permutação randômica ($\alpha = 0,05$; $n = 1000$ repetições) (Churchill & Dodge, 1994), disponível no FullsibQTL. “LOD scores” críticos foram calculados para identificar QTLs. A porcentagem da variação fenotípica explicada pelos QTLs foi estimada usando regressão linear (R^2).

4.8. Expressão gênica

4.8.1. Coleta de folhas, extração de RNA e síntese de cDNA

A coleta de folhas foi realizada 48 horas após a inoculação do patógeno nas plantas, sendo armazenadas em nitrogênio líquido e colocadas posteriormente em freezer a -80°C até o momento da extração de RNA. A escolha do tempo foi baseada em estudos prévios de *time course* que avaliaram a resposta sistêmica de plantas a partir da expressão de genes envolvidos na interação citros-*Phytophthora* (Boava *et al.*, 2011a; Teixeira, 2005) e associados às vias de sinalização dos fitormônios que ativam diversos mecanismos de defesa na planta.

A extração de RNA total do material vegetal foi realizada de acordo o método do cloreto de lítio (LiCl) descrito por Chang *et al.* (1993). Para evitar contaminações

com DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase I, RNase-Free kit (Fermentas Life Sciences), seguindo as recomendações do fabricante. 300 mg das folhas provenientes de um mesmo genótipo foram maceradas com nitrogênio líquido e coletaram-se três tubos do macerado resultante (100 mg cada), totalizando três repetições biológicas por genótipo. O RNA total, então, foi quantificado em *NanoDrop ND-8000 spectrophotometer* (Thermo Scientific), e sua integridade foi avaliada com eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1,2%.

O cDNA foi produzido segundo instruções do manual do *Revertaid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas), com a utilização de *primers oligo (dT)*, sendo posteriormente tratado com *RNase H* (1 U) para remover qualquer contaminação com RNA. Posteriormente, o cDNA obtido foi diluído em água livre de RNase na proporção de 1:50, com as três repetições biológicas de cDNA (50 µL cada) sendo misturadas, o que formou um pool gênico de amostras representadas num único tubo contendo 150 µL de cDNA diluído para cada genótipo a ser analisado nos ensaios de expressão gênica e mapeamento de eQTLs.

4.8.2. RT-qPCR (PCR Quantitativo em Tempo Real) para validar a expressão gênica

A expressão de 19 genes candidatos por RT-qPCR (Tabela 1), selecionados em trabalhos anteriores de expressão gênica via qPCR e com microarranjos do Centro de Citricultura Sylvio Moreira (Boava *et al.*, 2011a; Boava *et al.*, 2011b), além de outros estudos de interação patógeno-hospedeiro disponíveis na literatura, foi avaliada em 51 híbridos, nos dois genitores da população, no limão Cravo e no citrumelo Swingle. A seleção dos híbridos para os ensaios de RT-qPCR foi realizada com base na aplicação do teste Scott-Knott nos dados fenotípicos, que os separou em dois subgrupos e um grupo (suscetíveis [S]; moderadamente suscetíveis [MS]; tolerantes e/ou resistentes [T/R], respectivamente). Como o grupo T/R obteve uma maior quantidade de genótipos pelo teste de separação das médias (91 híbridos), enquanto os subgrupos S e MS juntos tiveram 19, e dando preferência àqueles híbridos mais contrastantes (suscetíveis e tolerantes/resistentes), que constituem materiais promissores para o entendimento das respostas de defesa da planta pela ativação de genes diferencialmente expressos, foram selecionados nove híbridos suscetíveis que formaram o grupo S/MS (suscetíveis e/ou moderadamente

suscetíveis), dos quais seis eram pertencentes ao subgrupo S e três ao MS; e 42 do grupo T/R.

No geral, houve a busca de genes conhecidamente relacionados a processos de defesa celular, que envolvem as principais vias de fitormônios como a do ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA), etileno (ET) e ácido abscísico (ABA). Devido a evidências de que espécies do gênero *Phytophthora* atuam como agentes biotróficos nas primeiras 36-48 horas após a infecção, ativando preferencialmente a via do SA, um maior número de genes relacionados a essa via foi escolhido para avaliação da expressão gênica em resposta a *P. parasitica*. Entretanto, alguns genes de defesa associados às vias do JA/ET e JA/ABA também foram selecionados, partindo do pressuposto de que após 48 horas, organismos hemibiotróficos saem da fase biotrófica e iniciam a necrotrófica, culminando numa reprogramação transcricional para a expressão de genes de defesa associados tanto ao SA quanto ao JA/ET e JA/ABA (Grenville-Briggs & West, 2005; Boava *et al.*, 2011b). Como controles endógenos, foram testados os genes F-BOX, SAND e GAPC2. Esses três genes são utilizados rotineiramente para normalizar dados de RT-qPCR em espécies de citros (Mafra *et al.*, 2012).

Os *primers* oligonucleotídeos que flanqueiam as regiões gênicas foram sintetizados usando o *software Primer Express 2.0* (Applied Biosystems), e checados quanto à especificidade por meio da ferramenta *Primer-BLAST* no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information). A obtenção de suas sequências (Tabela 1) foi encontrada na literatura, em trabalhos que avaliavam experimentos de RT-qPCR com *Arabidopsis*, tabaco, arroz e também com o genoma de referência *Citrus sinensis* para plantas de citros.

Para a validação dos *primers* sintetizados, foi feita a PCR convencional, com o intuito de avaliar as sequências amplificadas de cDNA. Buscou-se avaliar nas reações de PCR algumas condições iguais aos ensaios de RT-qPCR em termos de concentração final de *primers* (200 nM) e temperatura de anelamento (60°C) para melhor transparência dos resultados. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose a 2%, preparado com TAE 1X e brometo de etídio. As reações para cada par de *primer* incluíram sempre um branco (sem cDNA) com o objetivo de detectar possíveis amplificações inespecíficas e contaminações.

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

μL de GoTaq qPCR Master Mix (Promega), 3 μL de cDNA (diluição de 1:50), sendo retirado do pool gênico formado pelas três repetições biológicas existentes de cada genótipo (150 μL cada), 200 nM de cada *primer* e água para um volume final de 15 μL em um equipamento *7500 Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems) com ciclos de: 50°C por 2 min; 95°C por 10 min; 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Para cada reação foi realizada uma curva de dissociação para verificação de possíveis contaminações e reações inespecíficas. Além disso, as reações para cada par de *primer* foram feitas em duplicatas, utilizando sempre controle sem cDNA para detectar possíveis contaminações.

Tabela 1. Genes selecionados para os ensaios de RT-qPCR, com suas descrições, sequências de *primers*, vias de defesa e referências que foram levantadas para avaliar a resposta da progênie do cruzamento *P. trifoliata* x *C. sunki* à gomose dos citros.

Gene	Descrição	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')	Via de defesa	Referências
PAL2	Phenylalanine Ammonia Lyase 2	CACAAATTGAAGCACCATCC	TTCTCAGGGCATAACGATCC	SA	Boava <i>et al.</i> , 2011b
EDS1	Enhanced disease susceptibility 1	TTTACAGGGCATTCTCAGCTGGT	TATAGGTGGCATTCTGCTGGTGCT		Oliveira, 2013
NPR3	Non-expressor of PR genes 3	GCTCCTGAGAAGGGGGTTAAT	CACAACTGGGATACCCTCAAC		Oliveira 2013
WRKY70	WRKY 70 transcription factor	AGGGTAAGAAATTTGCCACCAGC	AGAATTTCGCTGCTGCTGCTGATA		Oliveira 2013
WRKY46	WRKY 46 transcription factor	TCGGGGACAGCATTGGAAGGGA	ACCTCGGGCATGACGATGCG		Oliveira 2013
WRKY62	WRKY 62 transcription factor	CCGGTCAGGCCACGTCTTCA	AGCTGCAGTGCCATTTCTTGGC		Oliveira 2013
SGT1b	SA glucosyltransferase 1	GCAAGCCATTGAGATTAGCC	GCCACCTTAGCCGTTTCATA		Oliveira 2013
BSMT1	SA/benzoic acid methyltransferase 1	GTTTAACGAGGCCGTTGATG	TCGTCAAGGAACTGTCACG		Oliveira 2013
PR2	Pathogenesis-related protein 2	CGCTCAGTACCTTGTTCCCGCC	TTGGTTTCCAAGGCCGGCTGC		Oliveira 2013
MKP1	MAP kinase phosphatase 1	GTTCAACTGAACCCCTTGA	CACGGCATCACTCCCTAAAT		Boava et al., 2011b
ACO	ACC oxidase	ATGGAATTGAGCCGGAG	GATACCTTCAAGTGCCCT	JA/ET	Boava <i>et al.</i> , 2011b
EIN3	Ethylene-insensitive 3	GGAGCGTCTGATAATCTTCG	AAGGTGTGAGGCGTAGACAC		Boava <i>et al.</i> , 2011b
PR3	Pathogenesis-related protein 3	GCCTGAATCCCAGTAACCAA	AAAGCAGCTAGGTTCCACA		Boava <i>et al.</i> , 2011a
Chit.	Chitinase [Citrus sinensis]	ACAGAATTGTGGAAGCGG	AGCAAGTCTTCAAACATCTCC		Boava <i>et al.</i> , 2011a
PR4	Pathogenesis-related protein 4	GCTGCACGTGCTTATTGCTCAACT	ATTCTCACCGTTGCTTGAGCTCCT		Oliveira 2013
GST22	Glutathione S-transferase 22	CTGATCTGAGTCACCTTCCA	GGCCTGTTGCTAATATCATCC		O'Kane & Al-Shehbaz, 1997
ABF	Abscisic acid responsive element-binding	GTAATGATGATTGGTTGGAGG	TTTCTCCCATATTGAGGGAC	JA/ABA	Zhang <i>et al.</i> , 2006
RPS4	RPS protein 4	CCAAGATCTTGAATATCTTCCC	GCAAGTTGAGCTCAATTAGG		Boava <i>et al.</i> , 2011b
LEA5	Late embryogenesis abundant 5	TCGGACTGGTATCATGGA	GTAGTACCCAGTGATGGGA		Boava <i>et al.</i> , 2011b
Controle endógeno					
FBOX	F-box family protein	GGCTGAGAGGTTTCGAGTGTT	GGCTGTTGCATGACTGAAGA	N	Mafra <i>et al.</i> , 2012
SAND	SAND family protein	AACTCTATGCAGCATTTGATCCACT	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC		Mafra <i>et al.</i> , 2012
GAPC2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrigenase C2	TCTTGCCTGCTTTGAATGGA	TGTGAGGTCAACCACTGCGACAT		Mafra <i>et al.</i> , 2012

SA=Ácido salicílico; JA=Ácido Jasmônico; ET=Etileno; N=Normalizador.

4.8.3. Normalização dos dados de RT-qPCR e análises de expressão gênica

A estabilidade de expressão para cada gene de referência foi avaliada pelo uso do *software* GenEx v. 6 (www.multid.se), que disponibiliza o algoritmo do GeNorm para se fazer as comparações par-a-par entre os genes endógenos, determinando qual a melhor combinação (dois ou mais genes) a ser utilizada. Assim, calcula o valor médio da estabilidade de expressão, chamado de valor M (*m-value*) para cada gene, de modo a estabelecer um *ranking* que leva à eliminação daquele com maior valor M numa primeira comparação de dois genes. Em seguida, o processo é repetido até que haja dois ou mais genes superiores com valores M idênticos, que apresentam alta correlação e são sugeridos como par ideal de genes para normalização dos dados de RT-qPCR. Dessa forma, o valor da estabilidade de expressão reflete a variação de um gene quando comparado aos pares com todos os outros genes analisados, podendo ser relacionado com o valor de SD (desvio-padrão). A maior estabilidade de um gene é indicada por um menor *m-value* (Spiegelaere *et al.*, 2015). Os dados que serviram de entrada para o cálculo do valor M pelo algoritmo do GeNorm foram as quantidades relativas de cada amostra juntamente com a eficiência do *primer*, segundo Mafra *et al.* (2012).

Para a detecção das quantidades relativas, dos níveis de expressão, dos valores *Fold change* e da estabilidade dos genes endógenos, foram considerados dois tratamentos no estudo do complexo *Phytophthora*-citros: plantas inoculadas com *Phytophthora parasitica* (grupo infectado) e plantas não inoculadas (grupo controle) a partir do método descrito por Siviero *et al.* (2006). Sendo assim, foram feitos cálculos com base no número de ciclos de amplificação necessário para atingir um limiar fixo (ciclo limite - Ct) na fase exponencial da PCR. A eficiência de amplificação e os dados de Ct foram calculados para cada reação de qPCR por meio do *software Real-time PCR Miner* (Zhao & Fernald, 2005), que implementa um algoritmo normalizador dos dados brutos de fluorescência em função dos ciclos da PCR. Para cada gene foi calculado uma eficiência média de todas as PCR feitas. A média dos valores de Ct das duas repetições técnicas de cada genótipo analisados também foi estimada. Com esses dados obtidos, a quantificação relativa, determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ entre as condições de RT-qPCR (Livak & Schmittgen, 2001) e que serve de parâmetro para o cálculo dos níveis de expressão de cada amostra, foi aplicada. Para tanto, uma metodologia derivada desse

procedimento foi estabelecida, que não considera o valor de eficiência (E) do gene igual a 100%, incluindo o valor real de E nos cálculos das quantidades relativas (Q) de cada amostra pela fórmula $Q = E^{\Delta CT}$. Dessa forma, os valores das quantidades relativas de cada genótipo tanto para os 19 genes-alvo quanto para os três genes endógenos (F-BOX, SAND e GAPC2) são estimados a partir dos valores de Ct e eficiência do gene, de modo à amostra com menor Ct (maior expressão) ficar com o valor de $Q = 1$, o valor de $E = 2$ compreendendo 100% de eficiência e a variável ΔCT ser calculada pela diferença entre o menor Ct com o Ct da amostra em questão.

Os níveis de expressão de cada genótipo foram calculados por intermédio de um fator de normalização, dado pela média geométrica das quantidades relativas estimadas para os dois genes de referência (F-BOX e SAND) que apresentaram um menor valor M de expressão nos dois tratamentos avaliados pelo algoritmo do GeNorm. Para tanto, o cálculo dos níveis de expressão em cada amostra é feito pela razão entre o valor da quantidade relativa encontrada no gene-alvo e o fator de normalização daquele genótipo em análise.

Por fim, foram calculados também os valores de *Fold change* de cada indivíduo inoculado em relação ao não inoculado, pela razão dos níveis de expressão do grupo infectado sobre o grupo controle. Tais medidas permitem afirmar quais genes foram *up-regulated* (induzidos) ou *down-regulated* (reprimidos) em cada genótipo após a inoculação, determinando quantas vezes um gene-alvo é expresso individualmente nos genótipos inoculados em relação ao grupo controle (*Fold change* das amostras não inoculadas é sempre igual a 1). Dessa forma, os valores de *Fold change* maior que 1 indicam um aumento da expressão gênica (o gene foi induzido), enquanto genes reprimidos vão ter valores menores que 1 (diminuição da expressão gênica). Gráficos de coluna foram gerados para mostrar as alterações em ordem crescente dos valores de *Fold change* (eixo y) para cada gene-alvo em relação aos 55 genótipos analisados (eixo x). Além disso, gráficos de pizza também foram feitos para fazer comparações entre os dois grupos separados pelos dados fenotípicos, a fim de detectar a porcentagem de híbridos que tiveram genes-alvo induzidos e reprimidos dentro de cada grupo. Para as análises estatísticas, os dados de *Fold change* foram transformados em escala logarítmica (base 2), com o propósito de atender à normalidade dos dados pelo uso do *software* Minitab 14. Assim, genes reprimidos apresentam valores negativos de $\text{Log}_2\text{Fold change}$; e os induzidos, positivos. Um teste F (ANOVA: um critério) foi feito para

comparar os resultados de $\text{Log}_2\text{Fold change}$ de cada gene entre os dois subgrupos (S e MS) e o grupo T/R. Caso o resultado do $F\text{-value}$ seja significativo, foi aplicado a *posteriori* um teste t de *student* par-a-par, para comparar as diferenças entre as médias amostrais dos três grupos.

4.8.4. Análises de correlação e perfil de expressão gênica global

A interação entre as respostas fenotípicas (comprimento da lesão) e genotípicas (expressão gênica) dentro de cada grupo foi avaliada com base em correlações dos dados de CL_R transformados em Log (base 10) (eixo y) e os valores de $\text{Log}_2\text{Fold change}$ (eixo x), demonstrando o envolvimento entre as duas variáveis pela aplicação do coeficiente de correlação de Pearson (r) disponível no programa estatístico BioEstat v. 5.0. Para Moore (2007), a direção e o grau de relacionamento entre duas variáveis quantitativas podem ser estabelecidos pelo método da correlação linear de Pearson.

Para a obtenção do perfil de expressão gênica global do experimento, pela análise comparativa dos 19 genes candidatos com os 51 híbridos, os dois genitores, o limão Cravo e citrumelo Swingle, os valores de $\text{Log}_2\text{Fold change}$ serviram de entrada para o programa MeV (*MultiExperiment Viewer*) v. 4.9 (www.tm4.org). Assim, foi possível agrupar tanto os genes quanto as amostras pelo teste de agrupamento hierárquico (HCL – *Hierarchical clustering*), utilizando a correlação de Pearson como distância métrica, o que resultou na ordenação dos genes com expressões mais próximas e a separação dos genótipos em blocos (*clusters*), sendo esses parâmetros visualizados em uma representação gráfica chamada de *heatmap*. No *heatmap*, os valores individuais de $\text{Log}_2\text{Fold change}$ inseridos na matriz existente entre os genes com as amostras são apresentados em cores, permitindo a análise comparativa global da expressão dos genes-alvo com os genótipos do experimento e o estabelecimento de uma árvore hierárquica, em que genes e amostras podem ser ligados entre si por uma série de ramificações.

Além disso, com o intuito de entender melhor a relação entre os genes candidatos, uma matriz de dissimilaridade foi obtida a partir da Distância Euclidiana, de maneira a essa análise comparativa também ser demonstrada em forma de *heatmap*. Enquanto a matriz de similaridade utiliza o coeficiente de correlação de Pearson (r) para avaliar o grau de semelhança entre pares de objetos (genes), a matriz de dissimilaridade usa a Distância Euclidiana como parâmetro da distância (grau de diferença) entre dois objetos a serem relacionados (Cruz *et al.*, 2004).

Dessa forma, não há um intervalo de variação entre 0 e 1, a ponto de quanto maior for o valor da distância par-a-par, maior será a diferença entre os dois genes comparados, fenômeno que pode ser apresentado a nível global no *heatmap*. O *heatmap*, então, encaixa de modo proporcional os valores das distâncias num intervalo de 0 a 1, atribuindo o valor de 1 para a combinação de genes que possuem comparativamente a maior Distância Euclidiana.

4.9. Mapeamento de eQTLs

Com o uso de mapas de ligação previamente construídos de *Poncirus trifoliata* e *Citrus sunki*, utilizando marcadores DArT-seqTM e o *software* OneMap (Margarido *et al.*, 2007), e após a validação de genes diferencialmente expressos e a quantificação do nível de transcritos de cada gene para cada indivíduo da população por RT-PCR Quantitativo em Tempo Real, foram realizadas análises por meio do pacote FullsibQTL da linguagem de programação R (Gazaffi *et al.*, 2014) para se fazer o mapeamento de eQTLs. Nesse procedimento, os valores de $\text{Log}_2\text{Fold change}$ calculados pela quantificação relativa por meio da técnica de RT-qPCR na população segregante dos 51 híbridos selecionados, foram usados para mapear os QTLs de expressão nos dois mapas de ligação existentes, como se fossem características fenotípicas, detectando então polimorfismos associados à expressão gênica. Utilizou-se a estratégia do mapeamento de intervalo composto (CIM) (Zeng, 1994) igual ao procedimento realizado para o mapeamento de QTLs. Um máximo de 20 cofatores foi estipulado com vistas a localizar eQTLs fora do intervalo de mapeamento. O teste estatístico LOD score (LD), usado para detectar a presença ou ausência de cada eQTL, foi feito pelo teste de permutação randômica ($\alpha = 0,05$; $n = 1000$ repetições) (Churchill & Dodge, 1994), disponível no FullsibQTL. O LOD crítico igual a 3.0 foi designado como padrão para identificar eQTLs. A porcentagem da variação fenotípica explicada pela detecção de eQTLs foi estimada usando regressão linear (R^2).

5. Resultados e discussão

5.1. Avaliação das lesões causadas por *Phytophthora parasitica*

As médias das lesões pela inoculação dos 110 híbridos, dos genitores *P. trifoliata* e *C. sunki*, do limão Cravo e do citrumelo Swingle são mostradas na Figura 10.

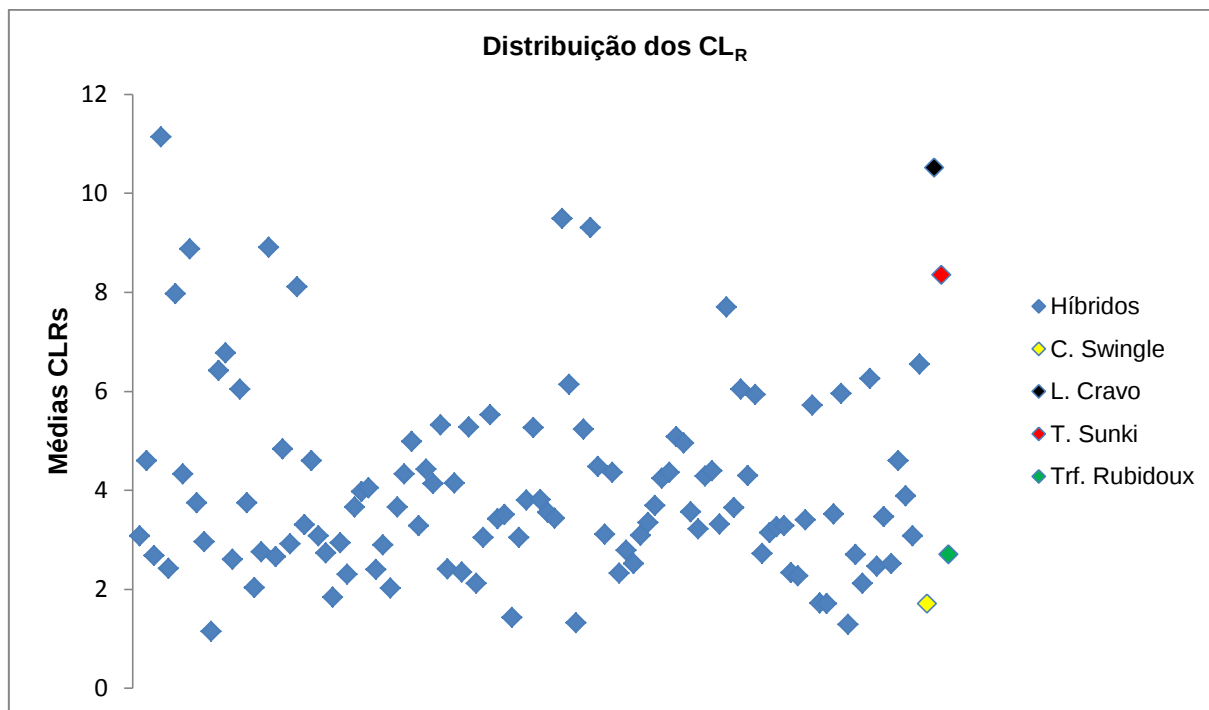


Figura 10. Distribuição das médias dos comprimentos reais da lesão (CL_R) de *P. parasitica* nos híbridos (azul), no citrumelo Swingle (amarelo), no limão Cravo (preto), na tangerina Sunki (vermelho) e no trifoliata Rubidoux (verde).

Observa-se que as médias dos CL_R dos híbridos variaram entre 1,15 a 11,13 mm, o que corrobora com Boava (2004a), que em seu estudo encontrou resultados variando de 0,8 a 12,2 mm. Além disso, constata-se que os dois genitores possuem resultados bem contrastantes para a lesão desenvolvida por *P. parasitica*, com *P. trifoliata* atingindo 2,71 mm e tangerina Sunki, 8,36 mm, que segundo a literatura é suscetível à *Phytophthora*, enquanto o trifoliata se comporta como porta-enxerto resistente (Boava, 2004b; Siviero *et al.*, 2002a). A lesão no limão Cravo atingiu 10,52 mm, superando a tangerina Sunki, de maneira a ser classificado como suscetível; e no citrumelo Swingle, 1,72 mm do CL_R , alcançando um comprimento longitudinal menor que o *P. trifoliata*. Tal porta-enxerto é citado como sendo tolerante para as infecções de tronco e raízes (Medina Filho, 2003).

Na Figura 11, pode-se observar a diferença no comprimento das lesões entre os dois genitores, o limão Cravo e entre os quatro híbridos amostrados.



Figura 11. Lesões causadas pela inoculação de *Phytophthora parasitica* em *Citrus sunki* (1), *Poncirus trifoliata* (2), limão Cravo (3) e quatro híbridos de *Poncirus trifoliata* x *Citrus sunki* (4 a 7). (A) Lesões causadas por inoculações a 15 cm da enxertia, (B) Lesões causadas por inoculações a 10 cm da região de enxertia. **Foto:** Rômulo Pedro

5.2. Testes de normalidade dos dados fenotípicos

Nas Figuras 12 e 13, observam-se os resultados obtidos pelos testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov (KS) e Anderson-Darling (AD), respectivamente, com os dados transformados em logaritmo (base 10). Sendo assim, as CL_R resultantes da população composta de *P. trifoliata*, *C. sunki*, dos 110 híbridos, do limão Cravo e do citrumelo Swingle atendem à expectativa de distribuição normal dos dados, sendo o valor estatístico *p-value* obtido pelo teste de KS $> 0,150$ e pelo teste de AD $= 0,236$, o que torna altamente significativos os valores médios dos CL_R e possibilita o desenvolvimento das análises estatísticas seguintes.

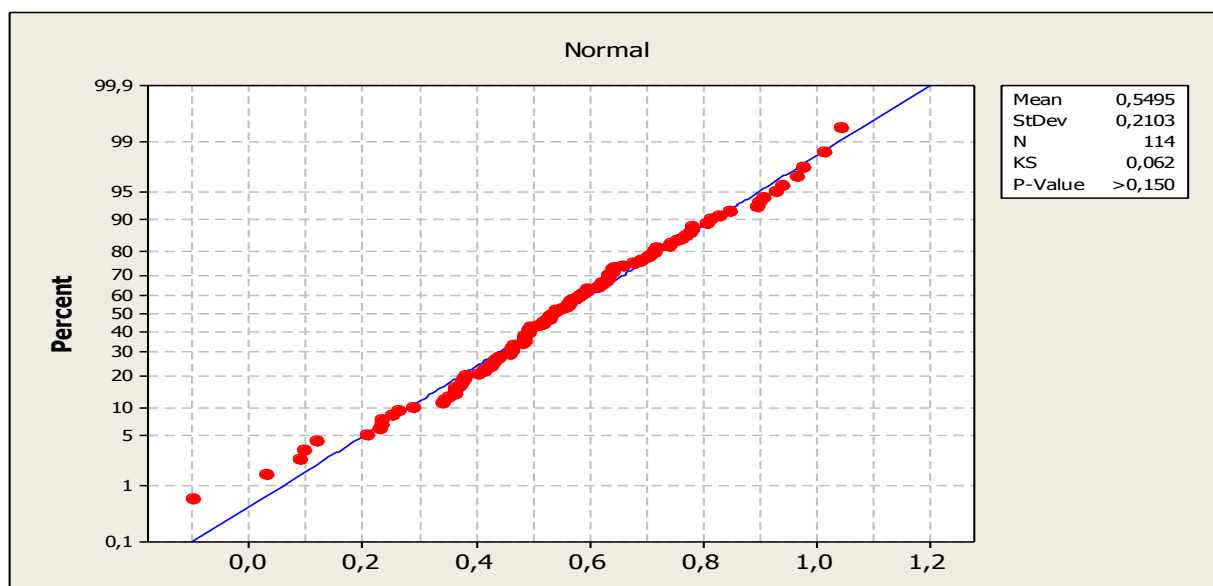


Figura 12. QQ-plot obtido pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, mostrando a distribuição normal dos dados fenotípicos, com a maioria dos pontos se sobrepondo à reta.

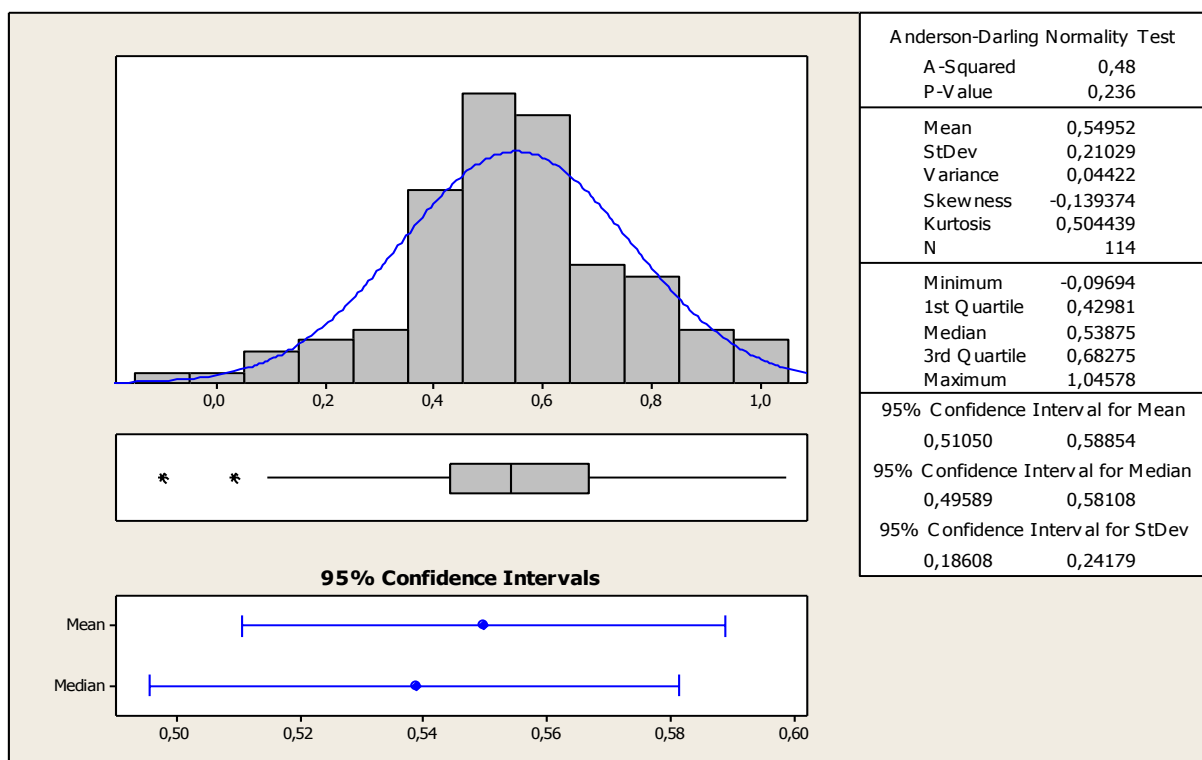


Figura 13. Histograma obtido pelo teste de Anderson-Darling, mostrando a curva normal esperada dos dados fenotípicos.

5.3. Análises estatísticas dos dados fenotípicos

A Tabela 2 apresenta os resultados do teste F para análise de variância com as médias obtidas dos CL_R dos híbridos, genitores, limão Cravo e citrumelo Swingle, mostrando que houve diferença significativa, tanto a 5% quanto a 1%, entre as lesões desenvolvidas pela inoculação de *P. parasitica*. Assim, com a utilização da estatística tabelada F a 5% e a 1%, tem-se que $F_{5\%} = 1,36$ e $F_{1\%} = 1,55$. Com isso, $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, demonstrando que há pelo menos uma média diferente das demais.

Tabela 2. Análise estatística pelo teste F dos dados fenotípicos dos comprimentos reais da lesão (CL_R) provenientes da inoculação com *P. parasitica* em híbridos de *Poncirus trifoliata* x *Citrus sunki*, nos dois genitores, no limão Cravo e no citrumelo Swingle.

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	113	906,92	8,03	4,94	1,36	1,55
Resíduos	114	185,05	1,62			
Total	227	1091,97				

Após a realização do teste F foi feita uma comparação das médias CL_R de todos os tratamentos por meio do teste Scott-Knott a 5% de significância, que pode ser observado na Tabela 3. Constataram-se diferenças significativas entre as médias CL_R dos 114 genótipos, com o genitor tangerina Sunki apresentando uma maior lesão desenvolvida pela gomose dos citros, e o outro genitor trifoliata

Rubidoux, uma menor lesão, o que confirma a suscetibilidade da *C. sunki* e a resistência do *P. trifoliata* pela literatura (Boava, 2004a; Medina Filho, 2003; Siviero *et al.*, 2002a).

Tabela 3. Comprimentos reais da lesão (CL_R) da gomose dos citros em 110 híbridos de *Poncirus trifoliata* x *Citrus sunki*, nos dois genitores, no limão Cravo e no citrumelo Swingle.

Genótipo	CL _R ¹ (mm)	Genótipo	CL _R ¹ (mm)	Genótipo	CL _R ¹ (mm)
8	11,13a	12	4,33c	181	3,045c
L. Cravo	10,52a	249	4,295c	97	3,045c
204	9,49a	237	4,285c	21	2,955c
209	9,3a	228	4,235c	57	2,93c
40	8,905a	89	4,145c	46	2,915c
13	8,875a	85	4,135c	74	2,895c
T. Sunki	8,355a	71	4,04c	221	2,785c
47	8,11a	69	3,97c	39	2,75c
11	7,97a	303	3,88c	52	2,735c
244	7,695a	199	3,81c	252	2,72c
30	6,775b	182	3,8c	Trf. Rubidoux	2,71c
312	6,54b	36	3,74c	282	2,695c
27	6,41b	16	3,74c	7	2,675c
284	6,255b	227	3,69c	43	2,66c
205	6,13b	76	3,66c	32	2,6c
248	6,04b	59	3,66c	222	2,52c
33	6,035b	246	3,65c	301	2,515c
274	5,95b	233	3,565c	285	2,46c
250	5,93b	201	3,545c	9	2,415c
262	5,715b	271	3,515c	87	2,41c
99	5,525b	158	3,505c	72	2,4c
86	5,315c	291	3,465c	91	2,34c
94	5,275c	203	3,435c	259	2,33c
192	5,265c	130	3,425c	218	2,32c
208	5,225c	261	3,4c	58	2,3c
231	5,08c	226	3,34c	260	2,265c
82	4,98c	239	3,31c	283	2,115c
232	4,955c	48	3,305c	96	2,115c
44	4,835c	257	3,285c	38	2,035c
302	4,595c	83	3,275c	75	2,025c
50	4,59c	254	3,26c	55	1,84c
5	4,59c	236	3,21c	263	1,72c
211	4,475c	253	3,145c	C. Swingle	1,715c
84	4,425c	212	3,11c	270	1,705c
238	4,39c	225	3,09c	169	1,43c
229	4,36c	306	3,08c	206	1,32c
213	4,355c	51	3,07c	279	1,285c
81	4,33c	3	3,07c	22	1,15c
CV (%)		31,3			

¹Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

Pode-se afirmar que os genótipos 8, limão Cravo, 204, 209, 40, 13, tangerina Sunki, 47, 11 e 244, são suscetíveis a *P. parasitica*, pois apresentaram um maior valor de CL_R como resultado da inoculação. Já os híbridos 30, 312, 27, 284, 205, 248, 33, 274, 250, 262 e 99, apresentaram suscetibilidade moderada à doença, com valores de CL_R intermediários aos demais. Por outro lado, os outros 93 genótipos comportaram-se como tolerantes e/ou resistentes à *Phytophthora*, incluindo o genitor *P. trifoliata* e o citrumelo Swingle, apresentando menores valores de CL_R, o que os classifica como materiais promissores para estudos de fenotipagem e expressão gênica que busquem avaliar a resistência à *Phytophthora*. Esses resultados indicam que os híbridos provenientes do cruzamento entre trifoliata Rubidoux e tangerina Sunki apresentam grande variabilidade genética, sendo poucos (17%) suscetíveis e/ou moderadamente suscetíveis à *Phytophthora*.

O fato de ser encontrada uma maior quantidade (83%) de híbridos entre *P. trifoliata* e *C. sunki* considerados tolerantes e/ou resistentes à doença confirma os dados obtidos por Carvalho (2000), que apontou como materiais mais promissores para a citricultura a fim de se ter resistência à *Phytophthora*, os híbridos de *P. trifoliata* x *C. sunki* e outros citrandarins, reforçando a ideia da escolha de genitores contrastantes e complementares para o melhoramento genético de plantas com vistas ao caráter resistência a *P. parasitica*.

Boava (2004a) acompanhou a lesão desenvolvida pela inoculação de *P. parasitica* em 91 híbridos de *P. trifoliata* x *C. sunki* mais os dois genitores em duas épocas de avaliação, e constatou que houve apenas diferença significativa entre os híbridos, não havendo uma variação pela estatística em relação à época e sua interação com os genótipos avaliados.

O coeficiente de variação encontrado no presente estudo foi considerado alto (31,3%), o que pode ser explicado pela própria metodologia de inoculação, a qual pode apresentar certa variação na densidade do patógeno a ser inoculado, ou então por um mecanismo de natureza genética, relacionado à ação dos poligenes envolvidos na herança quantitativa do patossistema *Phytophthora*-Citros (Boava et al., 2003).

Na Tabela 4, são apresentados os resultados referentes às estimativas de parâmetros genéticos (componentes da variância, herdabilidade e componentes do coeficiente de variação) para o caráter CL_R (mm) em híbridos de *P. trifoliata* x *C. sunki* por meio do aplicativo SELEGEN-REML/BLUP.

Tabela 4. Estimativas de parâmetros genéticos para o caráter comprimento real da lesão (CL_R) da gomose dos citros em híbridos de *P. trifoliata* x *C. sunki*.

Estimativas ¹	CL _R (mm)
V _g	2,8
V _e	1,48
V _f	4,28
H ²	0,65 ± 0,15
CV _g %	41,76
CV _e %	30,35
Média geral	4,0065

¹variância genotípica (V_g); variância residual (V_e); variância fenotípica individual (V_f); herdabilidade individual no sentido amplo dos efeitos genotípicos totais (H²); coeficiente de variação genotípica (CV_g%); coeficiente de variação residual (CV_e%) e média geral do caráter.

A estimativa do coeficiente de herdabilidade no sentido amplo (H² = 0,65) é considerada alta para esse caráter, o que demonstra bom controle genético para a característica CL_R e a grande possibilidade de sucesso na seleção ampla de híbridos resistentes dentro do experimento. Esse valor indica que 65% da variação fenotípica é devido à ação dos genes, discordando, portanto de Siviero (2002), que encontrou um valor baixo para a herdabilidade (18,7%) em parte do seu estudo para avaliação da lesão causada pela inoculação de *P. parasitica*.

Resende (2002) discorre que valores de desvio padrão de até 20% do valor da herdabilidade seriam o recomendado para as estimativas de parâmetros genéticos. O desvio padrão da herdabilidade neste presente estudo correspondeu a 23% do valor da herdabilidade (0,15), sendo, portanto, muito próximo do limite desejável pelo mesmo autor.

Em relação à variância genética (V_g) da população de híbridos, foi encontrado o valor de 2,8. Segundo Resende (2002), estimativas de variância genética positiva e diferente de zero indicam que há variabilidade entre a progênie, o que torna possível a seleção de genótipos superiores.

No que diz respeito aos componentes do coeficiente de variação, os valores obtidos foram de 41,76% e 30,35, para o coeficiente de variação genotípica (CV_g%) e o coeficiente de variação residual (CV_e%), respectivamente. De acordo Pereira (2012), valores altos de CV_g%, como o encontrado para este trabalho, indicam que as melhores progênies quando forem selecionadas, permitirão uma maior expressão no valor genético da população.

Resende (2002) afirma que quando o coeficiente de variação relativa ($CV_g\%/CV_e\%$) for próximo ou superior a 1, há grandes chances de se fazer seleção na progênie. O valor encontrado para essa razão no presente estudo foi de 1,376, sendo então favorável à seleção.

Os efeitos genéticos preditos (g), valores genotípicos ($\mu + g$), ganhos genéticos (Gg) e novas médias (Nm) para os CL_R dos genótipos oriundos da progênie *P. trifoliata* x *C. sunki* são mostrados na Tabela 5. Os valores genotípicos são obtidos pela soma dos efeitos genéticos preditos (g) com a média geral do experimento (μ). O ganho genético (Gg) pode ser calculado, então, pelas estimativas de parâmetros e valores genéticos, sendo uma grande ferramenta para ver o resultado da metodologia de seleção aplicada em programas de melhoramento genético. Por intermédio do Gg, surge a variável Nova Média (Nm), que corresponde a $\mu + Gg$ (Garcia & Nogueira, 2005; Moraes *et al.*, 2008).

Os híbridos apresentaram valor genotípico médio de 4,0065 (Tabela 4) para o caráter CL_R. Observa-se a confirmação de que os híbridos 8, 204, 209, 40, 13, 47, 11 e 244 apresentaram alta suscetibilidade a *P. parasitica*, com uma média de $\mu + g$ para CL_R de 7,90, sendo bem superior à média geral do experimento. Sendo assim, o ganho genético desses oito genótipos com a próxima geração corresponderia a 4,54, caso fossem selecionados.

Entretanto, num programa de melhoramento genético com vistas a selecionar genótipos superiores para uma dada doença que acomete uma cultura perene, o que se busca são aqueles híbridos que indicaram uma maior resistência a dado patógeno estudado (Borém, 1997). Portanto, as progênies que apresentaram maior resistência e, conseqüentemente, menores valores genotípicos, bem como efeitos genotípicos preditos negativos, foram os genótipos 22, 279, 206 e 169, com ganho genético médio de 0,031 para a próxima geração. Esses quatro híbridos fazem parte dos 87 genótipos que possuem valores de g negativo e que são tolerantes e/ou resistentes à *Phytophthora* (Tabelas 3 e 5). Portanto, apresentam alta resistência a *P. parasitica* e podem se tornar importantes para futuras pesquisas relacionadas à gomose.

Tabela 5. Genótipos (Gen.), efeitos genotípicos preditos (g), valores genotípicos ($\mu + g$), ganho genético (Gg) em mm e nova média (Nm) em mm para o caráter comprimento real da lesão (CL_R) da gomose dos citros em híbridos de *P. trifoliata* x *C. sunki*.

Gen.	g	$\mu + g$	Gg	Nm	Gen.	g	$\mu + g$	Gg	Nm
22	-2,26	1,75	0,00	4,01	201	-0,37	3,64	1,06	5,07
279	-2,15	1,85	0,02	4,03	233	-0,35	3,66	1,09	5,09
206	-2,13	1,88	0,04	4,05	246	-0,28	3,72	1,11	5,12
169	-2,04	1,97	0,06	4,07	76	-0,27	3,73	1,17	5,17
270	-1,82	2,19	0,08	4,09	59	-0,27	3,73	1,14	5,15
263	-1,81	2,20	0,10	4,11	227	-0,25	3,76	1,20	5,20
55	-1,71	2,29	0,12	4,12	36	-0,21	3,80	1,26	5,26
75	-1,57	2,44	0,14	4,14	16	-0,21	3,80	1,23	5,23
38	-1,56	2,45	0,15	4,16	182	-0,16	3,84	1,29	5,29
96	-1,50	2,51	0,19	4,19	199	-0,16	3,85	1,32	5,32
283	-1,50	2,51	0,17	4,18	303	-0,10	3,91	1,35	5,36
260	-1,38	2,63	0,20	4,21	69	-0,03	3,98	1,38	5,39
58	-1,35	2,66	0,22	4,23	71	0,03	4,03	1,42	5,42
218	-1,33	2,67	0,23	4,24	85	0,10	4,11	1,45	5,46
259	-1,33	2,68	0,25	4,26	89	0,11	4,12	1,48	5,49
91	-1,32	2,69	0,27	4,27	228	0,18	4,19	1,52	5,52
72	-1,27	2,74	0,28	4,29	237	0,22	4,23	1,55	5,56
87	-1,26	2,74	0,30	4,31	249	0,23	4,23	1,59	5,59
9	-1,26	2,75	0,32	4,32	12	0,26	4,26	1,66	5,67
285	-1,22	2,78	0,34	4,34	81	0,26	4,26	1,62	5,63
301	-1,18	2,83	0,35	4,36	213	0,28	4,28	1,70	5,71
222	-1,18	2,83	0,37	4,38	229	0,28	4,29	1,74	5,75
32	-1,11	2,89	0,39	4,39	238	0,30	4,31	1,79	5,79
43	-1,07	2,94	0,40	4,41	84	0,33	4,34	1,83	5,84
7	-1,05	2,95	0,42	4,43	211	0,37	4,38	1,88	5,89
282	-1,04	2,97	0,44	4,45	5	0,46	4,47	1,98	5,99
252	-1,02	2,99	0,46	4,46	50	0,46	4,47	1,93	5,94
52	-1,01	3,00	0,47	4,48	302	0,47	4,47	2,04	6,04
39	-0,99	3,01	0,49	4,50	44	0,66	4,66	2,10	6,10
221	-0,97	3,04	0,51	4,52	232	0,75	4,76	2,15	6,16
74	-0,88	3,13	0,53	4,54	82	0,77	4,78	2,21	6,21
46	-0,86	3,14	0,55	4,55	231	0,85	4,86	2,27	6,27
57	-0,85	3,15	0,57	4,57	208	0,96	4,97	2,33	6,34
21	-0,83	3,17	0,58	4,59	192	1,00	5,00	2,39	6,40
97	-0,76	3,25	0,62	4,63	94	1,00	5,01	2,46	6,46
181	-0,76	3,25	0,60	4,61	86	1,04	5,04	2,53	6,54
3	-0,74	3,27	0,66	4,66	99	1,20	5,21	2,61	6,62
51	-0,74	3,27	0,64	4,65	262	1,35	5,36	2,69	6,69
306	-0,73	3,27	0,68	4,68	250	1,52	5,53	2,77	6,77
225	-0,73	3,28	0,70	4,70	274	1,54	5,54	2,84	6,85
212	-0,71	3,30	0,72	4,72	33	1,60	5,61	2,93	6,94
253	-0,68	3,33	0,74	4,75	248	1,61	5,62	3,03	7,03
236	-0,63	3,38	0,76	4,77	205	1,68	5,69	3,13	7,14

Tabela 5. “Continuação”

Gen.	g	$\mu + g$	Gg	Nm	Gen.	g	$\mu + g$	Gg	Nm
254	-0,59	3,42	0,78	4,79	284	1,78	5,79	3,26	7,26
83	-0,58	3,43	0,80	4,81	27	1,90	5,91	3,39	7,40
257	-0,57	3,44	0,82	4,83	312	2,00	6,01	3,54	7,54
48	-0,55	3,45	0,84	4,85	30	2,19	6,20	3,71	7,72
239	-0,55	3,46	0,87	4,87	244	2,92	6,92	3,90	7,90
226	-0,53	3,48	0,89	4,90	11	3,14	7,14	4,04	8,05
261	-0,48	3,53	0,91	4,92	47	3,25	7,25	4,19	8,20
130	-0,46	3,55	0,94	4,94	13	3,85	7,86	4,38	8,38
203	-0,45	3,55	0,96	4,97	40	3,88	7,88	4,51	8,52
291	-0,43	3,58	0,98	4,99	209	4,19	8,19	4,72	8,73
158	-0,40	3,61	1,01	5,01	204	4,34	8,34	4,99	8,99
271	-0,39	3,62	1,03	5,04	8	5,64	9,64	5,64	9,64

5.4. Construção dos mapas genéticos

Foram construídos mapas genéticos para os respectivos genitores com marcadores DArT-seqTM genotipados em 272 híbridos F₁ de *P. trifoliata* x *C. sunki*, por meio da estratégia *pseudo-testcross*. Tal abordagem utiliza somente a segregação de marcadores 1:1 para a construção de dois mapas de ligação de cada genitor com o propósito de desenvolver o mapeamento de QTLs. Logo, cada marcador irá segregar diferentemente nos dois mapas, sendo uma estratégia muito usada em populações segregantes (Carneiro *et al.*, 2002; Grattapaglia & Sederoff, 1994; Lanteri *et al.*, 2008).

Com base no teste de aderência do Qui-Quadrado (X^2), sob a hipótese nula (H_0) de que não há distorção das segregações mendelianas, e posteriormente selecionado os marcadores DArT-seq com segregação 1:1, dos 7851 marcadores disponibilizados para a construção dos dois mapas, apenas 5862 marcas genéticas 1:1 ficaram disponíveis para a utilização da estratégia *pseudo-testcross*.

Sendo assim, o mapa de ligação de *Poncirus trifoliata* apresentou 3.084 marcadores distribuídos em 10 grupos de ligação, totalizando 2.411,55 cM (Tabela 6A; Figura 14B), com densidade média de mapa correspondente a uma marca a cada 0,78 cM. O tamanho dos grupos de ligação variou de 42,03 (GL 9) a 472,60 cM (GL 2), e o número de locos ligados, de 44 (GL 9) a 629 (GL 2). Já o mapa de ligação de tangerina Sunki apresentou 2.778 marcadores distribuídos em nove grupos de ligação (GL), totalizando 2.446,6 cM (Tabela 6B; Figura 14A), com densidade média de mapa apresentando valor de uma marca a cada 1,14 cM. O

tamanho dos grupos de ligação variou de 30,98 cM (GL 9) a 607,46 (GL 3), e o número de locos ligados, de 59 (GL 9) a 525 (GL 5).

Tabela 6. Distribuição do número de marcadores mapeados de acordo cada grupo de ligação (GL).

A			B		
Mapa de ligação de <i>P. trifoliata</i>			Mapa de ligação de <i>C. sunki</i>		
	Número de marcadores	Tamanho do grupo de ligação (cM)		Número de marcadores	Tamanho do grupo de ligação (cM)
GL 1	434	292,54	GL 1	311	291,84
GL 2	629	472,60	GL 2	396	372,06
GL 3	435	337,52	GL 3a	231	432,73
GL 4	383	301,90	GL 3b	94	174,83
GL 5	256	219,24	GL 4	349	272,63
GL 6	91	56,40	GL 5	525	355,43
GL 7	316	271,53	GL 6	228	249,58
GL 8	341	283,92	GL 7	298	255,34
GL 9	44	42,03	GL 8	287	311,18
GL 10	155	133,87	GL 9	59	30,98
TOTAL	3084	2411,55	TOTAL	2778	2446,6

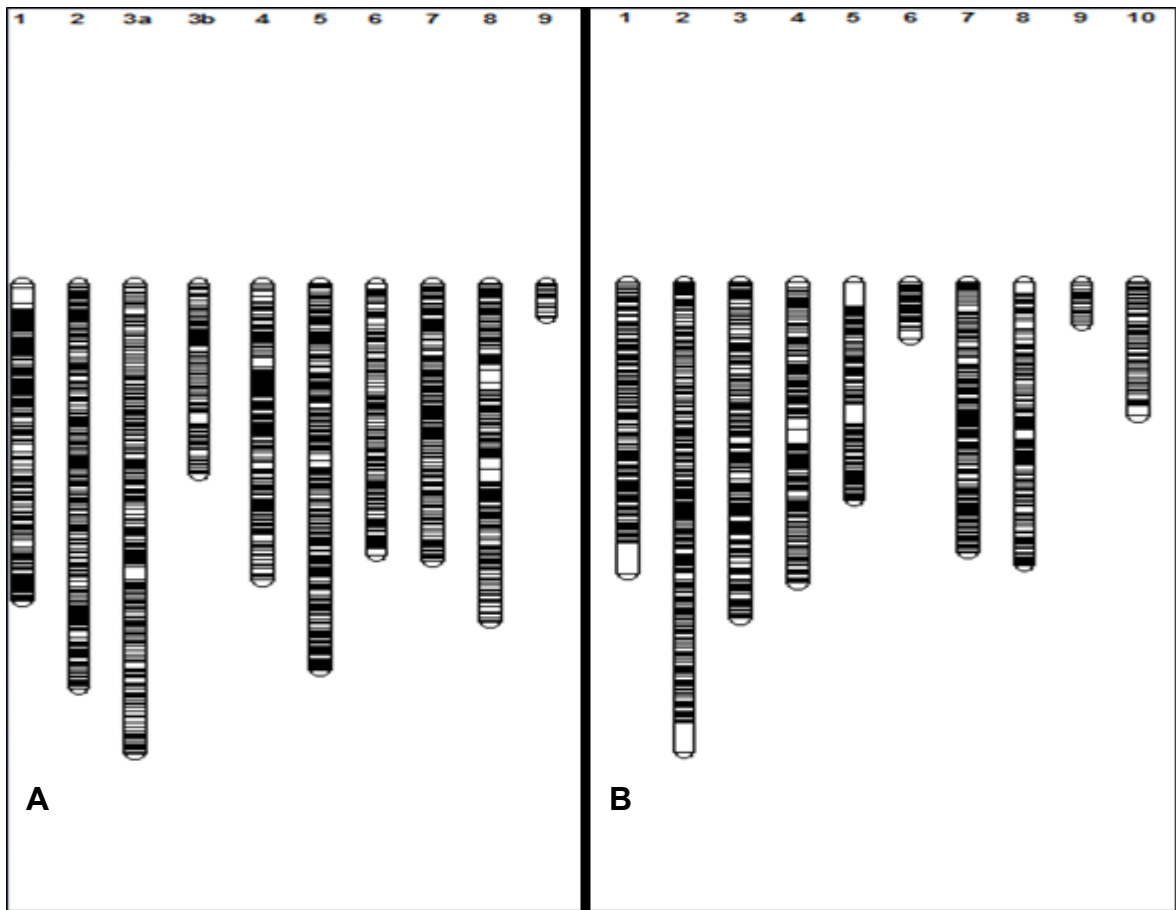


Figura 14. Mapas de ligação construídos com a ajuda do software OneMap, baseado em 2778 marcadores DArT-seq™ para *Citrus sunki* e 3084 marcadores DArT-seq™ para *Poncirus trifoliata*.

Quanto à distância entre os marcadores nos grupos de ligação, houve variação desde zero, em que dois marcadores estavam completamente ligados, nos dois mapas, até 31 cM para o mapa do trifoliata Rubidoux e 14 cM para o da tangerina Sunki. Marcadores bastante próximos ou até mesmo com uma ligação completa já foram descritos em várias espécies com o uso de diferentes marcadores moleculares, produzindo mapas que apresentam baixa distância entre os marcadores mapeados, com chances de ocorrer a detecção de QTLs nessas regiões altamente saturadas (Sánchez-Sevilla *et al.*, 2015; Zarpelon *et al.*, 2015).

Cristofani-Yaly *et al.* (1999), ao aplicar a estratégia *pseudo-testcross* no desenvolvimento de dois mapas de ligação para os mesmos híbridos do presente estudo, provenientes do cruzamento de *P. trifoliata* x *C. sunki*, com o uso de 169 marcadores RAPD, obtiveram um mapa para o genitor *P. trifoliata* apresentando comprimento total de 866,88 cM com apenas 62 marcadores distribuídos em 8 grupos de ligação, e outro para *C. sunki* apresentando 732,32 cM com 63 marcadores distribuídos em 10 grupos de ligação. Portanto, os dois mapas obtidos por este trabalho superam os já construídos para esses genitores, tanto no número de marcadores quanto na cobertura do genoma.

A construção de mapas genéticos, com o uso da tecnologia de marcadores, possui uma grande importância para o melhoramento de plantas, na medida em que permite analisar genótipos completos por meio da associação entre regiões genômicas com as características de interesse agrônomo. Os marcadores DArT (*Diversity Arrays Technology*), aliados à técnica do sequenciamento de última geração, apresentam boa aplicabilidade para a construção de mapas genéticos de alta saturação devido ao conhecimento prévio das sequências dos marcadores, o que os torna ideais para estudos de diversidade genética e mapeamento de QTLs (Wenzl *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2005). No presente estudo, foram encontrados valores baixos de densidade média entre marcadores para ambos os mapas, apresentando ampla cobertura do genoma e menor distância entre os marcadores mapeados, o que confirma a eficácia dos marcadores DArT-seqTM na construção de mapas genéticos em citros.

5.5. Análise e Mapeamento de QTLs

Pela obtenção dos dois mapas genéticos construídos para cada genitor da progênie de híbridos e de acordo com os valores fenotípicos coletados dos CL_R, foi

possível detectar QTLs associados à característica comprimento da lesão ocasionada por *Phytophthora* em citros. O resultado da análise feita por meio do FullsibQTL é demonstrado pela linha ondulante, cujos picos do LOD no eixo Y indicam a presença de QTL. A linha horizontal representa o valor do LOD score crítico, calculado pelo teste de permutação randômica ($\alpha = 0,05$; $n = 1000$ repetições) (Churchill & Dodge, 1994). Sendo assim, a região no eixo x acima do LOD crítico contém um QTL candidato.

Com base na metodologia do mapeamento de intervalo composto (CIM), foi detectado um total de quatro QTLs com o pico do LOD superior ou igual a 3,0, sendo três para o mapa completo de *Poncirus trifoliata* (genitor resistente) e um para o mapa completo de *Citrus sunki* (genitor suscetível) (Figuras 15 e 16).

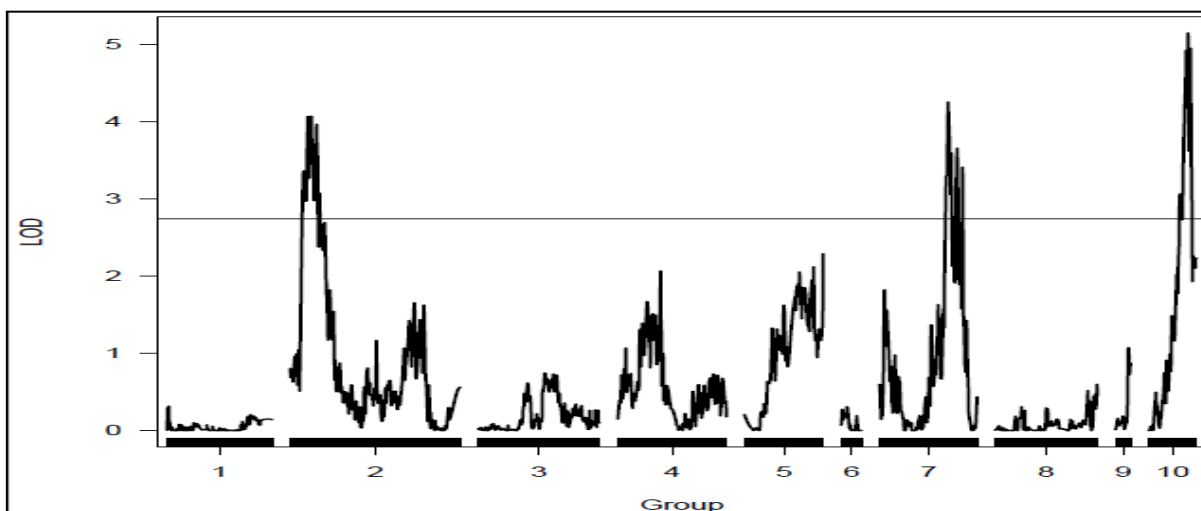


Figura 15. Detecção de QTLs relacionados com a resistência à *Phytophthora* no mapa de ligação completo de *Poncirus trifoliata*. Eixo Y: LOD; Eixo x: distâncias em centiMorgans a partir do telômero esquerdo (início); LOD score crítico = 2,74.

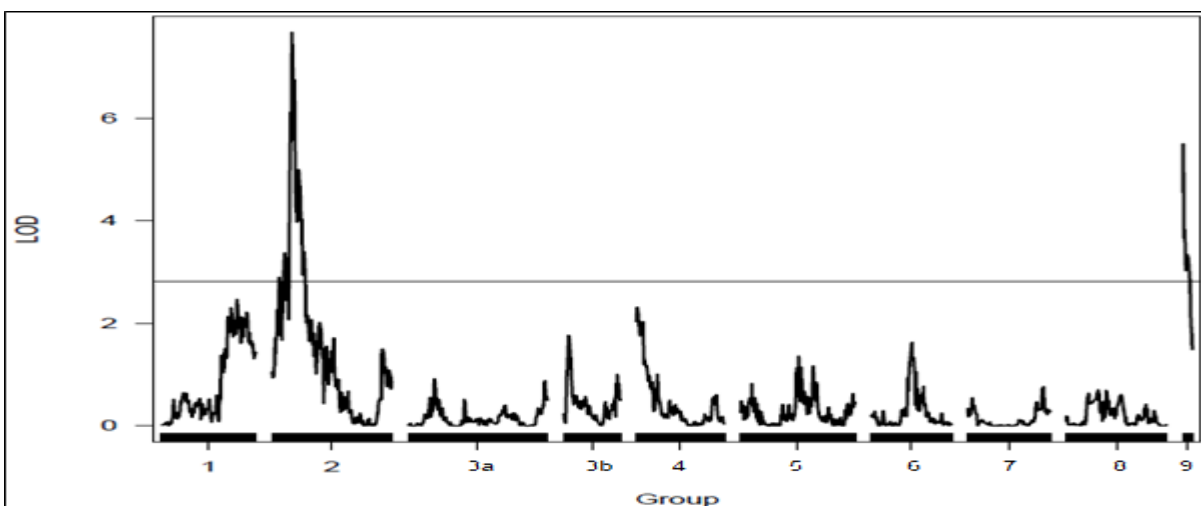


Figura 16. Detecção de um QTL relacionado com a resistência à *Phytophthora* no mapa de ligação completo de *Citrus sunki*. Eixo Y: LOD; Eixo x: distâncias em centiMorgans a partir do telômero esquerdo (início); LOD score crítico = 2,81.

Foi encontrado um QTL nos grupos de ligação (GL) 2, 7 e 10 do mapa de *Poncirus trifoliata*, totalizando três QTLs (Figuras 17, 18 e 19). Siviero *et al.* (2006), em seu estudo sobre mapeamento de QTLs em híbridos de *P. trifoliata* x *C. sunki* para avaliação de resistência à *Phytophthora*, utilizando mapas previamente construídos por Cristofani-Yaly *et al.* (1999), também encontraram 3 QTLs para o genitor trifoliata Rubidoux, presentes nos GL 1, 2 e 5. Esses resultados corroboram com o fato de que o gênero *Poncirus* possui porta-enxertos de citros que apresentam forte resistência a diversas doenças que afetam os citros, inclusive à gomose, sendo bastante utilizado em programas de melhoramento genético que visam estudar sua forte carga genética de resistência a vários patógenos (Siviero, 2001; Swingle, 1967).

Com relação à análise de QTLs no mapa de ligação do genitor *C. sunki*, houve a presença de apenas um QTL localizado no GL 2 (Figura 20). Siviero *et al.* (2006) também detectaram apenas um QTL para a tangerina Sunki, presente no GL 2. Já Boava (2004a) não detectou nenhum QTL associado à resistência à *Phytophthora* para esse genitor.

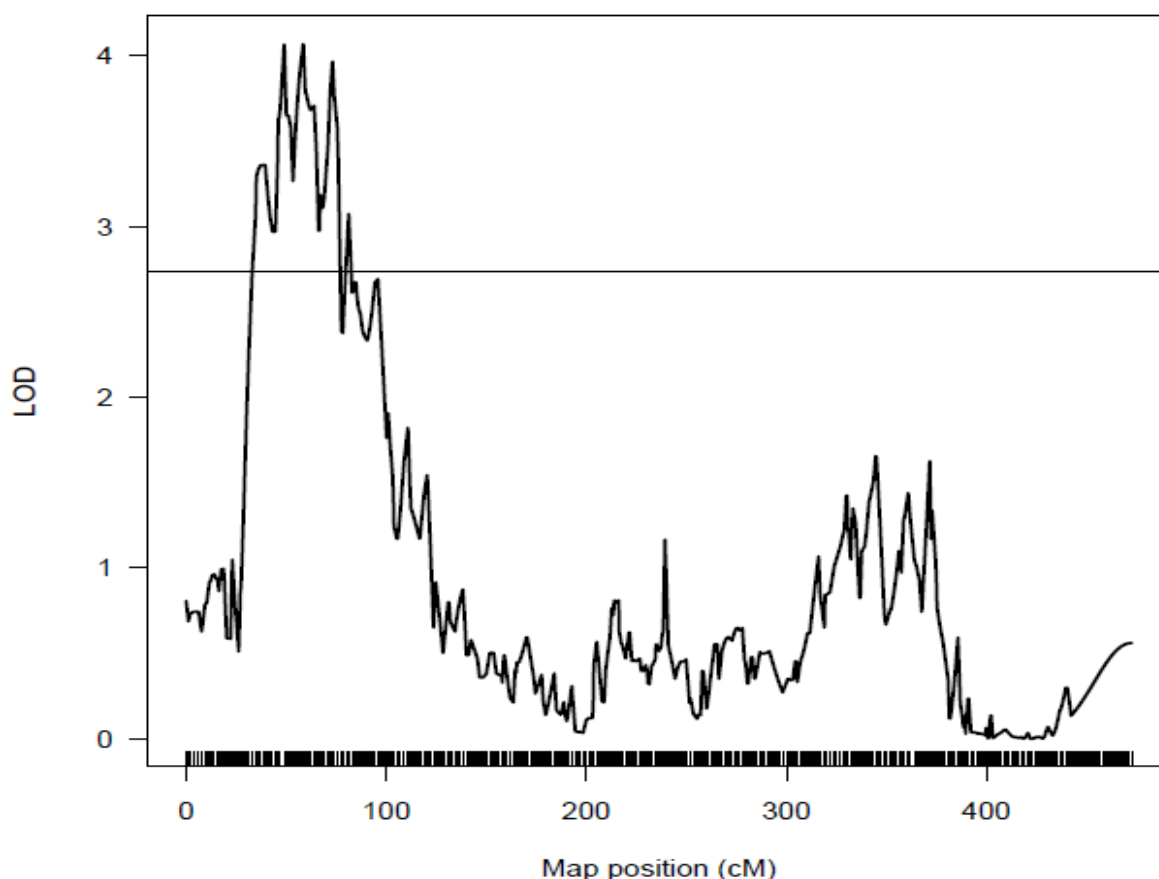


Figura 17. Detecção de um QTL relacionado com a resistência à *Phytophthora* no grupo de ligação 2 de *Poncirus trifoliata*. Eixo Y: LOD; Eixo x: distâncias em centimorgans a partir do telômero esquerdo (início); LOD score crítico = 2,74.

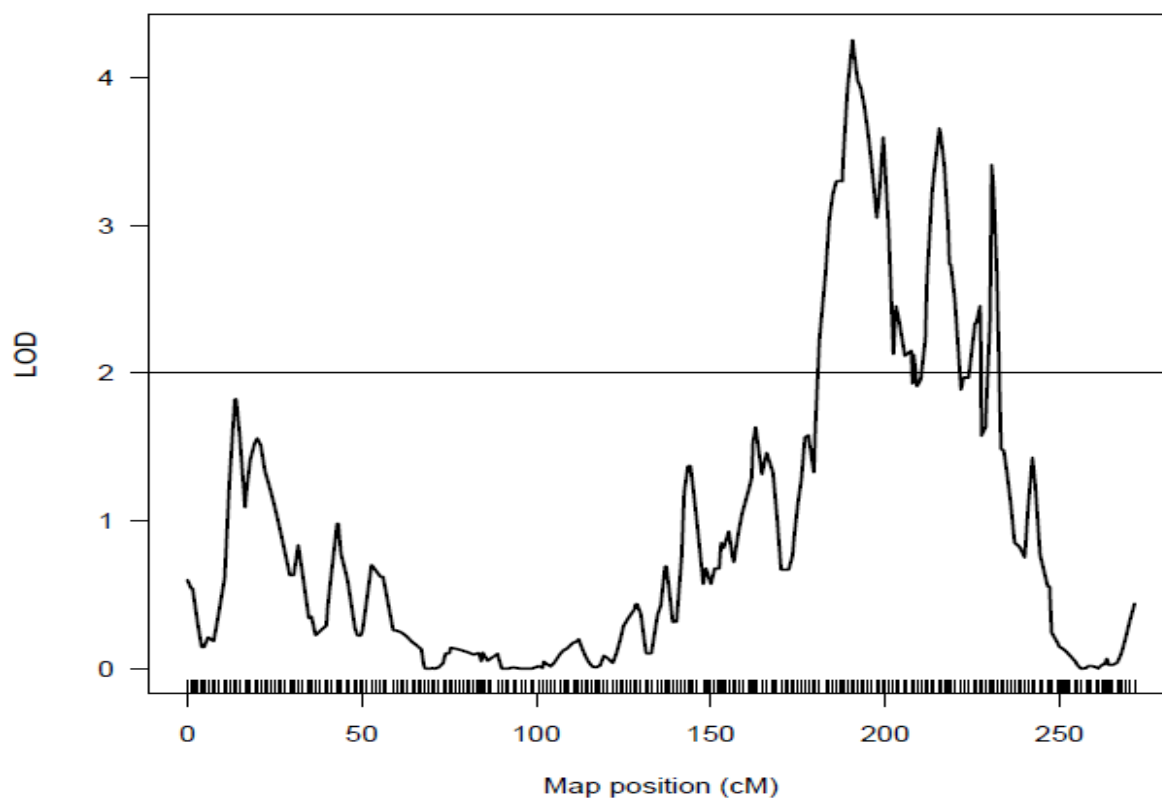


Figura 18. Detecção de um QTL relacionado com a resistência à *Phytophthora* no grupo de ligação 7 de *Poncirus trifoliata*. Eixo Y: LOD; Eixo x: distâncias em centiMorgans a partir do telômero esquerdo (início); LOD score crítico = 2,74.

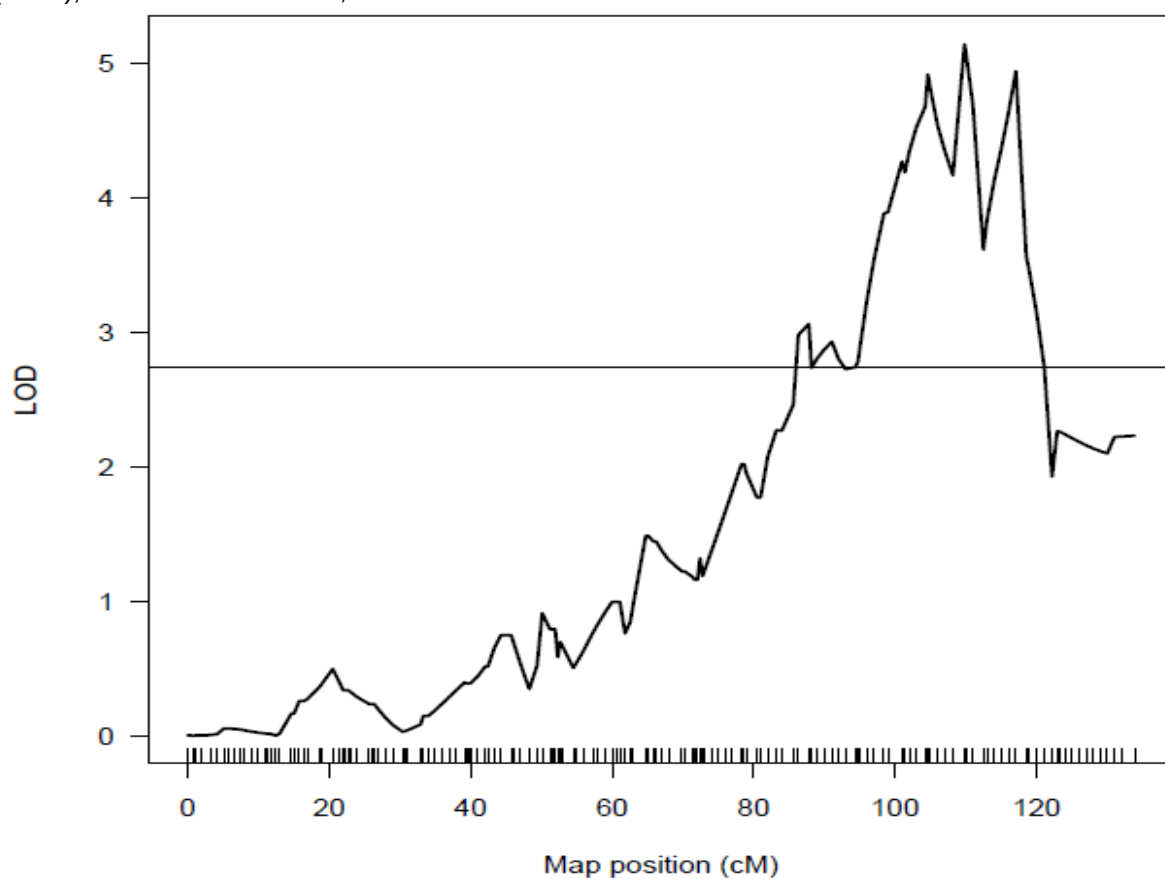


Figura 19. Detecção de um QTL relacionado com a resistência à *Phytophthora* no grupo de ligação 10 de *Poncirus trifoliata*. Eixo Y: LOD; Eixo x: distâncias em centiMorgans a partir do telômero esquerdo (início); LOD score crítico = 2,74.

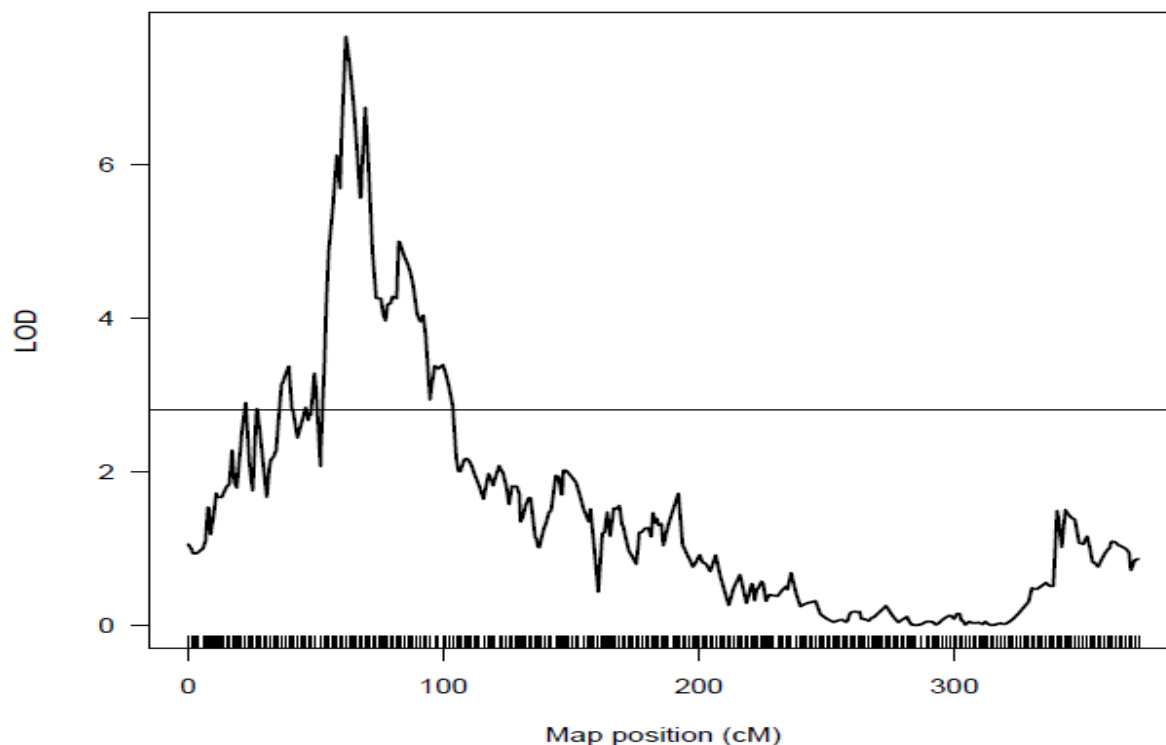


Figura 20. Detecção de um QTL relacionado com a resistência à *Phytophthora* no grupo de ligação 2 de *Citrus sunki*. Eixo Y: LOD; Eixo x: distâncias em centiMorgans a partir do telômero esquerdo (início); LOD score crítico = 2,81.

Na Tabela 7, observam-se os resultados do mapeamento de QTLs obtidos das análises estatísticas no pacote FullsibQTL da linguagem de programação R, as quais fornecem, para cada grupo de ligação dos dois mapas, os marcadores que flanqueiam a região alvo do QTL candidato, a distância em centiMorgans do QTL detectado a partir do telômero esquerdo (início do GL), o LOD score do QTL, a porcentagem da variação fenotípica explicada pelo QTL (R^2) e o valor do efeito aditivo (a) do QTL. Os “LOD scores” dos QTLs detectados variaram de 4,06 a 7,67. Já os valores de R^2 apresentaram efeitos baixos a moderados, variando de 1,77% a 16,8%. De acordo Anderson *et al.* (2007), muitos estudos com mapeamento revelam QTLs em poucos locos com valores de R^2 moderados (de 10 a 20%), enquanto vários outros locos com efeitos baixos (R^2 menor que 10%), o que é semelhante ao encontrado no presente trabalho.

Os QTL identificados nos GL 2, 7 e 10 no mapa de *P. trifoliata* explicam 6,3; 7,41 e 1,77% da variação fenotípica total. Dois desses QTLs, localizados nos GL 2 e 10, apresentam efeito aditivo negativo (-0,05 e -0,03, respectivamente), com seus alelos conferindo uma redução da expressão do fenótipo e sendo responsáveis em conjunto por 8,07% dessa variação. Em contrapartida, o QTL contido no GL 7 se mostra como tendo efeito aditivo positivo (0,05), o que torna seus alelos dirigidos

para o aumento do caráter analisado. Pode-se constatar, então, que houve um maior efeito aditivo negativo para explicar a variação fenotípica (8,07%) do que positivo (7,41%) dos alelos cujo genitor *P. trifoliata* é detentor, o que corrobora com o fato desse porta-enxerto ser citado na literatura como sendo resistente à *Phytophthora parasitica*.

Tabela 7. Mapa, grupo de ligação (GL), marcadores flanqueadores, distância do início em centiMorgans (cM), LOD score, proporção da variação fenotípica explicada pelo QTL (R^2) em porcentagem e efeito aditivo pela análise do mapeamento de intervalo composto (CIM) no FullsibQTL para o caráter comprimento real da lesão (CL_R) da gomose dos citros em híbridos de *P. trifoliata* x *C. sunki*.

Mapa	Grupo de ligação (GL)	Marcadores flanqueadores	Distância do início (cM)	LOD score	R^2 (%)	Efeito aditivo
trifoliata Rubidoux	2	100029470 F 0	58,51	4,06	6,3	-0,05
trifoliata Rubidoux	7	100087520 F 0	190,66	4,25	7,41	0,05
trifoliata Rubidoux	10	100025033 F 0	109,81	5,14	1,77	-0,03
tangerina Sunki	2	100088096 F 0	61,74	7,67	16,8	-0,08

Já o único QTL que foi detectado para o genitor *C. sunki*, localizado no GL 2, é responsável pela maior parte da variação fenotípica total dos valores de CL_R dos híbridos a *P. parasitica*, explicando 16,8% e possuindo efeito aditivo negativo (-0,08), o que faz com que atue no sentido de diminuir a expressão do CL_R na população de híbridos. Dessa forma, tal fato sugere que a tangerina Sunki tenha uma contribuição maior para transmitir alelos de resistência à progênie. Alguns trabalhos com mapeamento de QTLs em outras culturas na literatura reportam sobre alelos de resistência localizados no genitor suscetível, bem como alelos de suscetibilidade no resistente (Iqbal *et al.*, 2001; Matiello, 2004). Além disso, Siviero *et al.* (2006) também detectaram um QTL com efeito aditivo negativo, que chegou a explicar 18% da variação fenotípica total.

O alto valor encontrado para a herdabilidade em sentido amplo (65%) demonstra que a natureza genética apresenta papel preponderante na manifestação do fenótipo, fato que não se mostrava antes em trabalhos anteriores, cujos valores de herdabilidade encontrados para o caráter eram baixos, chegando a menos de 20%, como no trabalho de Siviero *et al.* (2006).

A detecção de vários QTLs associados com a resistência à *Phytophthora* e a enorme variação dos valores fenotípicos de CL_R dos híbridos em resposta à inoculação de *P. parasitica*, são indicativos de que a característica comprimento da

lesão associada à herança da gomose dos citros é de natureza complexa, controlada por poligenes e envolvendo tanto genética quanto ambiente, como é citada na literatura (Boava, 2004a; Medina Filho, 2003; Siviero *et al.*, 2002a). Assim, híbridos portadores da combinação favorável de QTLs, apresentam maior resistência à *Phytophthora*, enquanto aqueles com a combinação desfavorável são mais suscetíveis ao patógeno. O patossistema *Phytophthora*-citros demonstra grande possibilidade de sucesso na seleção de híbridos resistentes dentro do experimento, cenário importante em um programa de melhoramento genético. A localização de QTLs e a compreensão de seus efeitos genéticos concorrem então, para a detecção e escolha de possíveis genes candidatos responsáveis pela variação do fenótipo estudado (Grattapaglia, 2004).

5.6. Genotipagem para os ensaios de expressão gênica e o mapeamento de eQTLs

5.6.1. Avaliação da extração de RNA das plantas

Para Sambrook & Russel (2002), a razão entre as absorbâncias de 260 nm e 280 nm estima o grau de pureza do RNA, devendo ser igual ou superior a 1,75. Um RNA de boa qualidade deve ser aquele cuja razão, medida pelo espectrofotômetro, $A_{260/280}$ está entre 1,8 a 2,2. Para ensaios de expressão gênica, a quantificação no *NanoDrop ND-8000 spectrophotometer* (Thermo Scientific) é bastante importante, pois essa relação faz uma avaliação de possíveis contaminantes presentes nas amostras, como as proteínas, as quais desencadeiam inibições nas próximas etapas de síntese de cDNA e RT-qPCR. Tendo em vista a quantificação, a concentração desejável de RNA nas amostras era de no mínimo 1 µg (100 ng/µL), que correspondia à quantidade necessária para a síntese de cDNA, a fim de se ter material suficiente para as reações de RT-qPCR. Assim, as amostras apresentaram relação $A_{260/280}$ na faixa desejada e valores de concentração iguais ou superiores a 100 ng/µL.

No que diz respeito à análise de integridade do RNA, revelaram-se as duas bandas esperadas em cada amostra no gel desnaturante, que correspondem aos RNAs ribossômicos 18S e 28S (Figura 21). Todos os RNAs resultantes foram considerados apropriados quanto à qualidade e concentração para ensaios de expressão gênica com RT-qPCR.

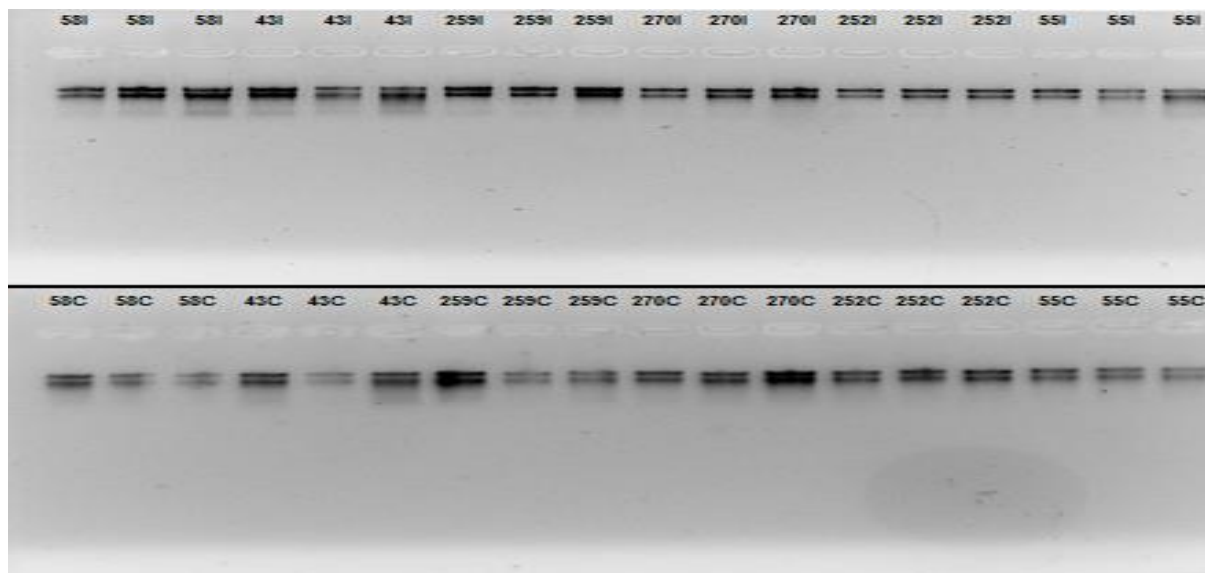


Figura 21. Géis de agarose desnaturante a 1,2% das três repetições biológicas de amostras de RNA total provenientes de seis híbridos de *Poncirus trifoliata* x *Citrus sunki*. Todas as demais amostras apresentaram o mesmo padrão de eletroforese. I = Inoculada; C = Controle.

5.6.2. Validação dos *primers* específicos para os genes candidatos

Os *primers* selecionados foram validados via PCR convencional para serem avaliados nos ensaios de expressão gênica com RT-qPCR e alguns resultados podem ser visto na Figura 22, que confere a obtenção de fragmentos de amplificação específica de um único fragmento esperado para oito *primers* avaliados. Não foram detectados fragmentos nas reações sem cDNA (branco), indicando ausência de contaminação, e nem fragmentos inespecíficos nos *primers* testados.

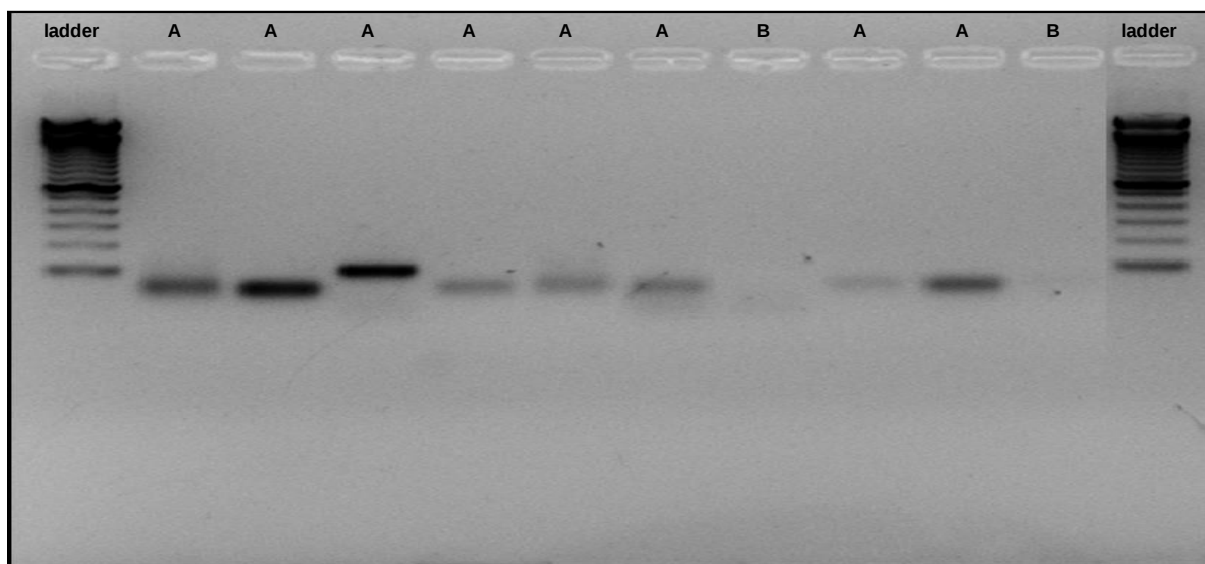


Figura 22. Fragmentos de amplificação visualizados em gel de agarose a 2% para oito *primers* testados. O mesmo padrão foi observado para os demais *primers*. (A) Reações feitas com amostras de cDNA (diluição 1:50); (B) Reação sem cDNA (branco).

Além disso, a especificidade dos *primers* para os 19 genes avaliados foi confirmada pela presença de um único pico em curvas de dissociação (Figura 23). Nas reações sem cDNA (branco), não foram detectadas curvas de amplificação, o que indica ausência de amplificações inespecíficas e contaminações.

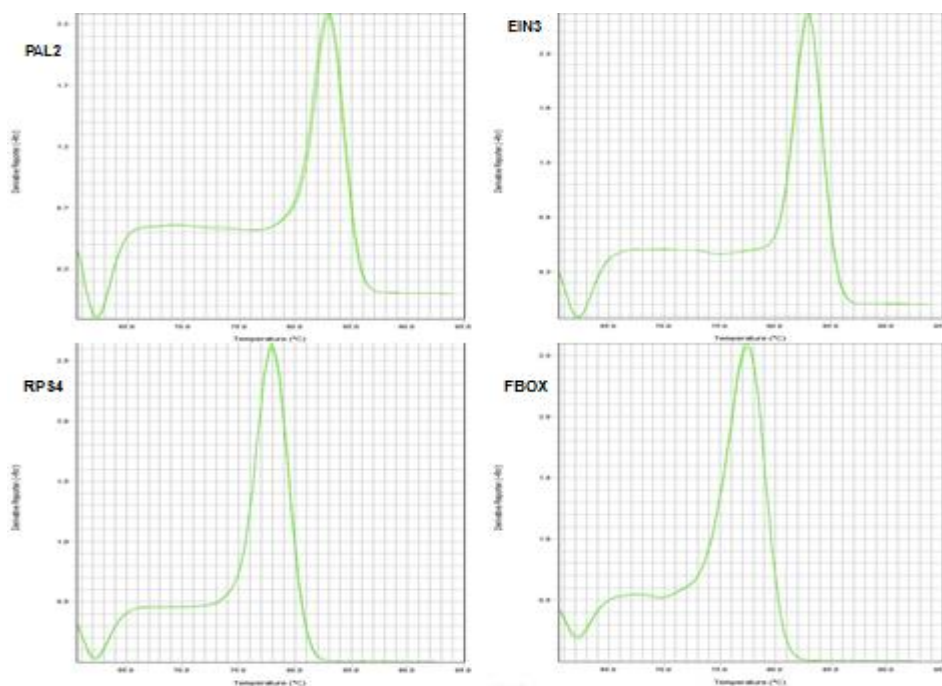


Figura 23. *Primers* validados pela curva de dissociação por RT-qPCR, mostrando um único pico na amplificação de cDNA em híbridos de *Poncirus trifoliata* x *Citrus sunki* para três genes representantes de cada via associada à resistência planta-patógeno (PAL2, EIN3, RPS4) e o normalizador FBOX. O mesmo padrão foi observado para os demais *primers*.

5.6.3. Normalização dos dados de RT-qPCR pela avaliação de genes endógenos

Os genes selecionados como normalizadores para as análises de RT-qPCR foram primeiramente avaliados quanto aos valores de Ct e SD (desvio-padrão) dos dados de Ct. Houve uma variação de 24,18 (FBOX) a 31,29 (SAND) nos valores médios de Ct para os três genes analisados. O gene GAPC2 foi o que apresentou a menor média dos dados de Ct, com 24,18 (Tabela 8; Figura 24). Sendo assim, esses resultados obtidos mostraram ser adequados para a expressão relativa dos genes-alvo, evidenciando valores de Ct abaixo de 35, segundo o que é descrito na literatura (Lilly *et al.*, 2011; Mafra *et al.*, 2012).

Tabela 8. Genes normalizadores avaliados pelo algoritmo do GeNorm, com os valores de Ct médio, desvio-padrão (SD) dos valores de Ct e valor M (*m-value*) de estabilidade.

Gene	Ct médio*	SD*	Valor M
FBOX	28,06	1,88	0,16
SAND	31,29	1,78	0,16
GAPC2	24,18	2,10	0,21

*Média dos dados de Ct e desvio-padrão dos valores de Ct por reações de RT-qPCR utilizando duplicatas de 55 amostras relacionadas a dois tratamentos experimentais.

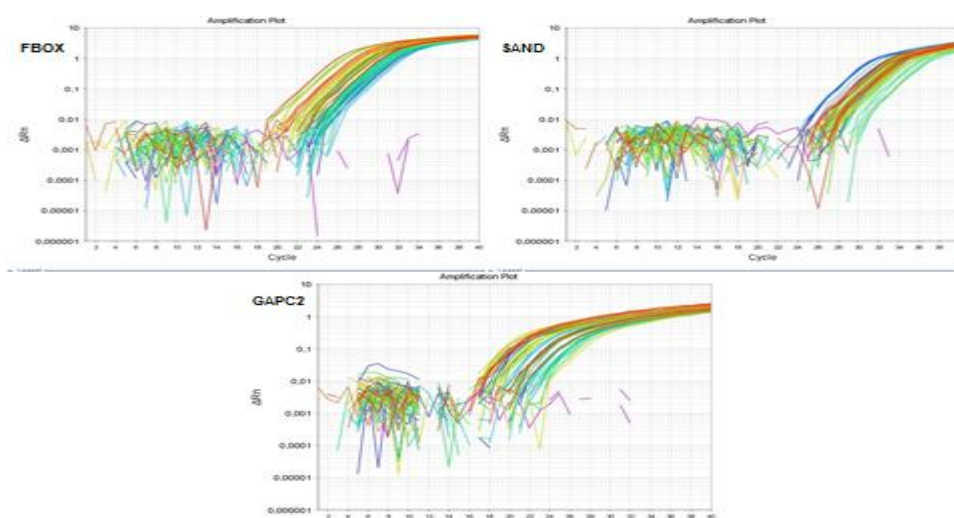


Figura 24. Gráficos de amplificação por RT-qPCR dos três genes endógenos avaliados a normalizadores em uma reação de qPCR para 16 amostras de cDNA em duplicata nos dois tratamentos experimentais. O mesmo padrão foi observado para as demais amostras.

O desvio-padrão dos dados de Ct oriundos das 55 amostras presentes nos ensaios de RT-qPCR sob dois tratamentos (Tabela 8) pode dá indícios sobre a estabilidade de cada gene endógeno, mas nem sempre o gene que apresentar o menor valor de SD será o melhor avaliado como normalizador, não garantindo muita confiabilidade e sendo necessária a aplicação de uma estatística com maior acurácia, similar ao uso do algoritmo fornecido pelo GeNorm. No presente estudo, o gene GAPC2 apresentou maior valor de SD (2,10), enquanto FBOX e SAND detiveram os menores desvios dos valores de Ct (1,88 e 1,78; respectivamente), sugerindo maior estabilidade.

Pela análise com o algoritmo do GeNorm, constatou-se que todos os três genes de referência apresentaram alta estabilidade de expressão, com os valores M variando de 0,16 para os melhores candidatos a normalizadores (FBOX e SAND) a 0,21 (GAPC2), que foi o maior *m-value* registrado (Figura 25). Tais valores estão de acordo com o sugerido pela literatura (Spiegelaere *et al.*, 2015) e com o manual do GeNorm, pois se mostram abaixo do limite de 1,5. Dessa forma, os genes FBOX e SAND foram classificados como os mais uniformes tanto pelos dados de SD quanto pelo algoritmo do GeNorm, superando o tradicional *housekeeping gene* GAPC2, comumente empregado para a normalização de ensaios de expressão gênica por RT-qPCR em plantas (Lobo & Lobo, 2014; He *et al.*, 2016).

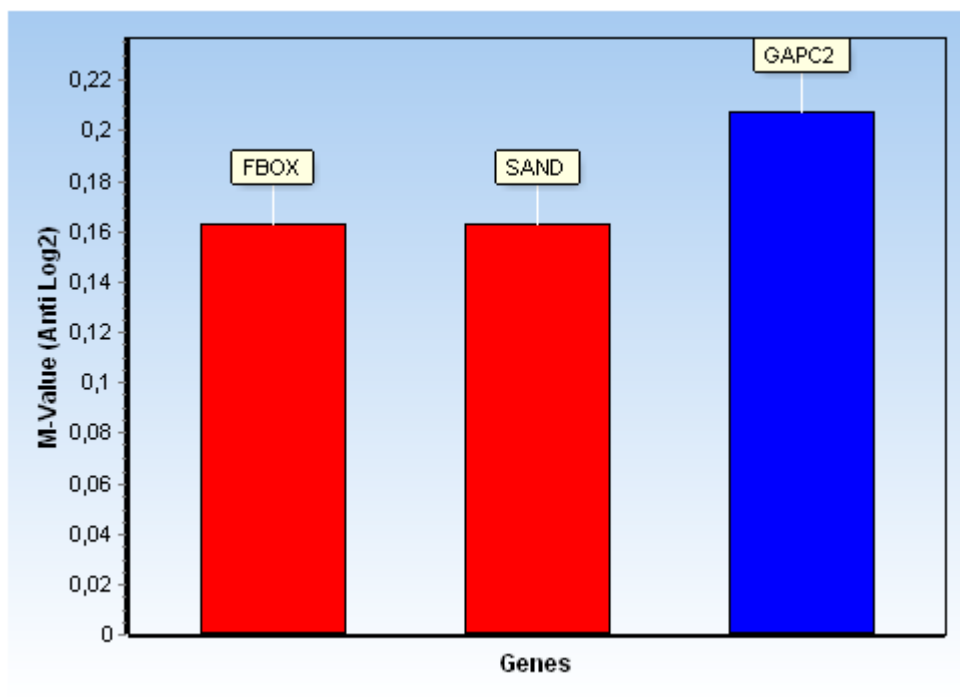


Figura 25. Resultado da análise pelo algoritmo do GeNorm, com a obtenção de um gráfico que compara o valor M de cada gene (as duas barras em vermelha indicam os melhores genes de referência para normalização, com igual e menor valor M).

Esses resultados foram semelhantes ao encontrado por Lilly *et al.* (2011), que identificaram os genes FBOX e SAND entre aqueles considerados mais estáveis em plantas de *Arabidopsis* infectadas por cinco tipos de vírus, classificando-os como novos genes de referência para análises de expressão gênica em plantas. Além disso, outro trabalho, que buscou avaliar a estabilidade de *housekeeping genes* em tabaco a partir da infecção também com cinco vírus, encontrou o gene FBOX como um dos que se apresentaram mais estáveis dentre todas as cinco condições de estresse biótico (Liu *et al.*, 2012). Já He *et al.* (2016), avaliando a estabilidade de 10 genes candidatos a normalizadores em plantas de *Gentiana macrophylla* sob diferentes tipos de estresse abiótico, dentre os quais estavam aqueles tradicionalmente utilizados, como o GAPC2; e que se classificam como novos, a exemplo do SAND e FBOX, identificaram o gene SAND como o mais adequado numa escala global de estabilidade, chegando a superar o tradicional GAPC2. Trabalhos com citros também foram feitos com vistas a identificar os melhores genes endógenos para análises de expressão gênica por RT-qPCR. Sendo assim, Mafrá *et al.* (2012) conseguiram identificar os genes FBOX, SAND e GAPC2 como aqueles com maior estabilidade em *Citrus spp.* infectados com diversos patógenos, inclusive o oomiceto *Phytophthora parasitica*, agente causador da gomose dos citros. FBOX e SAND chegaram a superar o gene GAPC2 e outros *housekeeping genes* como

melhores normalizadores apontados pelo algoritmo do GeNorm para ensaios de RT-qPCR com plantas sob interação citros-*Phytophthora*. Portanto, os genes FBOX e SAND foram testados e selecionados como genes normalizadores para as análises no presente estudo dos genes-alvo candidatos, relacionados à resistência à *Phytophthora parasitica*.

5.6.4. Avaliação dos padrões de expressão dos genes candidatos

O comportamento dos híbridos de *P. trifoliata* x *C. sunki* frente à infecção causada por *P. parasitica* foi avaliado pela inoculação das plantas e coleta de folhas 48 horas após a infestação, para a caracterização da resposta sistêmica de defesa. Patógenos hemibiotróficos, como *P. parasitica*, possuem duas fases distintas: a biotrófica, inicial e que ocorre geralmente nas primeiras 36-48 horas; e a necrotrófica, a partir da colonização do patógeno no hospedeiro, disseminando-se pelos tecidos vegetais necrosados logo após o estágio biotrófico (Grenville-Briggs & West, 2005; Boava *et al.*, 2011b). Sendo assim, para analisar a expressão de genes candidatos envolvidos na interação *Phytophthora*-citros por RT-qPCR, acredita-se que a fase de transição das 48 horas pós-infecção constitui no tempo ideal, em que há toda uma reprogramação transcricional das células vegetais para a ativação de mecanismos transdutores de sinais, resultando na expressão de genes de defesa associados às vias tanto ao SA (resposta típica de patógenos biotróficos) quanto ao JA/ET e JA/ABA (respostas típicas de patógenos necrotróficos). Além disso, trabalhos anteriores de *time course* que avaliaram genes-alvo relacionados com o patossistema formado por *Phytophthora* com duas espécies de citros contrastantes fenotipicamente à reação ao invasor, correspondentes a *P. trifoliata* (resistente) e *C. sunki* (suscetível), constataram muitos genes (como PR2, PR3 e PAL) induzidos no tempo de 48 horas após a infestação (Teixeira, 2005; Boava *et al.*, 2011a).

A habilidade da planta em suprimir o desenvolvimento e a reprodução de espécies patogênicas determina sua resistência (incompatibilidade) ou suscetibilidade (compatibilidade), por meio de uma complexa troca de transdução de sinais e mecanismos elaborados a partir do processo coevolutivo. A restrição nas taxas reprodutivas dos invasores é alcançada pelos mecanismos de defesa em plantas altamente resistentes, enquanto aquelas que são suscetíveis possibilitam que o patógeno tenha reprodução em larga escala. O desenvolvimento de uma HR (resposta de hipersensibilidade) e a expressão de genes de defesa associados às vias de sinalização dos fitormônios vegetais são respostas características de

interações incompatíveis, restringindo ou eliminando o patógeno. Já nas interações compatíveis, esses mecanismos geralmente não ocorrem, o que permite ao patógeno se desenvolver em amplo espectro, de modo a doença se manifestar intensamente (Kazan *et al.*, 2001; Zurbriggen *et al.*, 2010). Dessa forma, uma definição do ponto de vista fisiológico para resistência consiste na capacidade da planta em desenvolver estratégias para atrasar ou até mesmo evitar a infecção dada pela atividade do organismo patogênico em seus tecidos. Uma planta resistente se diferencia de uma suscetível por ativar rapidamente mecanismos de defesa após o reconhecimento de moléculas elicitórias (elicitores) do patógeno, o que resulta numa forma eficaz de combater a doença (Schenk *et al.*, 2000). Isso não significa que a característica suscetibilidade seja determinada pela ausência de respostas de defesa, com a não ativação de mecanismos contra o patógeno ao longo do tempo. Sendo assim, a resistência sistêmica, a exemplo da SAR, pode ser ativada em plantas suscetíveis, por meio de estratégias de defesa mais lentas e passivas, como as barreiras estruturais pré-existentes (parede celular, estômatos e tricomas), e outras mais ativas, como o acúmulo de peróxido de hidrogênio típico da ROS e a produção das fitoalexinas, sem que haja uma defesa mais específica, normalmente associada à HR e à expressão de genes *R* (de resistência) (Dangl & Jones, 2001).

Já foi amplamente demonstrado na literatura que genótipos suscetíveis de diversas espécies vegetais inoculados com patógenos avirulentos, virulentos, microrganismos não patogênicos e tratados com substâncias elicitórias provenientes dos microrganismos patogênicos podem apresentar proteção local e sistêmica frente à infecção causada por uma série de fitopatógenos (Sticher *et al.*, 1997; Pascholati, 1998; Ostendoorp *et al.*, 2001). Entretanto, quando se observa uma resistência específica em vários patossistemas, genótipos suscetíveis e resistentes apresentam comumente diferenças quanto à expressão dos genes de defesa, com os suscetíveis geralmente exibindo uma indução mais tardia e menos eficaz (Tao *et al.*, 2003; Benitez *et al.*, 2005).

No presente trabalho, alguns híbridos de *P. trifoliata* x *C. sunki* classificados como suscetíveis e moderadamente suscetíveis induziram genes de defesa envolvidos no combate à gomose de *Phytophthora* após 48 horas da inoculação, em até mais vezes que muitos híbridos tolerantes e/ou resistentes. Esse fato sugere que, apesar de se constatar o aumento da expressão de genes nesses genótipos suscetíveis, isso não é suficiente para controlar a infecção de forma mais eficaz e ter

a manifestação de uma menor lesão. Outra possibilidade é que o tempo de 48 horas após a infestação já esteja caracterizando uma resposta mais tardia desses híbridos à *P. parasitica*, com alguns genótipos suscetíveis tendo seu ápice de aumento na expressão gênica, enquanto alguns resistentes já tenham induzido os genes poucas horas antes (24-36 horas) e apresentaram uma diminuição da expressão após o controle sistemático do organismo invasor. Por outro lado, isso também pode ser reflexo da alta variabilidade genética desencadeada pela segregação entre os dois genitores contrastantes, gerando híbridos que mesmo sendo suscetíveis, podem expressar genes de resistência, assim como a tangerina Sunki pode ter genes *up-regulated* e o trifoliata Rubidoux genes *down-regulated*; e isso ser um fenômeno inerente à herança complexa da gomose dos citros.

Um gradiente também pode existir entre as duas características extremas da suscetibilidade e resistência, com genótipos possuindo reações intermediárias à infecção, podendo ser enquadrados como tolerantes (Silva, 2001). De acordo Trudgill (1991), a tolerância corresponde à capacidade da planta em suportar os efeitos drásticos ao estresse de algum fator biótico ou abiótico, sem que haja morte ou danos graves de perda da cultura. Portanto, plantas tolerantes são suscetíveis ao patógeno, e muitas vezes são tratadas como resistentes. No entanto, deve ser destacado que a tolerância independe da resistência, e consiste na habilidade da planta hospedeira em se recuperar das adversidades produzidas pela infecção de um patógeno por intermédio de outros mecanismos de defesa, os quais estão geralmente relacionados a uma resposta menos específica, típica de uma explosão oxidativa de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a produção de compostos antimicrobianos, como as fitoalexinas.

Já foi demonstrado que porta-enxertos resistentes à *Phytophthora*, como o trifoliata Rubidoux e o citrumelo Swingle, apresentam uma regeneração de suas raízes na presença de *P. nicotianae*, podendo haver envolvimento das fitoalexinas encontradas em tecidos lenhosos de citros infectados com *Phytophthora* (Graham & Timmer, 2003). Com base na genotipagem por meio da expressão de genes-alvo envolvidos na interação *Phytophthora*-citros, foram encontrados muitos híbridos tolerantes, que reprimiram tais genes e podem ser diferenciados dos genótipos resistentes devido a esse fato. Tais plantas parecem entrar num estado de “hibernação”, sendo eficientes no combate ao oomiceto pela ativação de outros mecanismos de defesa associados possivelmente à ROS e às fitoalexinas e

resultando num menor tamanho da lesão. A herança da gomose dos citros, então, pode ser caracterizada por uma resposta inespecífica, que não leva à expressão de alguns genes de defesa envolvidos nas vias de sinalização dos fitormônios vegetais e averiguados no presente estudo. Além disso, alguns genes-alvo parecem estar mais envolvidos com a interação *Phytophthora*-citros, processo observado pelo aumento da expressão gênica em híbridos tolerantes e/ou resistentes que apresentaram menores comprimentos da lesão, além dos padrões de expressão pela análise a média geral dos valores de *Fold change* dos citrandarins com os dois genitores, o limão Cravo e o citrumelo Swingle, permitindo-se fazer inferências sobre a herança genética de cada gene; e das análises comparativas feitas pelo presente trabalho (ANOVA e correlações entre os dados fenotípicos e de expressão).

5.6.4.1. Via do SA

Em resposta a *P. parasitica*, constatou-se uma enorme variação intra e intergrupos quanto à ativação da via de sinalização do ácido salicílico (SA) (Figura 26), com alguns genes de defesa (WRKY46, SGT1b, BSMT1, PR2 e MKP1) parecendo desempenhar um maior papel frente à interação patógeno-hospedeira (Figura 27), bem como entre seus genitores suscetível e resistente (Figura 28). Em todos os dez genes avaliados pertencentes à via do SA, pôde-se visualizar a indução por parte de alguns citrandarins tanto do grupo suscetível e/ou moderadamente suscetível (S/MS) quanto do tolerante e/ou resistente (T/R) (Figuras 26 e 27), indicando que apesar de nem todos os genótipos suscetíveis apresentarem *down-regulation*, assim como nem todos os resistentes apresentaram *up-regulation*, tais genes de certa forma estão sendo ativados como respostas de defesa à *P. parasitica*; e a enorme variação registrada seja devido à variabilidade genética entre essa progênie segregante (Figura 28).

No geral, seis genes-alvo associados à via do SA (PAL2, EDS1, NPR3, WRKY70, WRKY62 e PR2) mostraram um padrão de expressão gênica quando se observa a variação intergrupo, com a maioria dos citrandarins tanto do grupo T/R quanto do grupo S/MS reprimindo tais genes, enquanto uma minoria os induz, o que evidencia uma menor participação na resposta de defesa à *Phytophthora* (Figura 26). Entretanto, o gene PR2 parece estar mais envolvido, devido ao genótipo 22, que obteve maior indução (*Fold change* = 2,71). Esse gene codifica a proteína β -1,3-glucanase, que faz parte de um grupo de proteínas de resistência denominadas de PRs (*pathogenesis-related proteins*) e apresentam propriedades anti-oomicetos, pois

constitui numa enzima que degrada a parede celular desses organismos composta por β -glucanas (Glazebrook, 2001).

Outros quatro genes-alvo (WRKY46, SGT1b, BSMT1 e MKP1), envolvidos na via de sinalização do SA, parecem desempenhar uma função maior em relação à defesa mediada contra *P. parasitica*, com três padrões intergrupos de expressão gênica mais diferenciados. No primeiro, observou-se que os genes WRKY46 e MKP1 foram majoritariamente induzidos em citrandarins pertencentes ao grupo S/MS, sugerindo que a maioria dos genótipos suscetíveis tentam combater o oomiceto expressando esses dois genes, mas isso não é suficiente para controlar a infecção e ter o desenvolvimento de uma menor lesão. Tal fato não foi verificado com os híbridos do grupo T/R, os quais predominantemente reprimiram tais genes (Figura 26).

Os genótipos 169, 279 e 206 induziram o gene WRKY46; já em relação ao MKP1, os maiores valores de indução foram obtidos para os híbridos 169, 206 e 22 (*Fold change* = 12,3; 11,8 e 10,6; respectivamente), membros do “Top 5” (Figura 27). O gene WRKY46 faz parte de uma grande família de fatores de transcrição, os quais modulam, dentre outros processos vitais à planta, a resistência a vários patógenos pela regulação da via *downstream* do SA, ativando genes de defesa responsivos a esse fitormônio (Vlot *et al.*, 2009). Hu *et al.* (2012), em um estudo de expressão gênica com *Pseudomonas* spp. em mutantes de *Arabidopsis*, comprovaram que WRKY46 atua como regulador positivo da via de sinalização mediada por SA. Já o gene MKP1 é membro de uma superfamília de proteínas fosfatases, as MKPs (*MAP kinase phosphatases*), bastante conhecidas por atuarem como reguladores-chave da sinalização mediada por MAPKs (proteínas MAP quinases), a qual é responsável pelo desenvolvimento de inúmeras respostas de defesa (Koornneef & Pieterse, 2008). Enquanto alguns estudos com *Arabidopsis* afirmam que uma fosfatase MKP1 atua como regulador negativo de respostas mediadas por PAMPs e pelo SA (Anderson *et al.*, 2011; Meng & Zhang, 2013), um outro indicou que a proteína do tipo TIR-NBS-LRR denominada SNC1 (*suppressor of NPR1, constitutive 1*), responsável por atuar como receptor de genes de resistência, interage e modifica naturalmente a função de MKP1, resultando na modulação da biossíntese de SA para a geração de uma resposta de defesa (Bartels *et al.*, 2009).

Já o segundo padrão intergrupo de expressão gênica, cujo único representante foi o gene BSMT1, revelou que esse gene, cuja expressão codifica

uma enzima atuante no metabolismo do SA, foi induzido predominantemente entre os citrandarins tanto do grupo S/MS quanto do grupo T/R, sugerindo que independentemente das características extremas da suscetibilidade e resistência, muitos genótipos tentam combater o oomiceto *P. parasitica* pela *up-regulation* desse gene, e alguns obtêm êxito (Figura 26). Um terceiro padrão é composto pelo SGT1b, determinando que esse gene possivelmente apresenta um maior papel frente à interação *Phytophthora*-citros, pois se encontrou majoritariamente reprimido em híbridos de *P. trifoliata* x *C. sunki* pertencentes ao grupo S/MS, portanto, em citrandarins mais suscetíveis; situação diferente ao que foi constatado para os citrandarins do grupo T/R, isto é, híbridos mais resistentes, devido ao SGT1b ser *up-regulated* na maioria dos casos nesse grupo (Figura 26).

Os genótipos 169, 22, 279 e 206 induziram tanto o gene BSMT1 quanto o gene SGT1b (Figura 27), corroborando para que tais genótipos possam de alguma forma estar superexpressando tais genes e isso contribuir no combate à infecção e no controle de uma menor lesão. Genes diferencialmente expressos entre plantas resistentes e suscetíveis, bem como entre os seus híbridos resistentes e suscetíveis, constituem candidatos promissores associados à resposta de resistência a um patógeno (Machado *et al.*, 2011). Muitos trabalhos afirmam que a superexpressão de enzimas envolvidas no metabolismo de SA, tais como *SA glucosyltransferase 1* (AtSGT1) ou *SA/benzoic acid methyltransferase 1* (OsBSMT1) leva à redução dos níveis do SA, o que afeta a expressão de genes *PR* e promove um aumento da suscetibilidade aos patógenos (Koo *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2008; Vlot *et al.*, 2009). Em contrapartida, outros estudos contestam esse fato, visto que o gene SGT1 pode ser um regulador positivo da resposta mediada por HR ao longo da infecção desencadeada pela interação patógeno-hospedeiro (Azevedo *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010). Além disso, trabalhos com o gene BSMT1 também questionam isso, comprovando que o aumento da produção do MeSA, produzido pela superexpressão do gene OsBSMT1 em plantas de tabaco infectadas com o vírus TMV, atua como um mecanismo de defesa pela indução de genes responsivos ao JA, o que colabora ainda mais para a descrição do antagonismo existente entre SA e JA na literatura (Koo *et al.*, 2007; Shah & Zeier, 2013).

Em relação aos padrões de expressão dos genes, SGT1b e BSMT1, envolvidos no metabolismo de SA, estão sendo induzidos na grande maioria dos citrandarins, fato observado pela média geral dos 51 híbridos analisados para os

dois genes ficar acima de 1 (positiva utilizando $\text{Log}_2\text{Fold change}$), indicando uma maior expressão (Figura 28). Para todos os outros genes da via do SA, a média geral demonstrou *down-regulation* predominante entre os híbridos de *P. trifoliata* x *C. sunki*. Dessa forma, inferências podem ser feitas sobre a herança genética de cada gene, observando os dois genitores com a média geral para os híbridos com esses dois genes de resistência que apresentaram maior contribuição para as respostas de defesa contra *P. parasitica*.

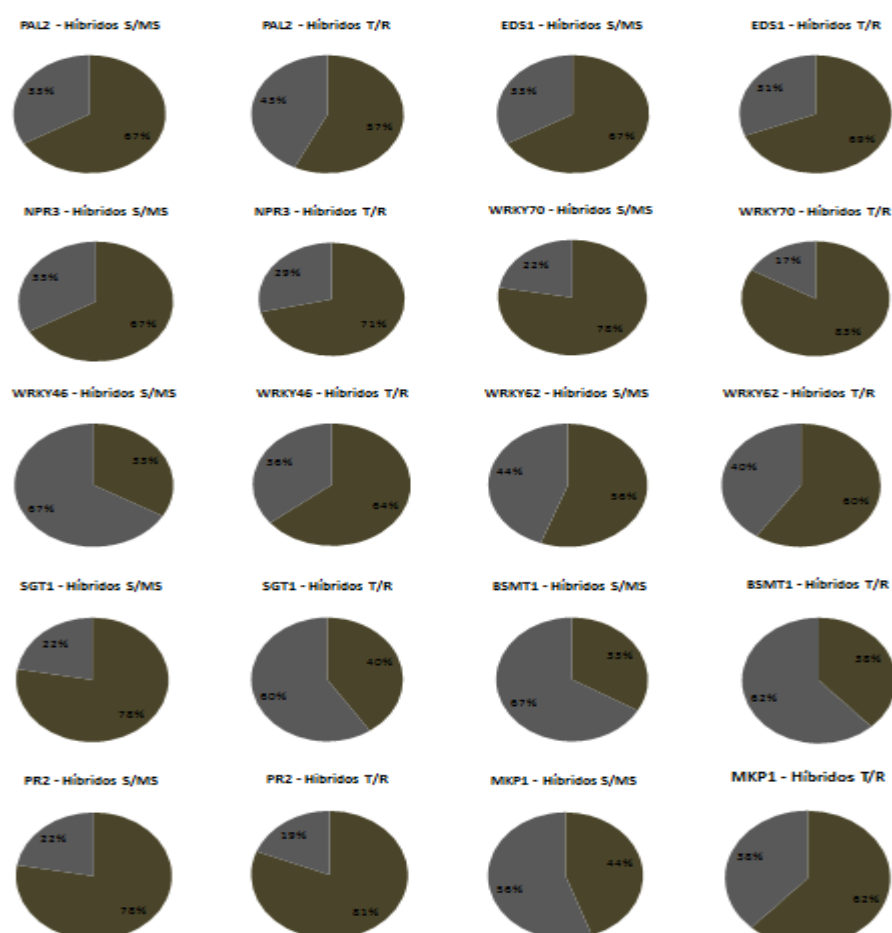
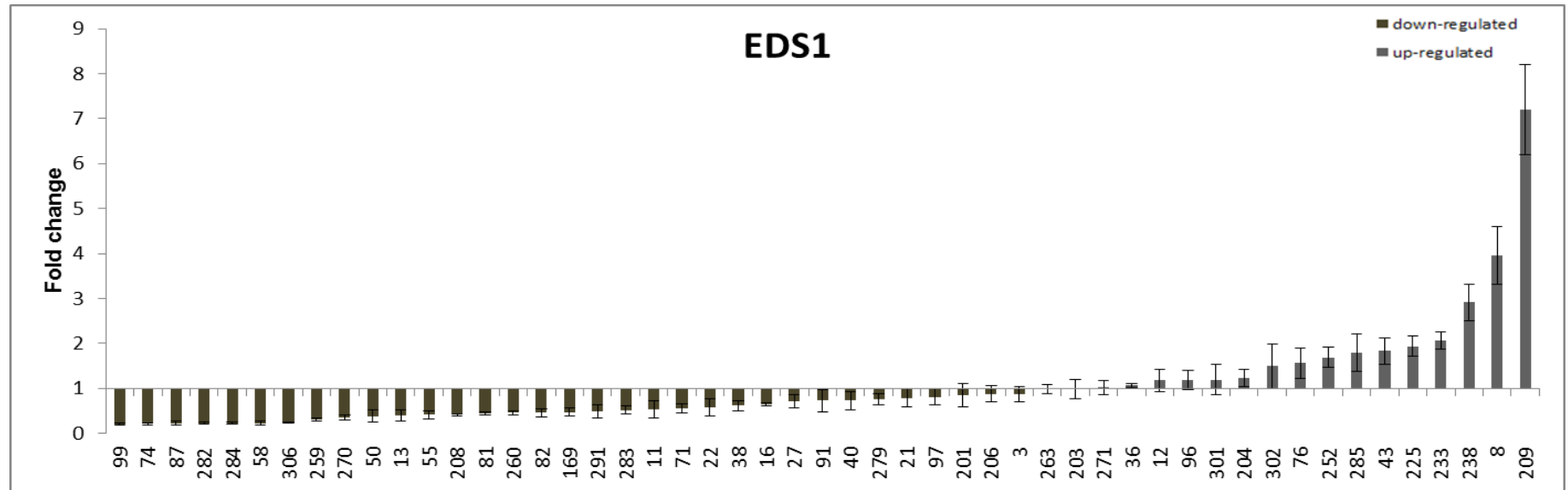
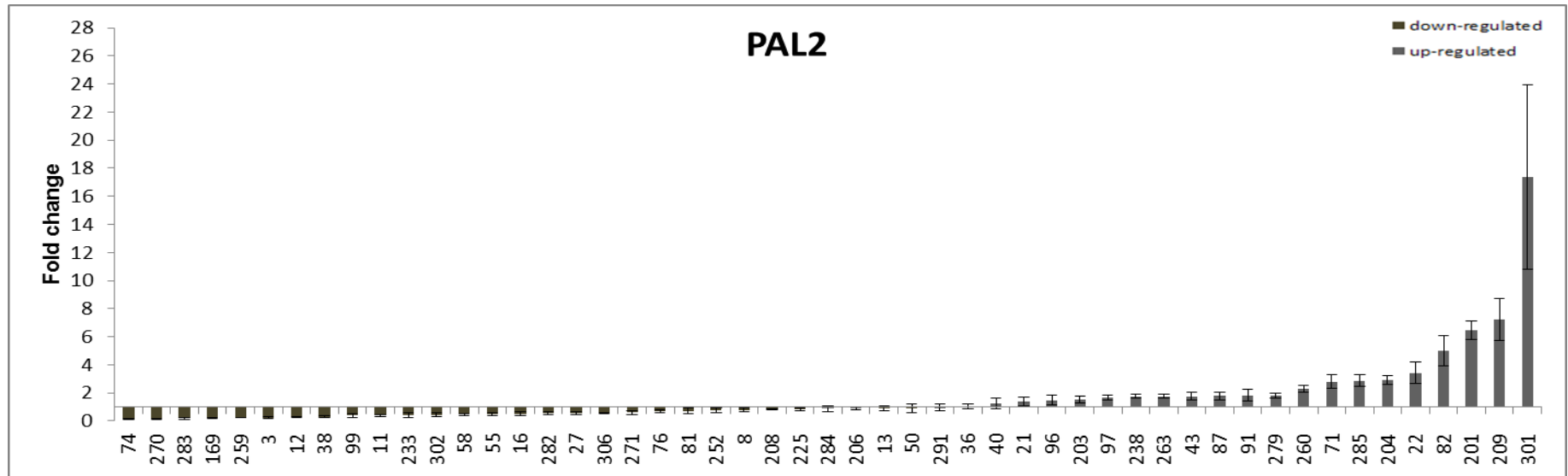
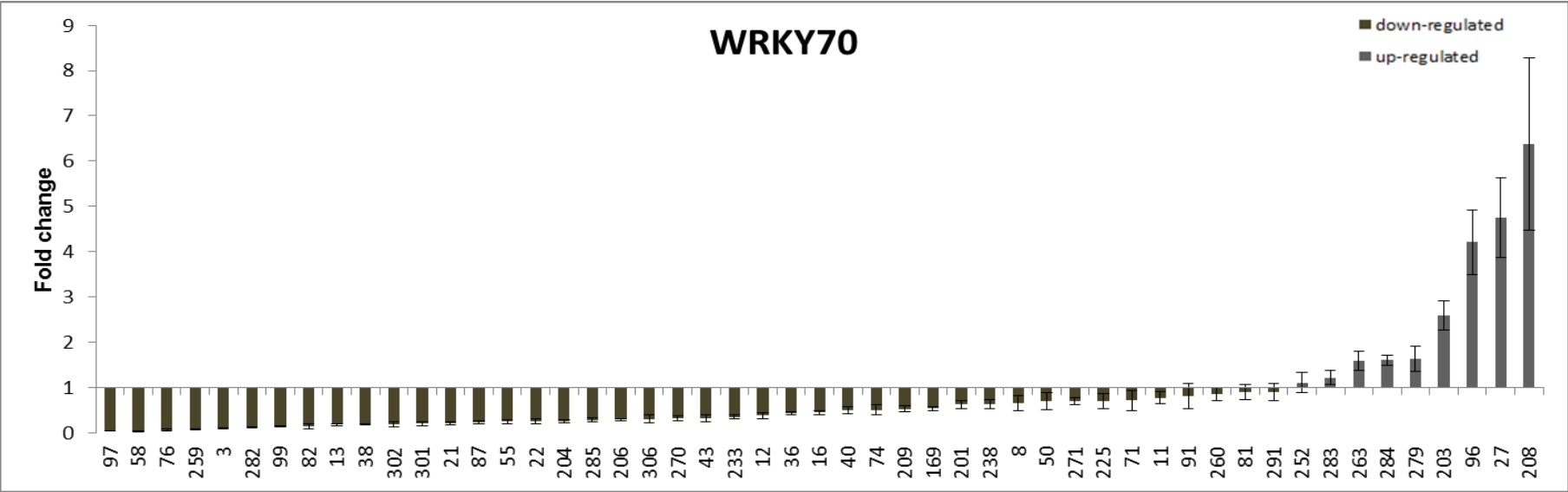
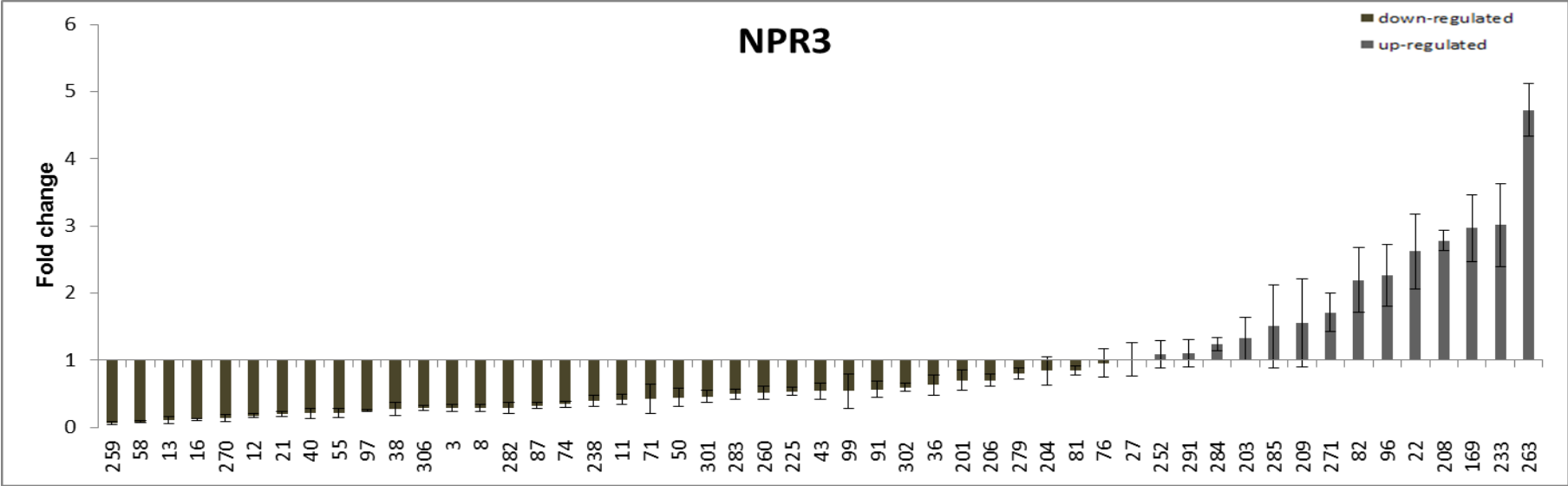
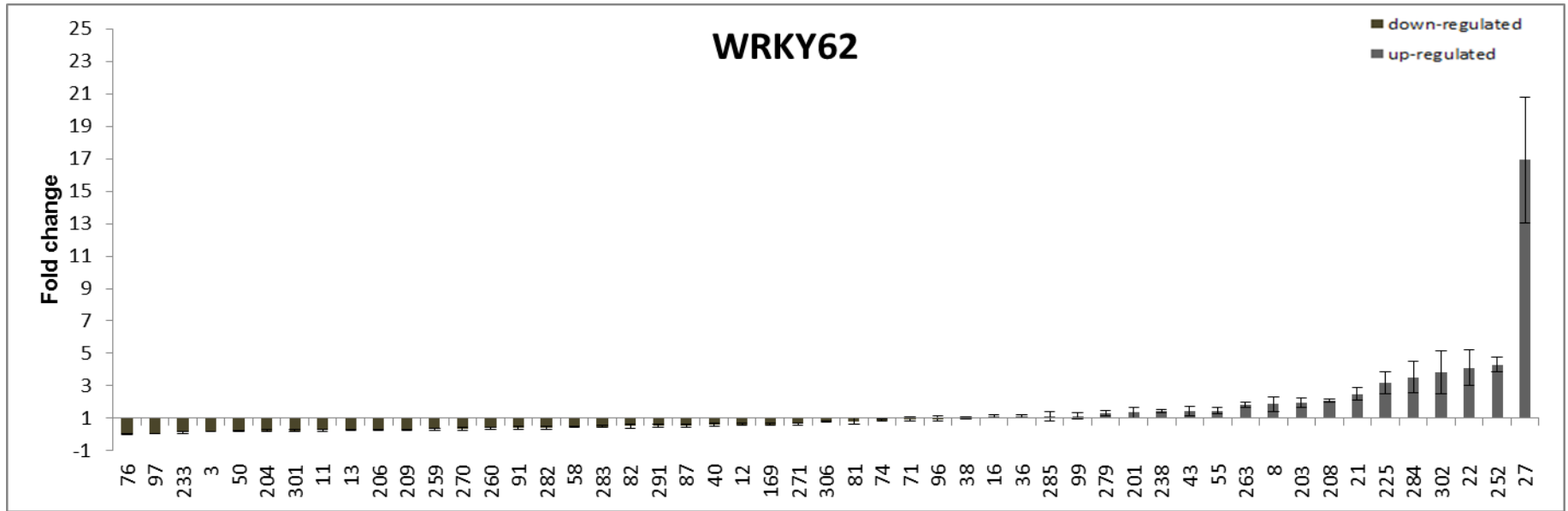
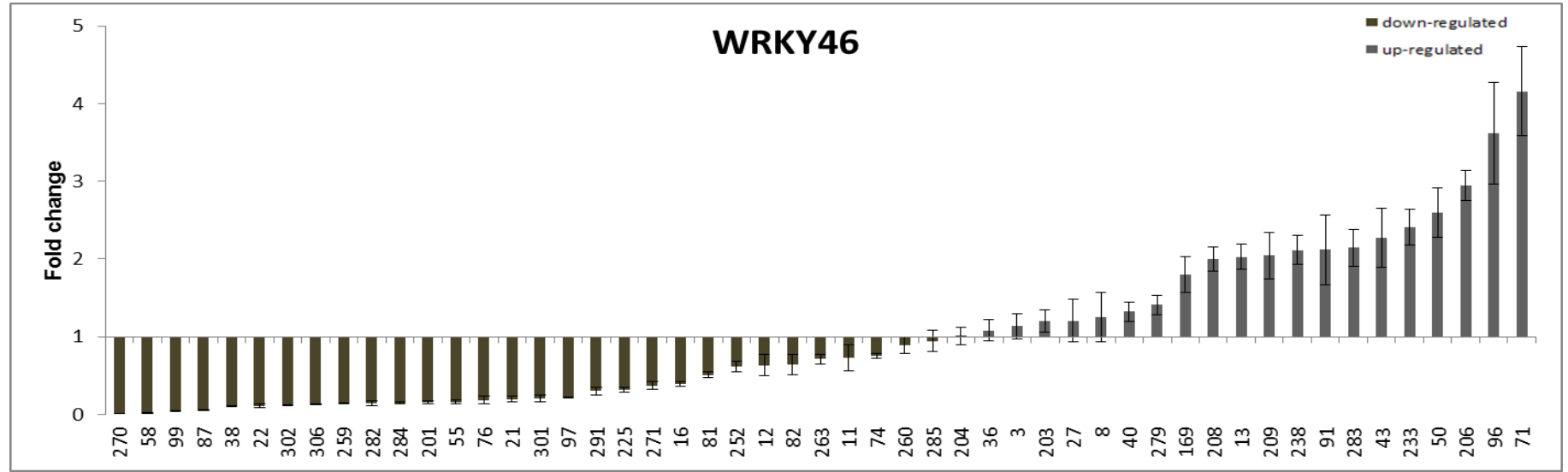
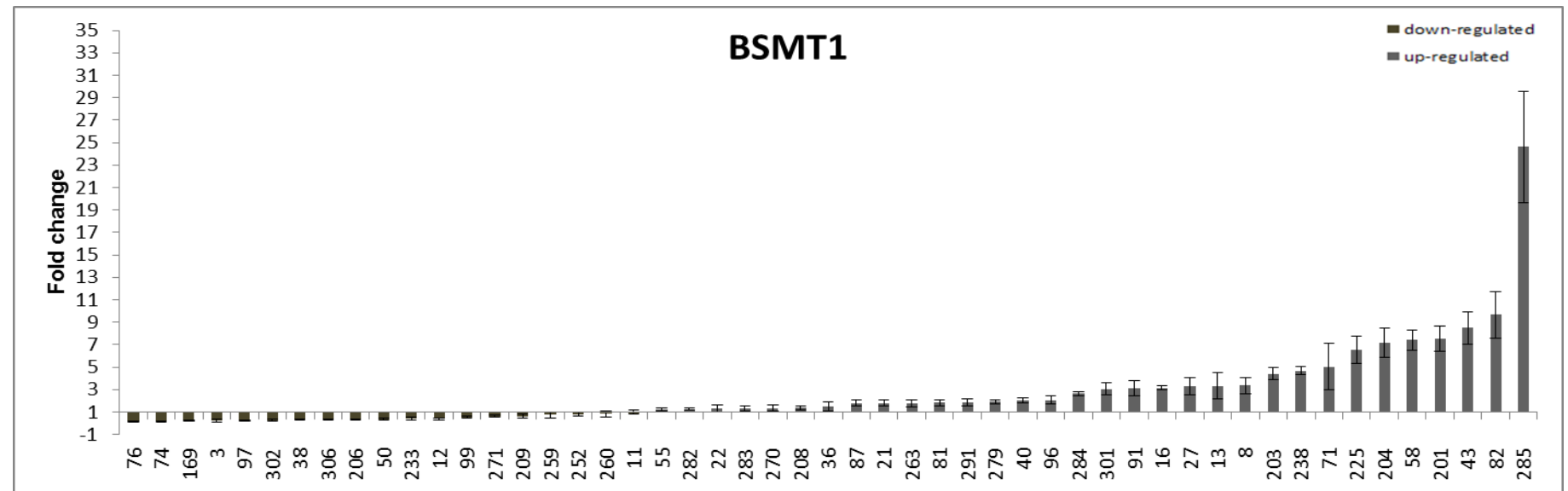
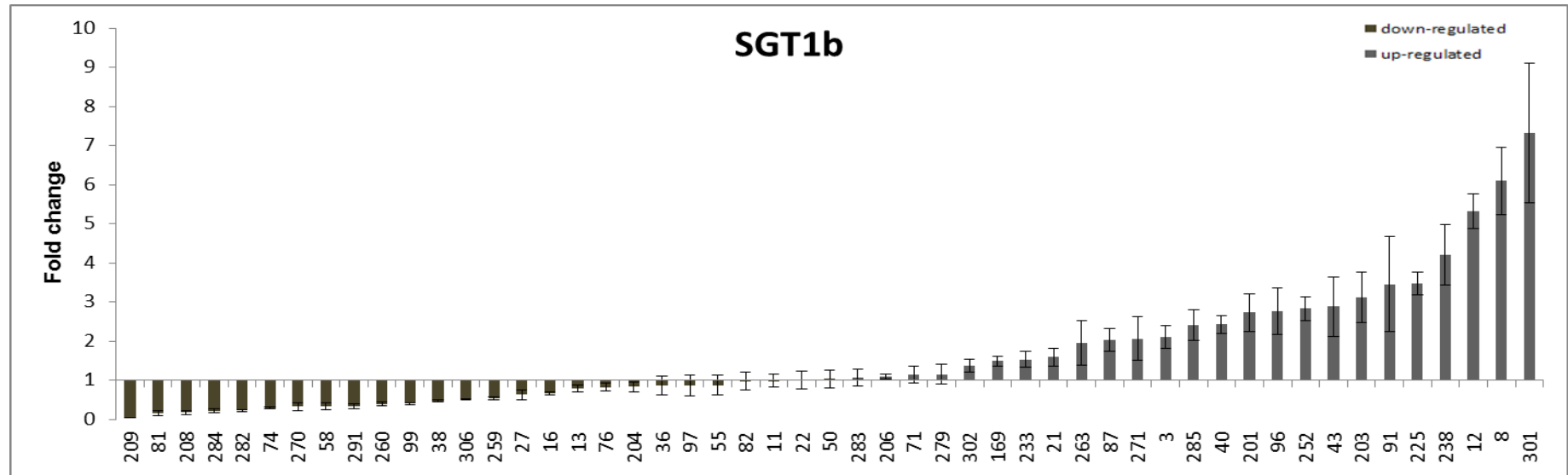


Figura 26. Percentual de híbridos de *Poncirus trifoliata* x *Citrus sunki* distribuídos em dois grupos, que apresentaram indução ou repressão de cada gene-alvo associado à via do ácido salicílico (SA). Em marrom escuro e em cinza claro, *down-regulation* e *up-regulation*, respectivamente. S/MS = híbridos suscetíveis e/ou moderadamente suscetíveis; T/R = híbridos tolerantes e/ou resistentes.









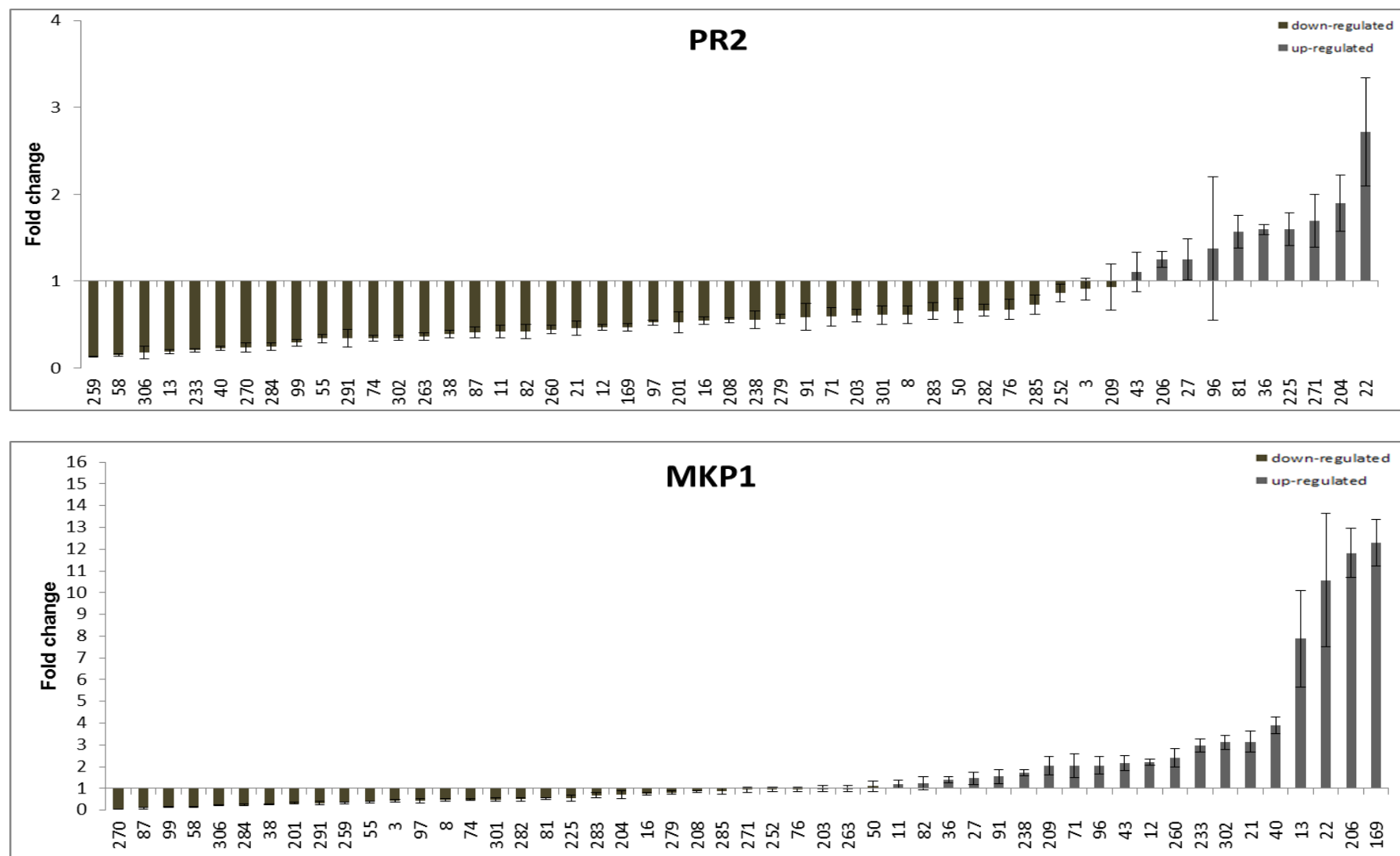


Figura 27. Padrões de expressão dos genes associados à via do ácido salicílico (SA) em híbridos de *Poncirus trifoliata* x *Citrus sunki*. Para todos os genes, foram calculados os valores de *Fold change* em relação às plantas controle não inoculadas (*Fold change* = 1). Em marrom escuro e em cinza claro, híbridos que apresentaram o gene-alvo reprimido (*down-regulated*) e induzido (*up-regulated*), respectivamente.

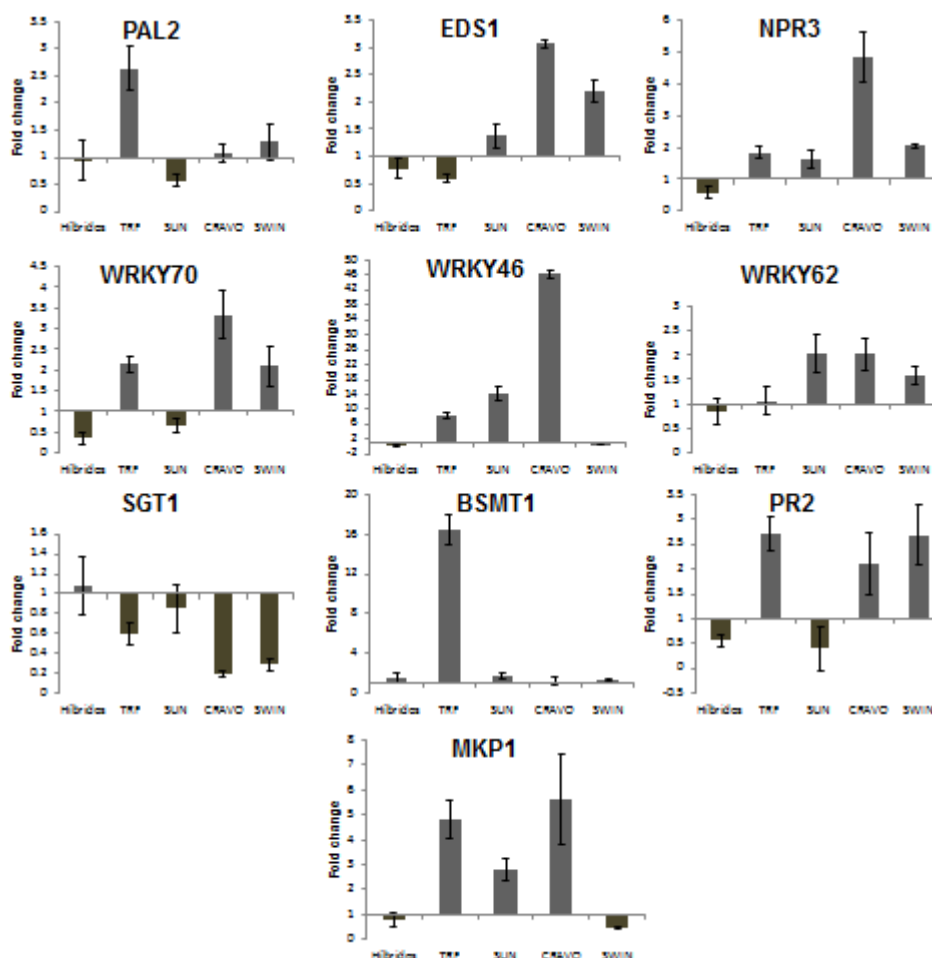


Figura 28. Padrões de expressão dos genes associados à via do ácido salicílico (SA) com a média geral dos 51 híbridos analisados de *Poncirus trifoliata* x *Citrus sunki* em comparação aos dois genitores (TRF e SUN), o limão Cravo (CRAVO) e o citrumelo Swingle (SWIN). Em marrom escuro e em cinza claro, *down-regulation* e *up-regulation*, respectivamente.

Constatou-se que para o BSMT1, tanto o trifoliata Rubidoux quanto a tangerina Sunki o induziram, com o genitor resistente apresentando uma alta indução (*Fold change* = 16,5) e, portanto, maior que o do parental suscetível (*Fold change* = 1,75), indicando que o gene BSMT1 foi possivelmente transmitido pelo genitor *P. trifoliata* para contribuir no combate à *P. parasitica* entre os híbridos resistentes. Já em relação ao gene SGT1b, os dois genitores o reprimiram, com o parental trifoliata Rubidoux tendo uma repressão maior (*Fold change* = 0,59) do que a tangerina Sunki (*Fold change* = 0,85), sugerindo que para esse gene, o genitor suscetível deve ter contribuído para sua transmissão na maioria da progênie, desencadeando uma resistência a *P. parasitica*. Dessa forma, não é apenas o genitor resistente que pode transmitir genes responsáveis para a defesa da planta, fato demonstrado em alguns trabalhos na literatura (Iqbal *et al.*, 2001; Matiello, 2004). Quanto aos outros dois porta-enxertos de referência também avaliados no

presente estudo (limão Cravo e citrumelo Swingle), a maioria dos genes associados à via do SA se encontrou *up-regulated*, com exceção do gene SGT1b para o suscetível limão Cravo e dos genes SGT1b e MKP1 para o resistente citrumelo Swingle (Figura 28). Tal fato demonstra que essas duas espécies de citros devem ativar outros mecanismos de defesa frente à infecção de *P. parasitica*.

5.6.4.2. Vias do JA/ET

Em resposta a *P. parasitica* e em comparação à via do SA, constatou-se uma menor variação intra e intergrupos quanto à ativação das vias de sinalização do ácido jasmônico e etileno (JA/ET) (Figura 29), com alguns genes de defesa (PR3, PR4 e Chitinase) parecendo desempenhar um maior papel frente à interação patógeno-hospedeira, quando se observa uma maior expressão gênica diferencial entre os citrandarins suscetíveis e resistentes (Figura 30). Em todos os seis genes avaliados pertencentes às vias do JA/ET, pôde-se visualizar a indução por parte de alguns citrandarins tanto do grupo suscetível e/ou moderadamente suscetível (S/MS) quanto do tolerante e/ou resistente (T/R) (Figuras 29 e 30), indicando que apesar de nem todos os genótipos suscetíveis apresentarem *down-regulation*, assim como nem todos os resistentes apresentaram *up-regulation*, tais genes de certa forma estão sendo ativados como respostas de defesa à *P. parasitica*.

Apenas dois padrões de expressão gênica foram constatados nos genes avaliados das vias do JA/ET. No primeiro, quatro genes-alvo associados às vias do JA/ET (ACO, EIN3, Chitinase e GST22) mostraram um padrão de expressão gênica quando se observa a variação intergrupo, com a maioria dos citrandarins tanto do grupo T/R quanto do grupo S/MS reprimindo tais genes, enquanto uma minoria os induz, o que evidencia uma menor participação na resposta de defesa à *Phytophthora* (Figura 29). Entretanto, o gene denominado Chitinase [*C. sinensis*], dado esse nome devido aos *primers* terem sido desenhados com base na sequência do gene da enzima Chitinase em *C. sinensis*, parece estar mais envolvido, devido ao genótipo 22 ter sido aquele que ficou em segundo lugar como exemplo de maior indução (*Fold change* = 5), além de outros híbridos como o 206 e 279 também o estarem induzindo (Figura 30). Esse gene codifica uma proteína quitinase em *C. sinensis*, que pode ser codificada por duas famílias de genes *PR* (PR3 [*pathogenesis-related protein 3*] e PR4 [*pathogenesis-related protein 4*]) responsivos ao JA no ramo ERF (regulado pelo ET) em *Arabidopsis*, apontando evidências de

que as quitinases podem atacar a parede celular de vários organismos invasores em resposta à infecção (Lorenzo *et al.*, 2003).

Já no segundo padrão de expressão gênica, mais diferenciado, observou-se que os genes PR3 e PR4 foram majoritariamente induzidos em citrandarins pertencentes ao grupo S/MS, sugerindo que a maioria dos genótipos suscetíveis tentam combater o oomiceto expressando esses dois genes, mas isso não é suficiente para controlar a infecção e ter o desenvolvimento de uma menor lesão. Tal fato não foi verificado com os híbridos do grupo T/R, os quais predominantemente reprimiram tais genes (Figura 29). Os genótipos 22 e 169 induziram o gene PR3; já em relação ao PR4, valores de *Fold change* acima de 1 foram obtidos para os híbridos 206 e 279 (Figura 32). Ambos os genes (PR3 e PR4) codificam proteínas classificadas como quitinases, que atacam uma parede celular composta por quitina (geralmente em fungos), apresentando propriedades antifúngicas (Sels *et al.*, 2008). Por *P. parasitica* ser um oomiceto, mas apresentando grandes semelhanças com os fungos verdadeiros, possivelmente esses genes podem ser expressos em resposta à interação *Phytophthora*-citros.

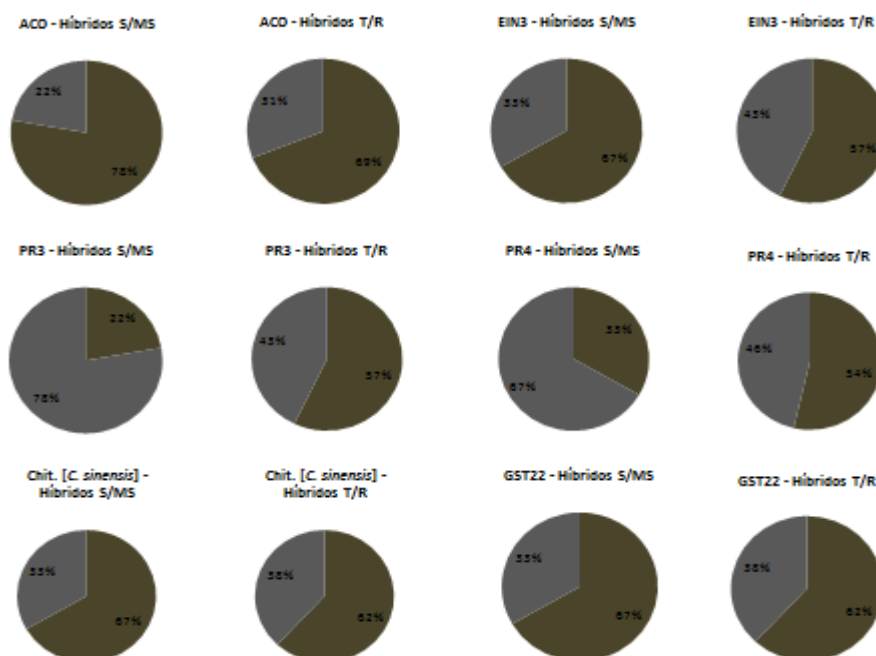
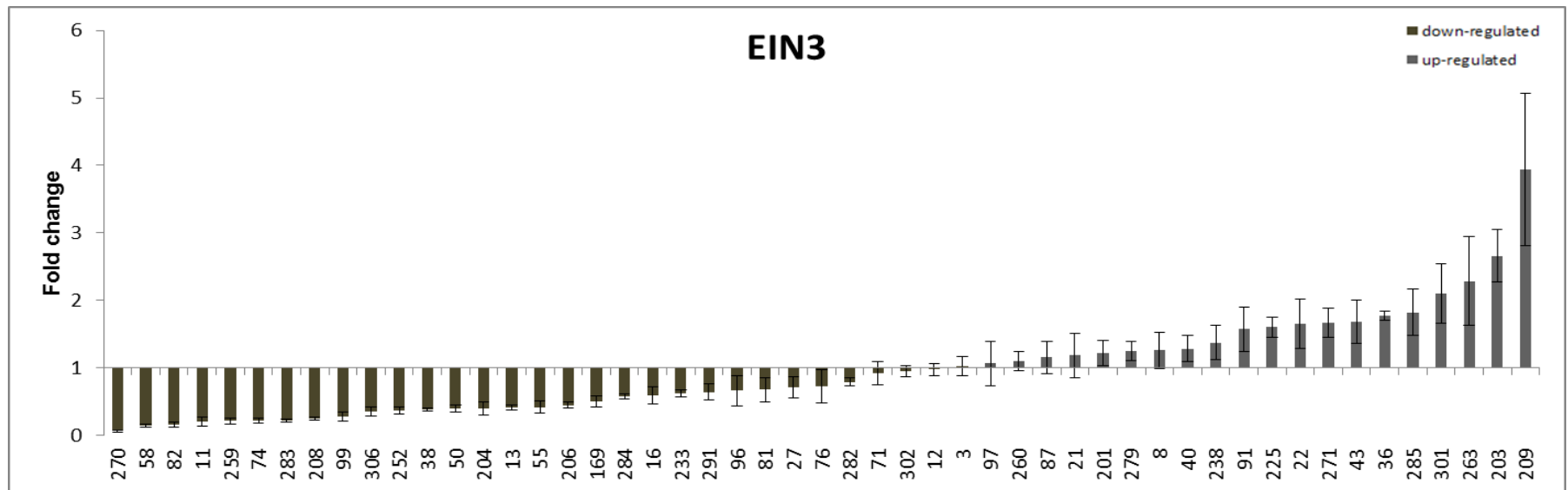
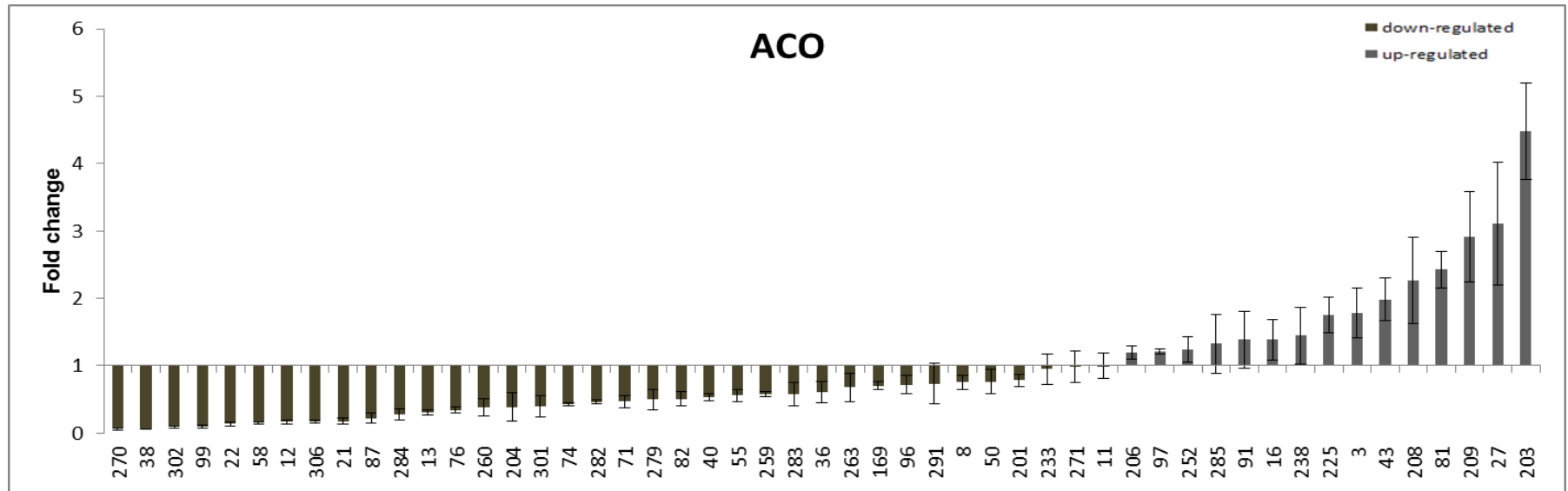
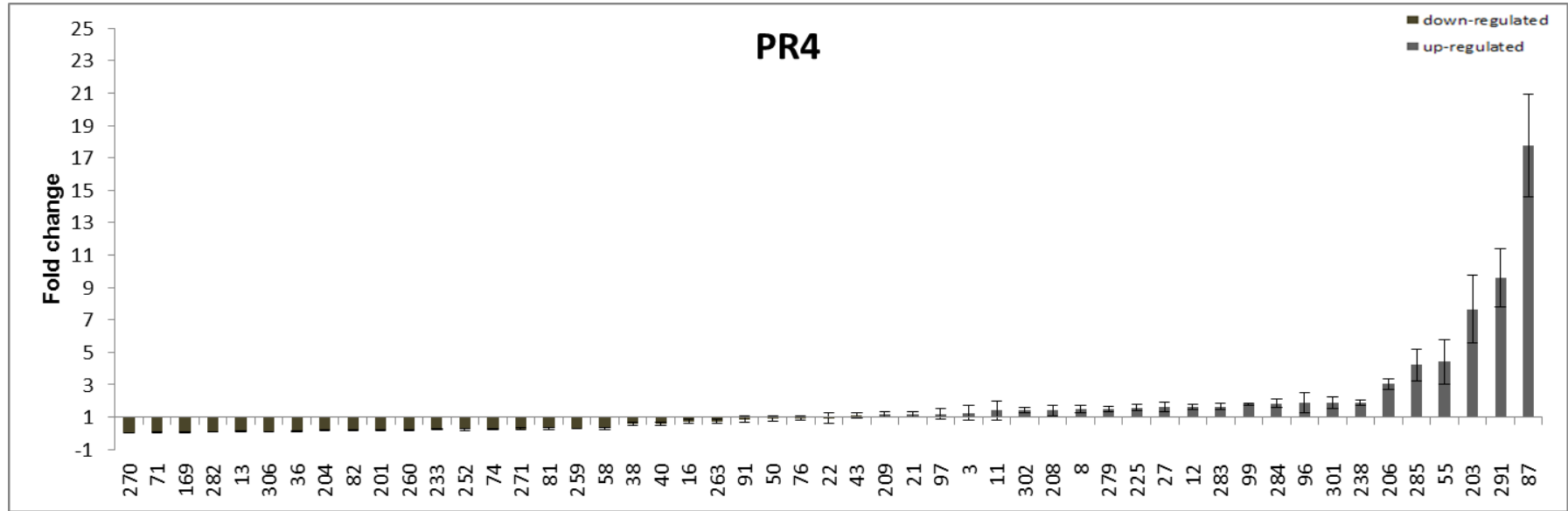
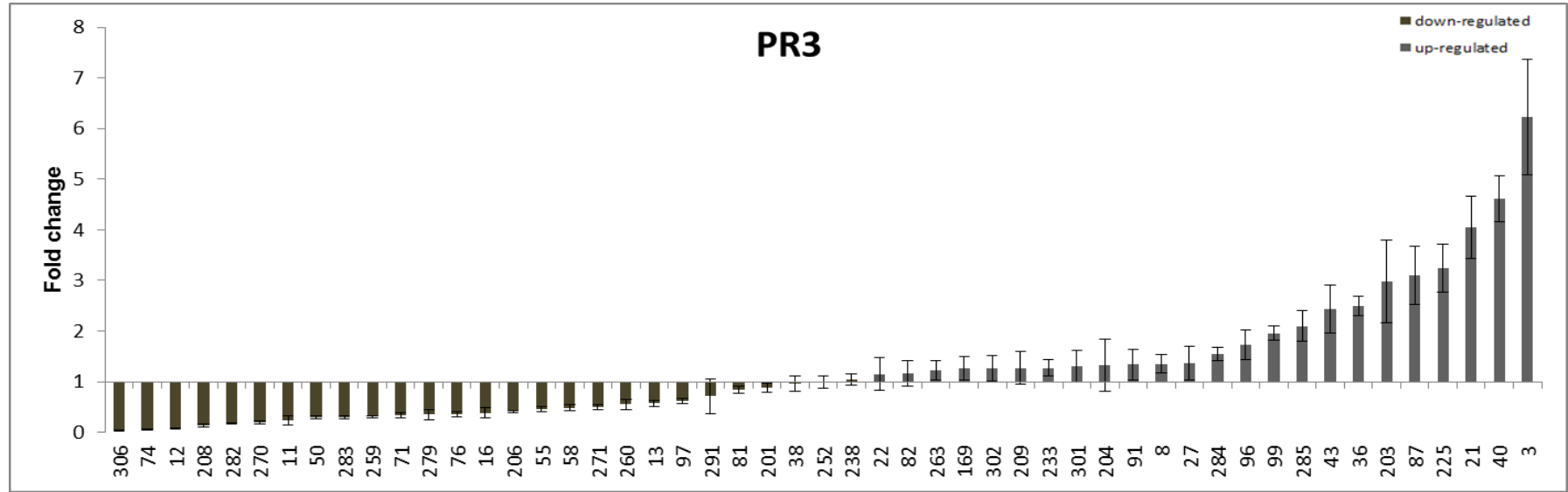


Figura 29. Percentual de híbridos de *Poncirus trifoliata* x *Citrus sunki* distribuídos em dois grupos, que apresentaram indução ou repressão de cada gene-alvo associado à via do ácido jasmônico e do etileno (JA/ET). Em marrom escuro e em cinza claro, *down-regulation* e *up-regulation*, respectivamente. S/MS = híbridos suscetíveis e/ou moderadamente suscetíveis; T/R = híbridos tolerantes e/ou resistentes.

Em relação aos padrões de expressão dos genes associados às vias do JA/ET, pôde-se constatar que todos os genes foram reprimidos na grande maioria

dos citrandarins, fato observado pela média geral dos 51 híbridos analisados para todos os genes ficar abaixo de 1 (negativa utilizando $\text{Log}_2\text{Fold change}$), indicando uma maior *down-regulation* (Figura 31). Dessa forma, inferências não puderam ser feitas sobre a herança genética de cada gene associado às vias do JA/ET, observando os dois genitores, devido a não se ter detectado nenhuma média geral que mostrasse uma maior *up-regulation* de algum gene na maioria dos híbridos de *P. trifoliata* x *C. sunki*; e isso indicar que a identificação de qual parental possivelmente transmitiu os alelos de resistência desses genes na progênie pelo padrão de expressão dos dois genitores, parece não surtir nenhum efeito em resposta à interação com *P. parasitica*. Portanto, outras análises estatísticas devem ser feitas para elucidar melhor o papel dos genes avaliados na via do JA/ET em resposta ao agente causador da gomose dos citros.





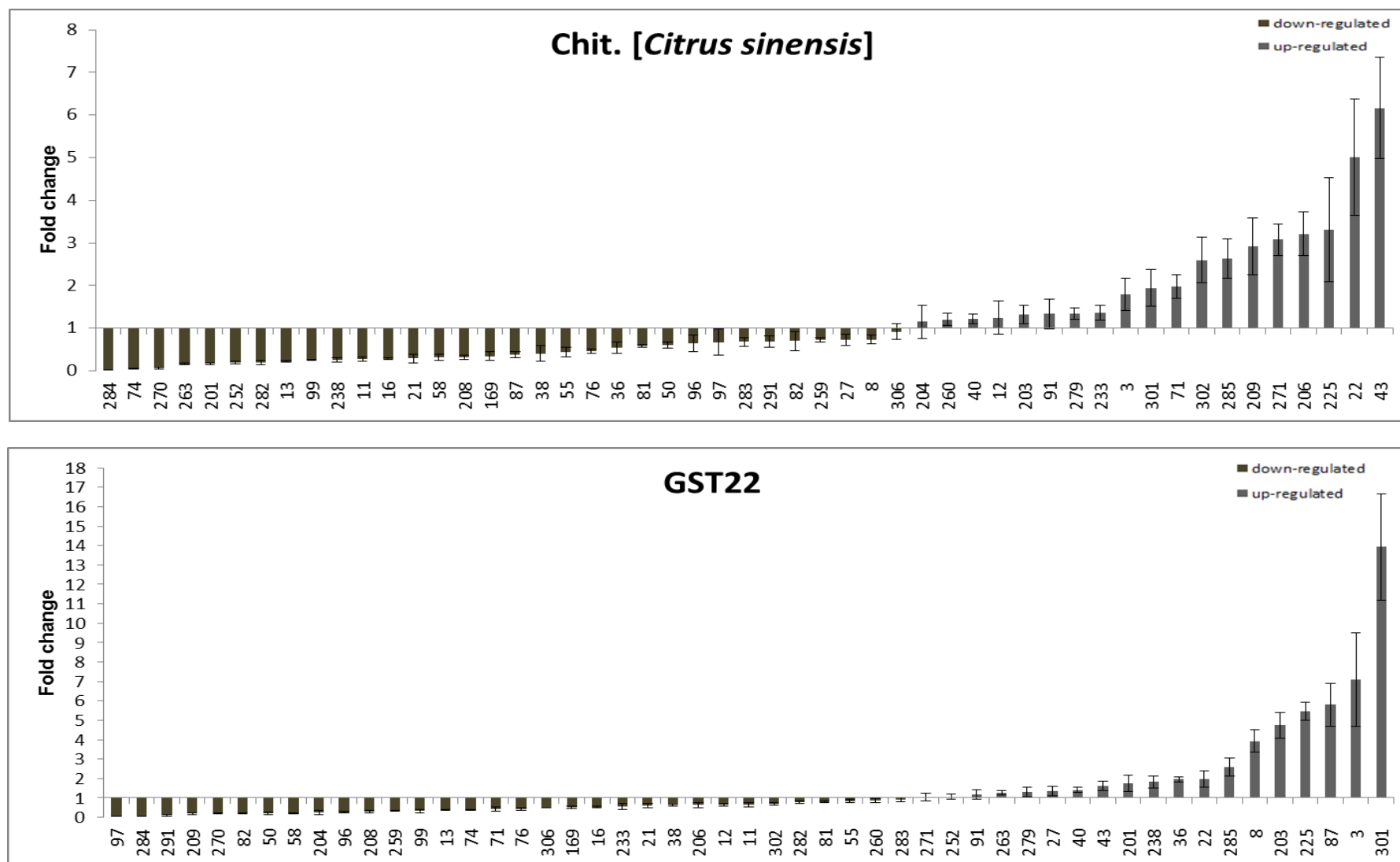


Figura 30. Padrões de expressão dos genes associados às vias do ácido jasmônico e do etileno (JA/ET) em híbridos de *Poncirus trifoliata* x *Citrus sunki*. Para todos os genes, foram calculados os valores de *Fold change* em relação às plantas controle não inoculadas (*Fold change* = 1). Em marrom escuro e em cinza claro, híbridos que apresentaram o gene-alvo reprimido (*down-regulated*) e induzido (*up-regulated*), respectivamente.

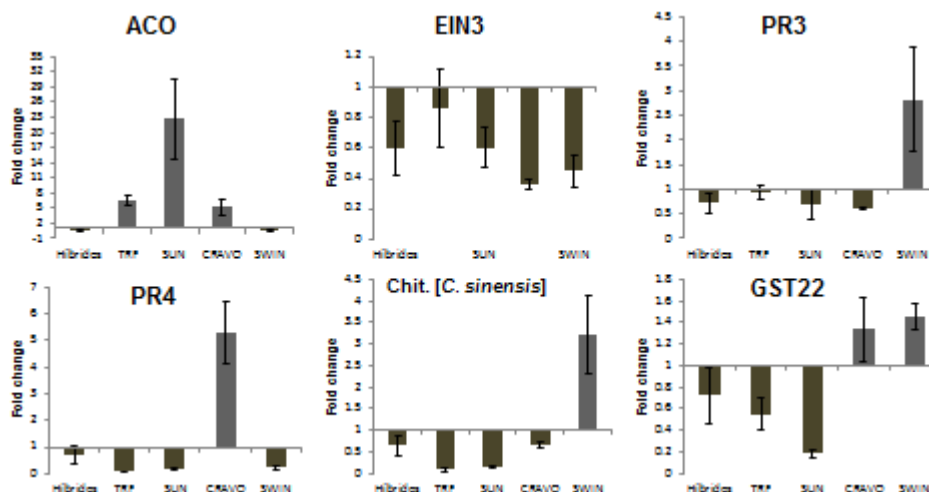


Figura 31. Padrões de expressão dos genes associados às vias do ácido jasmônico e etileno (JA/ET) com a média geral dos 51 híbridos analisados de *Poncirus trifoliata* x *Citrus sunki* em comparação aos dois genitores (TRF e SUN), o limão Cravo (CRAVO) e o citrumelo Swingle (SWIN). Em marrom escuro e em cinza claro, *down-regulation* e *up-regulation*, respectivamente.

Quanto aos outros dois porta-enxertos de referência também avaliados no presente estudo (limão Cravo e citrumelo Swingle), os genes ACO, PR4 e GST22 associados às vias do JA/ET se encontraram *up-regulated* para o suscetível limão Cravo, enquanto os genes PR3, Chitinase e GST22 para o resistente citrumelo Swingle (Figura 31). Tal fato demonstra que essas duas espécies de citros podem ativar diferentes mecanismos de defesa frente à infecção de *P. parasitica*.

5.6.4.3. Vias do JA/ABA

Em comparação às vias do JA/ET e principalmente do SA, constatou-se uma menor variação intra e intergrupos quanto à ativação das vias de sinalização do ácido jasmônico e ácido abscísico (JA/ABA) (Figura 32), com apenas um gene de defesa (ABF) parecendo desempenhar um maior papel frente à interação patógeno-hospedeira, quando se observa uma maior expressão gênica diferencial entre os citrandarins suscetíveis e resistentes (Figura 33). Em todos os três genes avaliados pertencentes às vias do JA/ET, pôde-se visualizar a indução por parte de alguns citrandarins tanto do grupo suscetível e/ou moderadamente suscetível (S/MS) quanto do tolerante e/ou resistente (T/R) (Figuras 32 e 33), indicando que apesar de nem todos os genótipos suscetíveis apresentarem uma *down-regulation*, assim como nem todos os resistentes apresentaram uma *up-regulation*, tais genes de certa forma estão sendo ativados como respostas de defesa à *P. parasitica*.

Apenas dois padrões de expressão gênica foram constatados nos genes avaliados das vias do JA/ABA. No primeiro, dois genes-alvo associados às vias do

JA/ABA (RPS4 e LEA5) mostraram um padrão de expressão gênica quando se observa a variação intergrupo, com a maioria dos citrandarins tanto do grupo T/R quanto do grupo S/MS reprimindo tais genes, enquanto uma minoria os induz, o que evidencia uma menor participação na resposta de defesa à *Phytophthora* (Figura 32). Entretanto, os dois genes parecem estar envolvidos de alguma maneira na resposta à *P. parasitica*, visto que alguns citrandarins resistentes, como o 22 e o 279, apresentaram valores de *Fold change* acima de 1 para o gene RPS4, indicando *up-regulation*; além do híbrido 22 também estar induzindo o gene LEA5 (Figura 33). O gene RPS4 codifica uma proteína R e parece está envolvido com a modulação da biossíntese de ABA em resposta à infecção de *Arabidopsis* com a bactéria *Pseudomonas syringae* (Mang *et al.*, 2012). Além disso, é proposto pela análise de expressão transiente de RPS4 em folhas de tabaco, que seu domínio TIR é importante para a indução de uma HR, causando morte celular (Zhang *et al.*, 2004).

Já no segundo padrão de expressão gênica, mais diferenciado, observou-se que o gene ABF possivelmente apresenta um maior papel frente à interação *Phytophthora*-citros, sendo igualmente induzido e reprimido em citrandarins pertencentes ao grupo T/R, a ponto de muitos genótipos resistentes tentarem combater o oomiceto pela expressão desse gene com êxito. Apesar disso, muitos híbridos suscetíveis também exercem sua indução em resposta à infecção por *P. parasitica*, mas isso não é suficiente para controlar a infecção e ter o desenvolvimento de uma menor lesão. Tal fato não foi verificado com os híbridos do grupo S/MS, os quais predominantemente reprimiram tais genes (Figura 32). O gene ABF faz parte de uma grande família de fatores de transcrição ABREs (*abscisic acid-responsive elements*), e atua na via *downstream* do ABA, induzindo a expressão de uma grande número de genes responsivos a esse fitormônio (Choi *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2014).

Em relação aos padrões de expressão dos genes associados às vias do JA/ABA, pôde-se constatar que todos os genes foram reprimidos na grande maioria dos citrandarins, fato observado pela média geral dos 51 híbridos analisados para todos os genes ficar abaixo de 1 (negativa utilizando $\text{Log}_2\text{Fold change}$), indicando uma maior repressão (Figura 34). Dessa forma, inferências não puderam ser feitas sobre a herança genética de cada gene associado às vias do JA/ABA, observando os dois genitores, devido a não se ter detectado nenhuma média geral que mostrasse maior superexpressão de algum gene na maioria dos híbridos de *P.*

trifoliata x *C. sunki*; e isso indicar que a identificação de qual parental possivelmente transmitiu os alelos de resistência desses genes na progênie, parece não surtir nenhum efeito em resposta à interação com *P. parasitica*. Portanto, outras análises estatísticas devem ser feitas para elucidar melhor o papel dos genes avaliados na via do JA/ABA em resposta ao agente causador da gomose dos citros.

Quanto aos outros dois porta-enxertos de referência também avaliados no presente estudo (limão Cravo e citrumelo Swingle), todos os genes associados às vias do JA/ABA, avaliados no presente trabalho, se encontraram *up-regulated* para o suscetível limão Cravo, enquanto apenas os genes ABF e RPS4 para o resistente citrumelo Swingle (Figura 34). Tal fato demonstra que essas duas espécies de citros podem ativar diferentes mecanismos de defesa frente à infecção de *P. parasitica*, e que os genes relacionados à via de sinalização do JA, pelo ramo MYC (regulado pelo ABA) parecem desempenhar importante papel para a resistência desses dois porta-enxertos em resposta a *P. parasitica*.

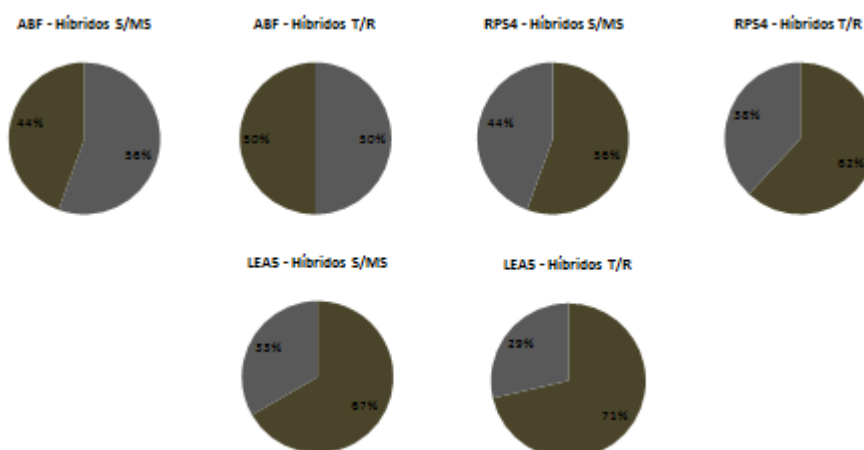
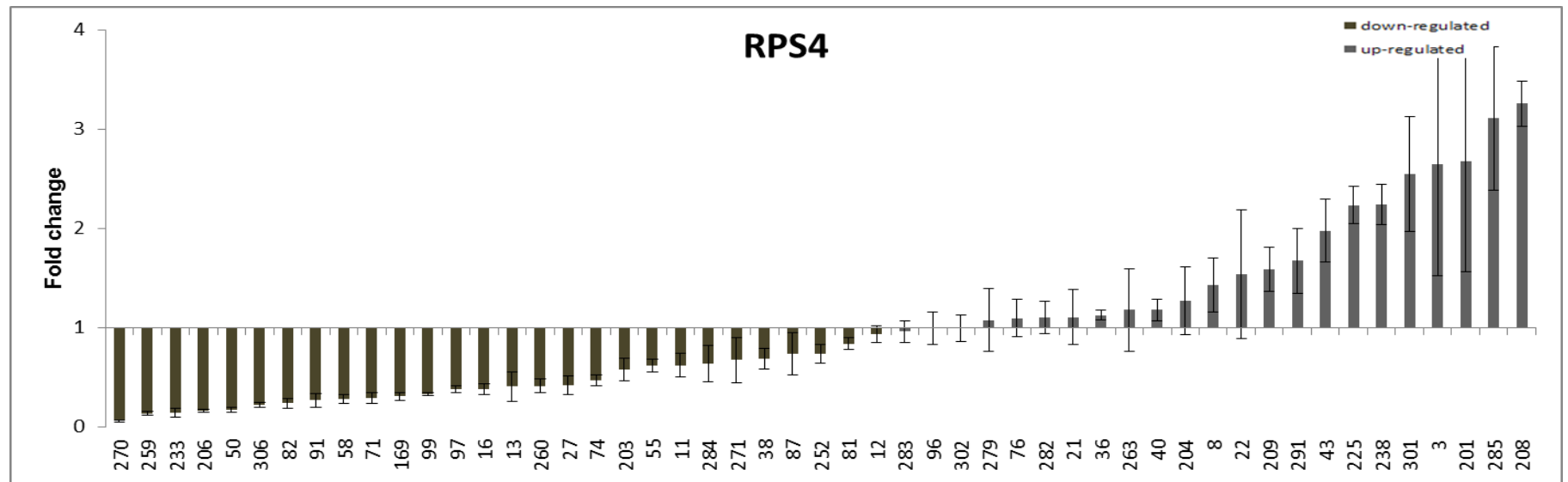
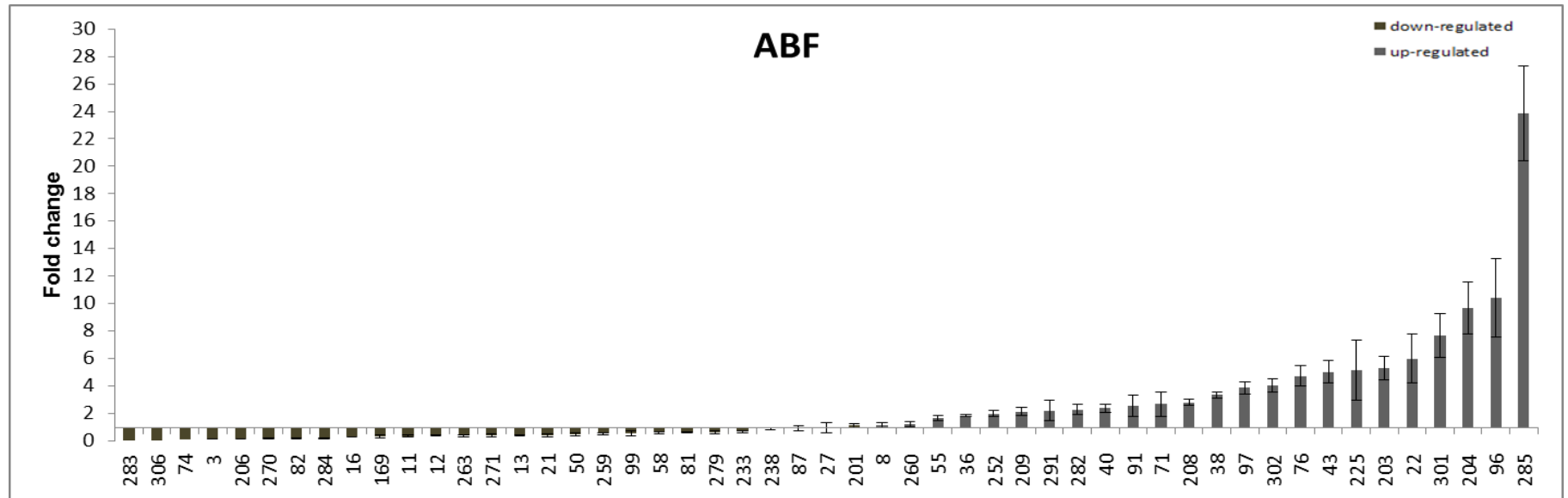


Figura 32. Percentual de híbridos de *Poncirus trifoliata* x *Citrus sunki* distribuídos em dois grupos, que apresentaram indução ou repressão de cada gene-alvo associado à via do ácido jasmônico e do ácido abscísico (JA/ABA). Em marrom escuro e em cinza claro, *down-regulation* e *up-regulation*, respectivamente. S/MS = híbridos suscetíveis e/ou moderadamente suscetíveis; T/R = híbridos tolerantes e/ou resistentes.



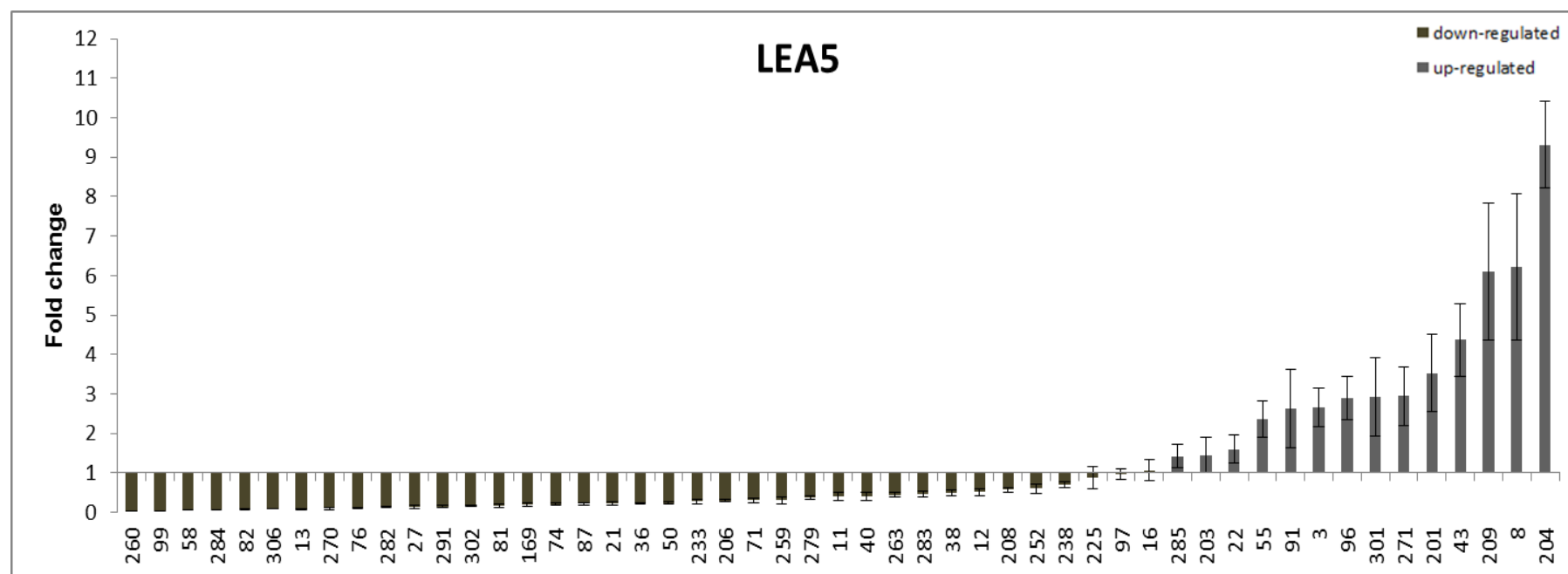


Figura 33. Padrões de expressão dos genes associados às vias do ácido jasmônico e do ácido abscísico (JA/ABA) em híbridos de *Poncirus trifoliata* x *Citrus sunki*. Para todos os genes, foram calculados os valores de *Fold change* em relação às plantas controle não inoculadas (*Fold change* = 1). Em marrom escuro e em cinza claro, híbridos que apresentaram o gene-alvo reprimido (*down-regulated*) e induzido (*up-regulated*), respectivamente.

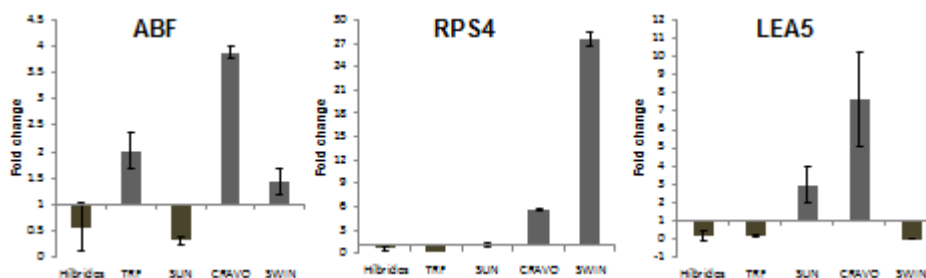


Figura 34. Padrões de expressão dos genes associados às vias do ácido jasmônico e ácido abscísico (JA/ABA) com a média geral dos 51 híbridos analisados de *Poncirus trifoliata* x *Citrus sunki* em comparação aos dois genitores (TRF e SUN), o limão Cravo (CRAVO) e o citrumelo Swingle (SWIN). Em marrom escuro e em cinza claro, *down-regulation* e *up-regulation*, respectivamente.

5.6.5. Teste de normalidade dos dados de expressão gênica

Na Figura 35, observam-se os resultados obtidos pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov (KS) para os valores de *Fold change* provenientes de seis genes-alvo escolhidos como representantes de cada via (dois de cada), com os dados transformados em logaritmo (base 2). Sendo assim, os resultados da expressão gênica relativa na população composta de *P. trifoliata*, *C. sunki*, dos 51 híbridos avaliados, do limão Cravo e do citrumelo Swingle atendem à expectativa de distribuição normal dos dados, sendo o valor estatístico *p-value* obtido pelo teste KS $> 0,150$ para 17 genes analisados, o que torna altamente significativo ($p \geq 0,01$ e $p \geq 0,05$) os valores de $\text{Log}_2\text{Fold change}$ e possibilita o desenvolvimento das análises comparativas seguintes. Apenas os genes PR2 e PR4 detiveram um menor *p-value* (0,038 e 0,077; respectivamente), mas pela visualização do QQ-plot pôde-se constatar quase o mesmo padrão de normalidade, sendo também significativo (com $p \geq 0,01$ para PR2 e $p \geq 0,05$ para PR4, assim como os demais).

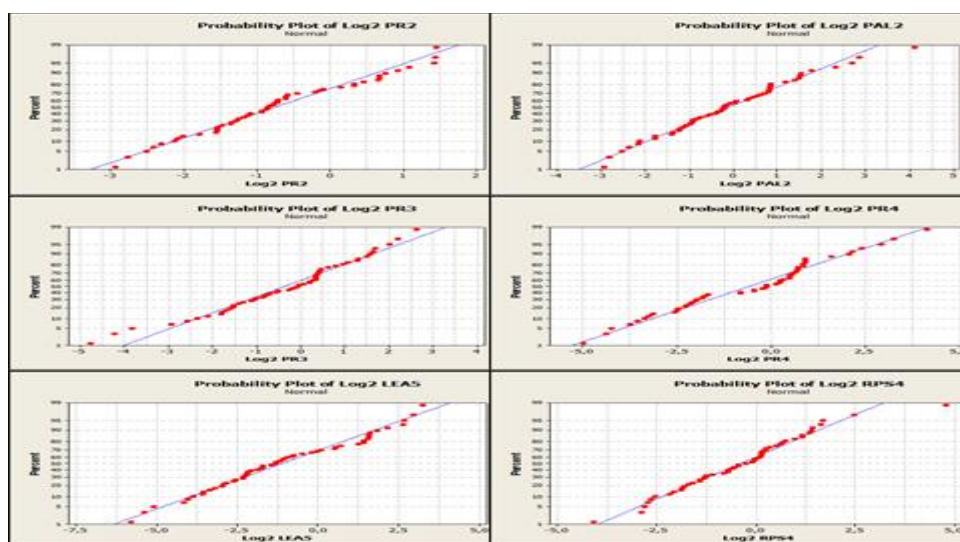


Figura 35. Seis QQ-plots obtidos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para dois representantes das vias do SA (PR2 e PAL2), JA/ET (PR3 e PR4) e JA/ABA (LEA5 e RPS4), mostrando a distribuição normal dos dados de $\text{Log}_2\text{Fold change}$, com a maioria dos pontos se sobrepondo à reta. O mesmo padrão foi observado para os demais genes.

5.6.6. ANOVA dos dados de expressão gênica entre os grupos fenotípicos

Os resultados do teste F (ANOVA: um critério) para análise de variância com os valores de $\text{Log}_2\text{Fold change}$ provenientes dos 19 genes-alvo na população de *P. trifoliata*, *C. sunki*, dos 51 híbridos avaliados, do limão Cravo e do citrumelo Swingle revelaram que apenas para cinco genes candidatos (EDS1, WRKY46, WRKY62, Chitinase e LEA5) houve uma diferença significativa entre os dois subgrupos de suscetibilidade (S e MS) e o grupo de resistência (T/R), que é traduzida no valor do *F-value*. Os genes EDS1, WRKY46 e LEA5 possuíram um menor valor F (0,0079; 0,0073 e 0,0022; respectivamente), sendo, portanto altamente significativo a 1% ($F \leq 0,01$), em comparação aos genes WRKY62 e Chitinase (0,0022 e 0,0495; respectivamente), com o registro de uma diferença significativa a 5% ($F \leq 0,05$).

Após a realização do teste F foi aplicado, para os cinco casos com diferença estatisticamente significativa, um teste *t de student* par-a-par, comparando as médias amostrais dos três grupos aos pares (Figura 36).

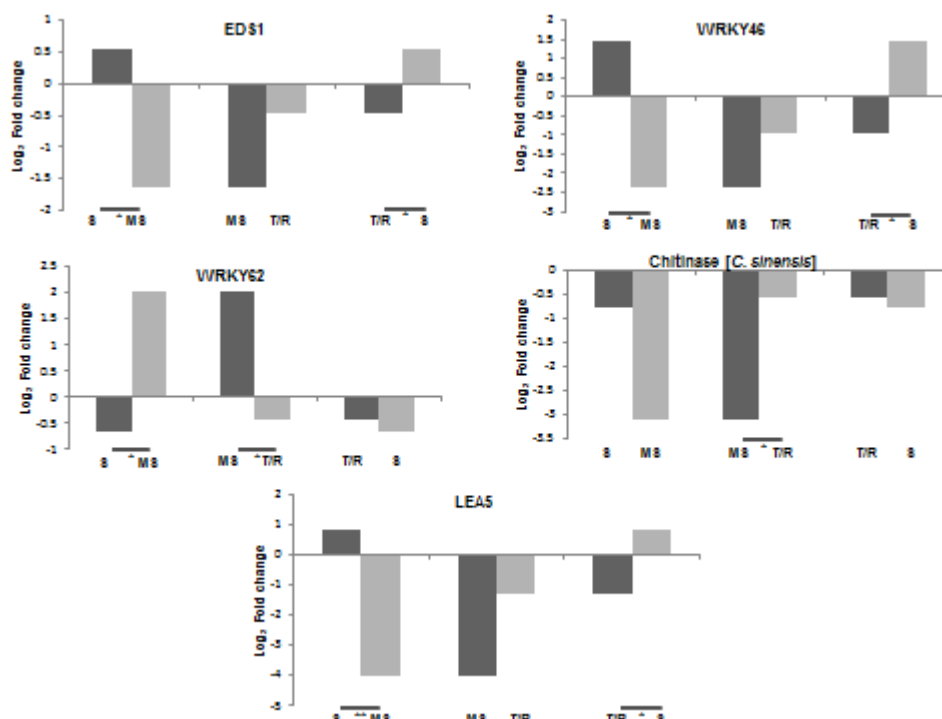


Figura 36. Teste *t de student* par-a-par, mostrando os padrões de expressão por agrupamento dos cinco genes em que houve uma diferença significativa pelo teste F. S = suscetíveis; MS = moderadamente suscetíveis; T/R = tolerantes e/ou resistentes. Estão representados os valores de $\text{Log}_2\text{Fold change}$ em relação ao controle não inoculado ($\text{Log}_2\text{Fold change} = 0$). * Diferença ($\alpha = 0,05$) entre os grupos aos pares. ** Diferença ($\alpha = 0,01$) entre os grupos aos pares.

Constataram-se três padrões de expressão por agrupamento. No primeiro, houve uma diferença significativa em apenas um par, composto pelos grupos MS

(moderadamente suscetíveis) e T/R (tolerantes e/ou resistentes) para o gene Chitinase. As médias desses dois grupos se mostraram como *down-regulated*, mas havendo uma maior repressão para o grupo MS. Dessa forma, dentro do grupo T/R encontram-se uma maior quantidade de híbridos que induziram esse gene, contribuindo para uma menor *down-regulation*. Além disso, o citrandarin 22, que obteve o menor comprimento da lesão, ficou em 2º lugar como exemplo de maior indução ($\text{Log}_2\text{Fold change} = 2,323$), sugerindo que alguns híbridos resistentes e/ou tolerantes possam expressar essa quitinase como resposta efetiva de defesa à *P. parasitica*. Segundo Punja & Zhang (1993), existem diferentes classes de quitinases vegetais a partir de critérios moleculares, bioquímicos e físico-químicos, as quais são expressas constitutivamente em níveis altos na planta em resposta a uma série de fatores abióticos e bióticos. Além disso, o mesmo autor afirmou que o nível de proteção é variável em plantas transgênicas que expressam genes clonados de quitinases em resposta a um patógeno fúngico.

Já no segundo padrão, duas diferenças significativas para o gene WRKY62 foram encontradas na comparação das médias de $\text{Log}_2\text{Fold change}$ entre dois pares: S (suscetíveis) e MS, bem como MS e T/R. Em relação à combinação S e MS, esse gene se encontrou induzido na maioria dos genótipos pertencentes ao grupo MS, fato demonstrado pela média ter se encontrado *up-regulated*, o que não foi observado na média dos genótipos inclusos no grupo S, a qual se mostrou *down-regulated*, evidenciando predominantemente a existência de híbridos S que reprimiram o gene WRKY62. Isso pode evidenciar uma pequena participação desse gene na resposta de defesa à *P. parasitica*, considerando que genótipos com comprimentos de lesão intermediários o expressam mais que outros com maior tamanho da área lesionada. Por outro lado, os resultados com a combinação MS e T/R indicam que os híbridos tolerantes e/ou resistentes de *P. trifoliata* x *C. sunki* parecem “hibernar” (entram em repouso) em resposta à infecção de *P. parasitica*, devido ao fato da média desse grupo se encontrar *down-regulated* e consequentemente menor que a do grupo MS, *up-regulated*. Assim, esses híbridos frente à infecção de *P. parasitica* parecem se comportar como seu genitor resistente *P. trifoliata* em relação ao estresse abiótico do frio, que ao entrar em repouso vegetativo geralmente durante o inverno e ser empregado como porta-enxerto, reduz sua atividade fisiológica na copa, aumentando sua resistência ao frio (Koller, 2013). Possivelmente ocorre uma menor hibernação em híbridos suscetíveis a *P. parasitica*,

fazendo com que induzam exageradamente genes associados à resposta de defesa contra a infecção numa tentativa de combater esse oomiceto, mesmo que seja sem êxito em virtude do aparecimento de uma maior lesão. Trabalhos afirmam que o fator de transcrição WRKY62 tem uma atuação diferente de outros membros da família WRKY, regulando negativamente a resposta mediada por SA e positivamente uma típica da PTI pela interação com um regulador também negativo da via *downstream* do SA, chamado HDA19 (*histone deacetylase 19*) (Kim *et al.*, 2008; Vlot *et al.*, 2009).

Em adição ao segundo padrão, foi detectado um terceiro, em que também houve duas diferenças significativas para três genes (EDS1, WRKY46 e LEA5) quando se comparou médias de $\text{Log}_2\text{Fold change}$ entre dois pares: S e MS, bem como T/R e S. No que diz respeito às duas combinações, esse gene se encontrou induzido na maioria dos genótipos pertencentes ao grupo S, fato demonstrado pela média ter se encontrado *up-regulated*, o que não foi observado nas médias dos genótipos inclusos nos grupos MS e T/R, a qual cada uma se mostrou *down-regulated*, evidenciando predominantemente a existência de híbridos MS e T/R que reprimiram os genes EDS1, WRKY46 e LEA5. Isso reforça o fato de que possivelmente os híbridos tolerantes e/ou resistentes de *P. trifoliata* x *C. sunki* entram num estado de “hibernação” em resposta ao oomiceto *P. parasitica*, e que as plantas suscetíveis detêm uma maior lesão provavelmente por causa dessa reação exagerada de induzir genes de defesa associados às vias do SA, JA/ET e JA/ABA.

Talvez citrandarins resistentes ativem outros mecanismos de defesa, como a produção de ROS e fitoalexinas, que os suscetíveis não conseguem induzir, sendo suficiente para conter o avanço de *P. parasitica*. Na literatura, é descrito que a resistência para fungos patogênicos pertencentes ao gênero *Verticillium*, que atacam a cultura do tomate, envolve uma resposta mais basal e inespecífica, com as plantas resistentes produzindo deposições (calose, entre outros) nas paredes celulares e também sintetizando substâncias antimicrobianas como as fitoalexinas (Fradin & Thomma, 2006). Além disso, estudos prévios utilizando a técnica de microarranjos e RT-qPCR para avaliar a expressão gênica diferencial em variedades de tomate suscetíveis e resistentes a isolados de *Verticillium dahliae*, identificaram genes induzidos ao patossistema, como aqueles que codificam proteínas PR; e encontraram uma maior indução, bem como um maior número de genes diferencialmente expressos em plantas suscetíveis ao patógeno, ou seja, nas

interações compatíveis. Dessa forma, esses resultados indicam que o aumento da expressão gênica a nível sistêmico em plantas suscetíveis não as protegem, e que possivelmente essa reação exagerada e indutora possa desencadear os sintomas da doença (Robb *et al.*, 2007; Van Esse *et al.*, 2009; Robb *et al.*, 2012). O gene LEA5, além de desempenhar importante papel na resistência a estresses abióticos, também pode estar relacionado em respostas de defesa frente à infecção de patógenos, sendo responsivo ao aumento dos níveis de JA e ABA (Amara *et al.*, 2014). E o fator de transcrição WRKY46, assim como o WRKY70, atua como regulador positivo da via de sinalização do SA (Hu *et al.*, 2012). Já o gene EDS1, atua na via *upstream* de SA e consequentemente na sua biossíntese a partir de uma resposta desencadeada por efetores (Glazebrook, 2001; Dempsey *et al.*, 2011).

5.6.7. Análises de correlação linear de Pearson

Na Tabela 9, são apresentados os resultados das análises de correlação linear de Pearson por agrupamento para cada gene-alvo avaliado, na tentativa de observar o grau de envolvimento entre os dados fenotípicos de lesão e os valores de expressão gênica e assim inferir sobre quais genes podem apresentar um maior papel na resposta de defesa frente ao patossistema *Phytophthora*-citros. Inferências podem ser feitas apenas quando se observa um *p-value* significativo, visto que as variáveis são estatisticamente dependentes. Assim, as correlações que mostraram um *p-value* significativo com um valor de *r* (Pearson) positivo permitem concluir que há uma relação linear positiva entre os dados de CL_R transformados em Log (base 10) (eixo y) e os valores de Log₂*Fold change* (eixo x), ou seja, são diretamente proporcionais (quanto maior for o valor da expressão relativa para um dado gene, maior será o tamanho da lesão). Tais resultados estabelecem que quanto mais um genótipo induz a expressão daquele gene, caracterizando uma reação exagerada a *P. parasitica*, isso contribui para o desenvolvimento de uma maior área lesionada seja em híbridos suscetíveis ou resistentes. Já as correlações que apresentaram um *p-value* significativo com um valor de *r* (Pearson) negativo indicam uma relação linear negativa, demonstrando uma força atrativa inversamente proporcional (quanto maior for o valor da expressão relativa para um dado gene, menor será o tamanho da lesão). Dessa forma, a detecção de genes que demonstram possuir um maior relacionamento com os dados fenotípicos da lesão pelo valor da correlação de Pearson negativa, seja nos genótipos pertencentes ao grupo S/MS ou T/R, permitem inferir que participam na resposta de defesa à infecção ocasionada por *P. parasitica*.

O valor r (Pearson) sugere a força da relação entre as variáveis, variando de -1 a 1, com valores geralmente entre 0 a 0,4 sendo considerados fracos; escores entre 0,4 a 0,6 demonstrando uma correlação moderada; e resultados entre 0,6 a 1 considerados fortes. De qualquer maneira, o certo é que quanto mais próximo de 1 for o valor de r (Pearson), maior é a dependência estatística observada pela relação linear entre as variáveis (Moore, 2007).

Tabela 9. Correlações de Pearson por agrupamento para os 19 genes candidatos avaliados, com os valores do coeficiente de correlação r (Pearson) e do p -value.

Genes	Grupo S ¹		Grupo T/R ²	
	r (Pearson)	p -value	r (Pearson)	p -value
PAL2	0,0285	0,9337	-0,0513	0,7409
EDS1	-0,0422	0,9019	-0,0229	0,8826
NPR3	-0,6569	0,028*	-0,1894	0,2181
WRKY70	-0,5211	0,0452*	-0,1787	0,2457
WRKY46	-0,307	0,3584	-0,0815	0,5988
WRKY62	-0,329	0,3231	0,0371	0,8112
SGT1b	0,4299	0,0486*	-0,047	0,7621
BSMT1	0,2215	0,5127	-0,1604	0,2982
PR2	-0,4614	0,0485*	0,0245	0,8743
MKP1	-0,1099	0,7477	0,0459	0,7672
ACO	-0,1281	0,7074	-0,2315	0,1304
EIN3	0,4122	0,0495*	0,0541	0,7273
PR3	0,0658	0,8475	-0,0167	0,9146
Chit. [<i>C. sinensis</i>]	0,0749	0,8268	0,2629	0,0845
PR4	-0,6193	0,0421*	0,0017	0,9912
GST22	-0,0695	0,8392	0,1687	0,2736
ABF	-0,2876	0,391	-0,2854	0,0603
RPS4	-0,505	0,0491*	0,139	0,368
LEA5	-0,0626	0,8549	-0,4573	0,0172*

¹S=suscetíveis e moderados suscetíveis; ²T/R= tolerantes e/ou resistentes; *valor do p -value < 0,05 (significativo)

Os genes NPR3, WRKY70, SGT1b, PR2, PR4 e RPS4 apresentaram um p -value significativo e um valor de r (Pearson) negativo apenas para o grupo S, o que corrobora para o fato de que quanto maior for o valor da expressão relativa (*Fold change*) nos genótipos suscetíveis, menor será o comprimento da lesão, a qual já é elevada nesses indivíduos. Isso leva a inferir, juntamente com os gráficos desenvolvidos a partir das correlações significativas (Figura 37), que esses genes tenham uma menor participação no combate à *P. parasitica*, já que são expressos predominantemente em plantas suscetíveis que apresentam uma menor lesão. Vale

ressaltar o maior valor r (Pearson), que foi igual a -0,6569, encontrado para o gene NPR3, evidenciando uma correlação forte (Tabela 9). Esse gene é descrito na literatura como sendo parálogo ao NPR1, principal regulador da via *downstream* do SA, e a ligação de seu produto proteico com a proteína monomérica NPR1 resulta na ativação de genes de defesa, a partir dos níveis altos de SA (Moreau *et al.*, 2012).

Já o gene LEA5 apresentou um p -value significativo e um valor de r (Pearson) negativo apenas para o grupo T/R, demonstrando que quanto maior for o valor da expressão relativa (*Fold change*) nos genótipos tolerantes e/ou resistentes, menor será o comprimento da lesão, a qual já é relativamente baixa nesses indivíduos. Pode-se inferir, então, que esse gene tenha uma maior participação frente à infecção causada por *P. parasitica*, já que as plantas resistentes que tenham uma menor lesão predominantemente o induzem. Apesar de ter apresentado uma correlação não muito forte (moderada), fato demonstrado pelo valor de r ser igual a 0,4573 (Tabela 9; Figura 37); é um indício de que esse gene pode atuar na resistência contra o agente causador da gomose dos citros. Esse gene foi encontrado diferencialmente expresso pela técnica de microarranjos entre o *P. trifoliata* (resistente), o *C. sunki* (suscetível) e em alguns híbridos, de modo a ser um forte candidato na resistência à *Phytophthora* (Boava *et al.*, 2011b).

Em contrapartida, foi observado para o gene EIN3 um p -value significativo e um valor de r (Pearson) positivo apenas para o grupo S, dando indícios de que quanto maior for o valor da expressão relativa (*Fold change*) nos genótipos suscetíveis, maior será o comprimento da lesão, a qual já é elevada nesses indivíduos. Apesar da correlação ter se mostrado moderada ($r=0,4122$) (Tabela 9; Figura 37), isso pode indicar que o aumento da expressão desse gene em indivíduos suscetíveis favorece ao aparecimento de sintomas da gomose dos citros. Sabe-se que o gene EIN3 atua como um importante regulador da via *downstream* do ET, promovendo uma série de respostas de defesa que resulta na expressão de genes responsivos a esse fitormônio gasoso (Konishi & Yanagisawa, 2008; Pieterse *et al.*, 2012).

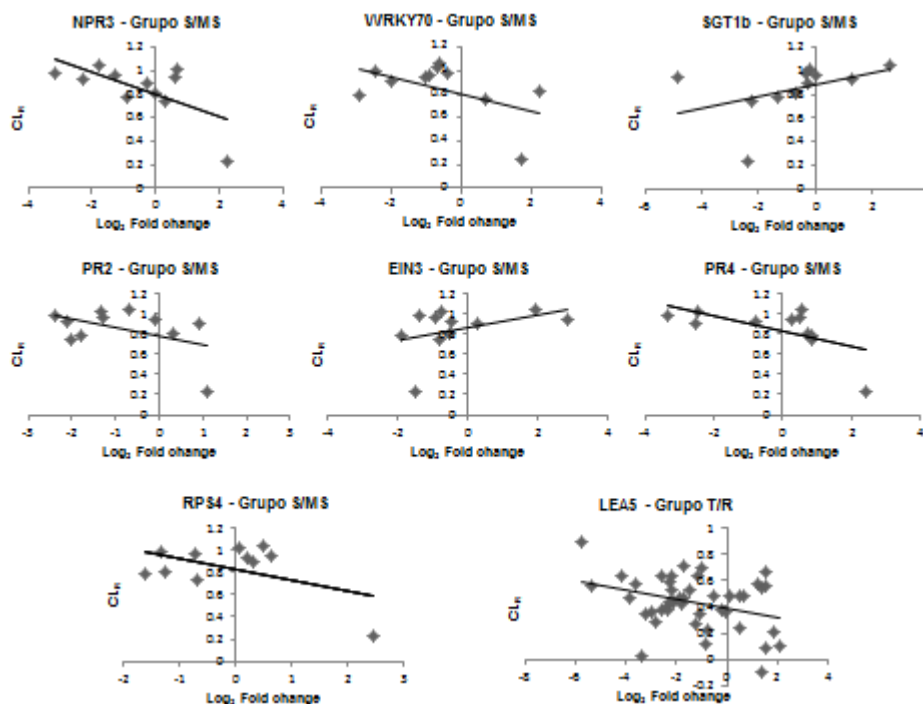


Figura 37. Gráficos de correlação linear de Pearson entre os valores de $\text{Log}_2 \text{Fold change}$ (dados de expressão gênica) e os dados fenotípicos da lesão (CL_R) por agrupamento para os genes com p -value significativo. O mesmo padrão não foi observado para os demais casos.

5.6.8. Perfil de expressão gênica global do experimento e matriz de dissimilaridade entre os genes

O *heatmap* (Figura 37), a partir da análise comparativa feita pelo teste de agrupamento hierárquico (HCL – *Hierarchical clustering*) dos 19 genes-alvo avaliados com os 55 genótipos selecionados (51 híbridos, seus dois genitores, o limão Cravo e o citrumelo Swingle), permitiu a ordenação dos genes e amostras mais relacionados, isto é, com perfis de expressão gênica similares, utilizando a correlação de Pearson como distância métrica para a obtenção do melhor agrupamento intra e intervariáveis possível. Os genótipos foram separados em cinco *clusters* secundários distribuídos em dois principais, enquanto os genes em três secundários dispostos em dois principais. Dessa forma, houve uma maior variação nos valores de $\text{Log}_2 \text{Fold change}$ dentro dos indivíduos amostrados do que nos genes. A análise de agrupamento pode ser utilizada para agrupar tanto genes quanto amostras pela similaridade de seus perfis de expressão, contribuindo para a identificação de relações funcionais entre os genes e revelando diferentes mecanismos biológicos para a manifestação do fenótipo em análise. A visualização dos dados compreende um critério fundamental na análise de agrupamento e no estudo da genética genômica, podendo ser feito pelo *heatmap*, que constitui numa

representação gráfica da matriz de dados contendo uma escala de cores reveladora da distribuição dos dados. As linhas e colunas representam ordenadas, a ponto de valores similares aparecerem próximos. Os agrupamentos hierárquicos (dendrogramas) das linhas e colunas são mostrados nas margens do gráfico, promovendo uma intrínseca rede hierárquica das duas ordenadas por uma série de ramificações, que refletem a similaridade das linhas e colunas (Wit & McClure, 2004; Brun *et al.*, 2005).

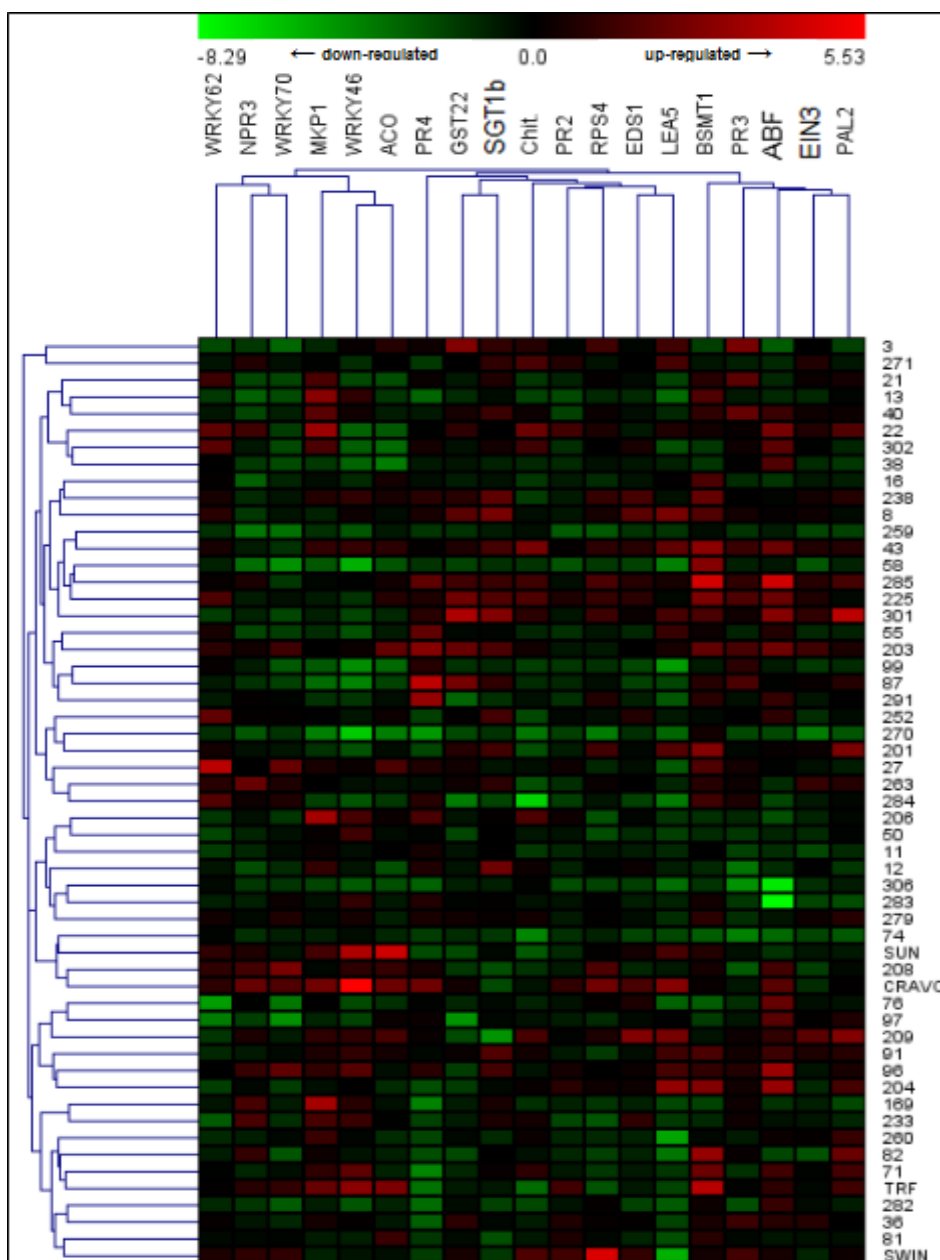


Figura 38. Heatmap do perfil de expressão gênica global pela análise de agrupamento entre os 19 genes-alvo avaliados com os 55 genótipos selecionados (51 híbridos, o trifoliata Rubidoux [TRF], a tangerina Sunki [SUN], o limão Cravo [CRAVO] e o citrumele Swingle [SWIN]).

A escala de cores representando os valores dos dados de $\text{Log}_2\text{Fold change}$ permitiu observar que os dados de expressão gênica variaram de -8,29 a 5,53.

Dessa forma, os genes com um padrão global de expressão mais vermelho, como o BSMT1 e o SGT1b, foram predominantemente expressos na população do experimento, ou seja, mais *up-regulated*. Tais genes fazem parte do metabolismo de SA e podem, então, ter uma maior participação na resistência dessa população à *P. parasitica*. Por outro lado, os genes com um padrão global de expressão mais verde significa dizer que a grande maioria dos híbridos em conjunto com os quatro porta-enxertos analisados os reprimiu, ou seja, foram mais *down-regulated*. Pôde-se observar que apenas um gene se enquadrou nessa categoria, que foi o EIN3, importante regulador da via *downstream* do ET, indicando que talvez não interfira na resposta de defesa dos diferentes fenótipos avaliados a *P. parasitica*.

Em relação aos genótipos, constatou-se que os porta-enxertos tangerina Sunki e limão Cravo, descritos na literatura como suscetíveis a *Phytophthora*, ficaram mais próximos (mesmo *cluster*), evidenciando um perfil de expressão gênica global similar. Fato semelhante aconteceu para o trifoliata Rubidoux e o citrumelo Swingle, que são resistentes ao oomiceto causador da gomose dos citros. Além disso, constatou-se que os híbridos 43, 285, 225 e 203, pertencentes ao grupo T/R e a um mesmo *cluster* no *heatmap*, tiveram uma maior *up-regulation* dos 19 genes-alvo avaliados, induzindo fortemente muitos genes (como BSMT1, ABF, entre outros) e até mesmo fracamente o EIN3. Constituem, então, materiais promissores para o entendimento da resistência à *P. parasitica*, podendo ser selecionados para futuras pesquisas relacionadas à gomose dos citros.

Por outro lado, indivíduos tolerantes e/ou resistentes, como os de numeração 270, 306 e 283 (esses dois últimos inclusos no mesmo *cluster*) reprimiram majoritariamente os genes candidatos (maior *down-regulation*), sugerindo que sejam tolerantes e desenvolvem outros mecanismos de defesa frente à infecção ocasionada por *P. parasitica*, o que contribui para a herança da gomose dos citros ser caracterizada como uma resposta inespecífica. Já com relação aos híbridos do grupo S, inferências também podem ser feitas quando se observa, por exemplo, os genótipos de numeração 11 e 99, que apresentaram a maioria dos genes *down-regulated*, evidenciando que são materiais realmente propensos a ter baixa resistência a *P. parasitica*. Paralelamente, muitos híbridos suscetíveis (8, 204, 209, 40, 13, 27 e 284) ora reprimem alguns genes, ora induzem outros genes, sendo localizados em *clusters* diferentes, contribuindo para a ideia de que diferentes mecanismos de defesa associados aos fitormônios vegetais podem ser

estabelecidos frente à infestação do agente causador da gomose na planta. Portanto, a característica comprimento da lesão associada à herança da gomose dos citros é bastante complexa, podendo ser controlada pela indução e repressão de vários genes e envolvendo tanto genética quanto ambiente, como é citada na literatura (Boava, 2004a; Medina Filho, 2003; Siviero *et al.*, 2002a).

Outro *heatmap* (Figura 39) foi construído para se ter uma análise mais acurada da relação apenas entre os genes-alvo candidatos, a partir de uma matriz de dissimilaridade, que utiliza como distância métrica a medida chamada de Distância Euclidiana, permitindo observar o grau de diferença entre os genes num intervalo de 0 a 1. A Distância Euclidiana é amplamente usada como parâmetro para se investigar o quanto um objeto difere do outro, sendo eficiente para avaliar a divergência intravariável (Mingoti, 2005).

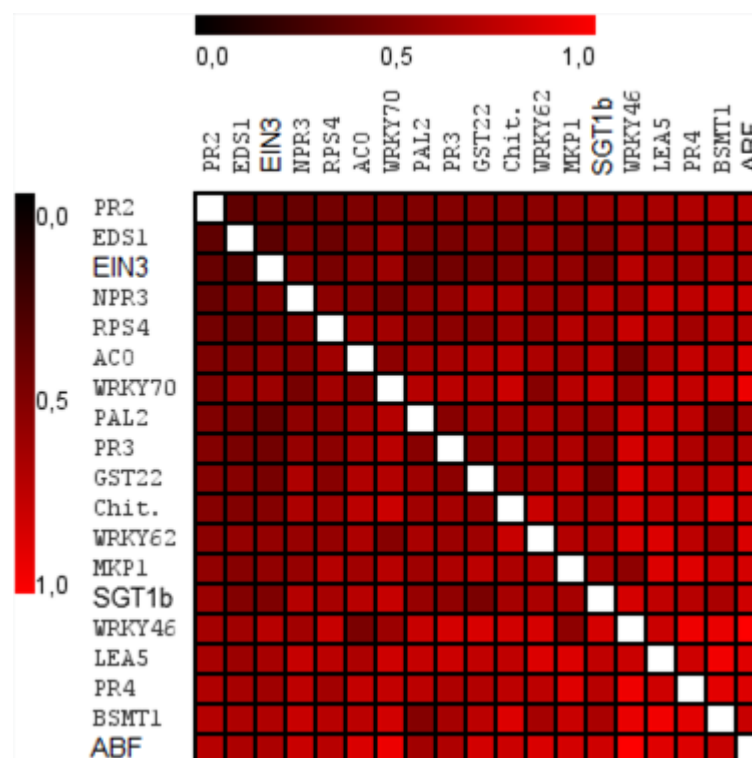


Figura 39. *Heatmap* representando a matriz de dissimilaridade global entre os 19 genes-alvo avaliados a partir da comparação par-a-par dos genes utilizando a Distância Euclidiana.

Quanto mais escura a coloração, mais intensa será a interação entre dois genes, demonstrando uma maior congruência entre as expressões. Sendo assim, menores distâncias foram observadas entre os genes PR2 e EDS1, os quais fazem parte da mesma via de sinalização, que é a do SA, com o EDS1 atuando na biossíntese desse fitormônio e o PR2 consistindo num gene de defesa responsivo ao acúmulo de SA (Vlot *et al.*, 2009). Por serem dois genes relacionados à resistência a

patógenos, existe uma maior relação entre suas expressões na possível defesa contra *P. parasitica*. Entretanto, quanto mais vermelha for a coloração, mais distantes os genes serão, o que denota uma menor congruência das expressões par-a-par. Pôde-se constatar que três genes (BSMT1, PR4 e ABF) em associação com o gene WRKY46 obtiveram as maiores distâncias, num padrão bem mais intenso de coloração. Sabe-se que WRKY46 é um fator de transcrição pertencente à grande família WRKY, e que atua como regulador positivo da via do SA, mais precisamente na via *downstream*. O gene BSMT1 é conhecido por fazer parte do metabolismo de SA, convertendo esse fitormônio em MeSA, e funciona como um sinal de defesa para a expressão de genes de defesa dependentes de JA. O gene PR4 codifica uma quitinase (proteína PR) que é ativada pela via do JA no ramo ERF, contribuindo para a sinergia existente entre as vias do JA/ET. Já o gene ABF é essencial na regulação *downstream* da via do ABA, induzindo a expressão de um grande número de genes de defesa responsivos a esse hormônio gasoso (Choi *et al.*, 2000; Lorenzo *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2012). Dessa forma, há uma menor relação entre suas expressões quando se avalia a resposta específica de resistência ao agente causador da gomose dos citros.

5.6.9. Análise e mapeamento de eQTLs

Com a obtenção dos dois mapas genéticos construídos para os genitores da progênie dos citrandarins e de acordo o perfil de expressão gênica global, construído a partir dos valores de expressão relativa ($\text{Log}_2\text{Fold change}$) entre os 19 genes-alvo avaliados com os 51 híbridos selecionados, foi possível detectar eQTLs que atuam no processo de expressão gênica em resposta à infecção ocasionada por *P. parasitica*. Foram considerados eQTLs consistentes apenas aqueles que apresentaram LOD score crítico superior ou igual a 3,0 pelo teste de permutação aleatória para cada gene analisado, com um intervalo de confiança de 95%.

Assim como para o mapeamento de QTLs, a detecção de possíveis eQTLs foi feita para ambos os genitores em seus respectivos mapas, devido ao uso da estratégia *pseudo-testcross* com a segregação somente de marcadores 1:1. De acordo a metodologia do mapeamento por intervalo composto (CIM), foi detectado um total de 164 eQTLs com o pico do LOD $\geq 3,0$ e com resultado significativo por meio do teste de 1000 permutações no *software* FullsibQTL, sendo 74 para o mapa completo de *P. trifoliata*, com média de aproximadamente quatro eQTLs por gene; e

90 para o mapa completo de *C. sunki*, com média de aproximadamente cinco eQTLs por gene. Todos os genes-alvo possuíram pelo menos um eQTL associado à sua expressão tanto no mapa do trifoliata Rubidoux quanto no mapa da tangerina Sunki. Em virtude do alto número de eQTLs detectados, segundo Shi *et al.* (2007), um alto poder de detecção de eQTLs pode ser encontrado mesmo em pequenas populações. Além disso, como a metodologia estabelecida pelo *software* para o mapeamento de QTLs é similar ao mapeamento de eQTLs, um tamanho populacional maior que 50 já é suficiente para proporcionar alta resolução à prática de mapear e detectar QTLs/eQTLs de pequeno efeito. Quanto maior for o tamanho da população, a saturação do mapa genético de ligação e a herdabilidade do caráter fenotípico, maior será a informação genômica relacionada ao mapeamento (Young, 1994; Cruz, 2006; Yan *et al.*, 2009). Como foi averiguada uma herdabilidade alta (65%) para a característica CL_R no presente estudo, uma alta saturação dos dois mapas de cada genitor e sendo a população de híbridos selecionados para o mapeamento de eQTLs igual a 51, era de se esperar um grande volume de eQTLs a partir dos perfis de expressão gênica diferencial para cada gene candidato via RT-qPCR.

Os genes PR4, PR3, Chitinase e PAL2 foram os que apresentaram um maior número de eQTLs no mapa do genitor *P. trifoliata*, cada um com seis (Figura 40); enquanto no mapa de *C. sunki*, houve um maior número também para os genes PR4 e Chitinase, além de MKP1, totalizando cada um sete eQTLs (Figura 41). Desse jeito, genes de defesa responsivos às vias de JA/ET, como aqueles que codificam classes de enzimas denominadas quitinases, que degradam parede celular (Van Loon & Van Strien, 1999), detiveram um maior número de regiões cromossômicas tanto no mapa do trifoliata Rubidoux quanto no da tangerina Sunki que afetam seus níveis de transcrição em resposta à infecção causada por *P. parasitica*. Por outro lado, o gene EDS1 foi o que se constatou um menor número (apenas um eQTL), ficando muito abaixo da média de eQTLs por gene nos dois mapas. Um dos principais reguladores da via *upstream* de sinalização do SA, esse gene age de forma a promover a biossíntese de SA devido a uma imunidade induzida por efetor (ETI) (Dempsey *et al.*, 2011). Esse gene talvez não tenha tanta participação na resposta de defesa pela interação *Phytophthora*-citros, fato explicado pelo seu padrão de expressão e pela menor quantidade de regiões genômicas dos dois

genitores contrastantes, responsáveis pela variação de sua expressão gênica na progênie segregante.

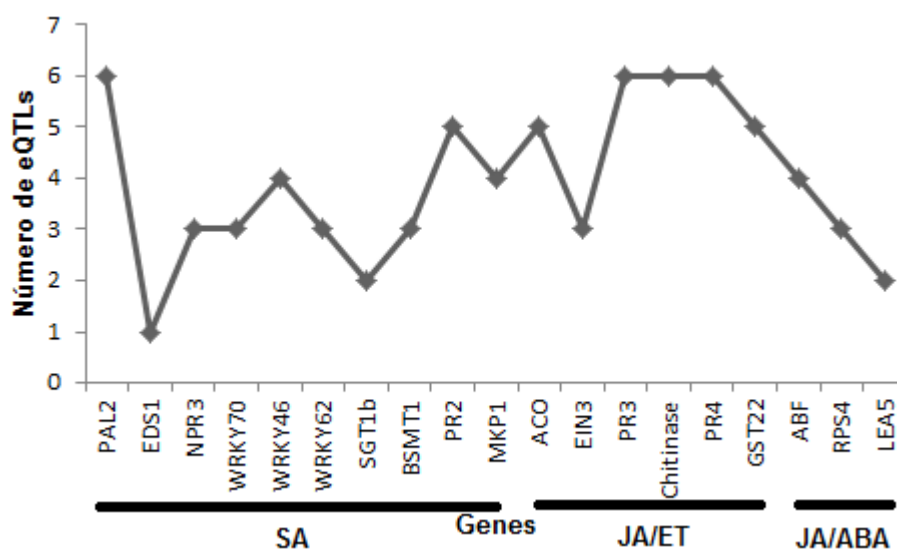


Figura 40. Distribuição do número de eQTLs detectados para cada gene candidato com relação ao mapa do genitor *Poncirus trifoliata*.

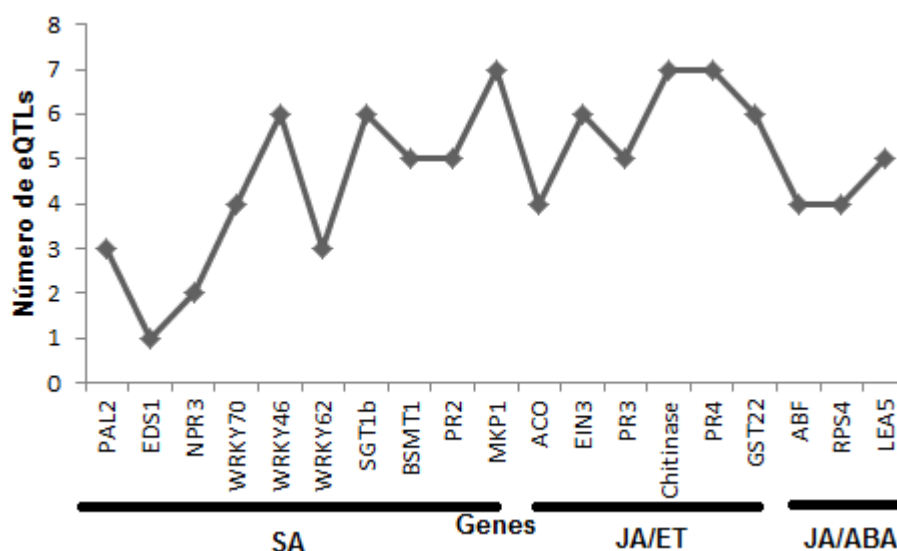


Figura 41. Distribuição do número de eQTLs detectados para cada gene candidato com relação ao mapa do genitor *Citrus sunki*.

Nas Tabelas 10 e 11, observam-se os resultados do mapeamento de eQTLs obtidos das análises estatísticas no pacote FullsibQTL da linguagem de programação R, fornecendo, para cada grupo de ligação dos dois mapas, os mesmos parâmetros estabelecidos no mapeamento de QTLs (marcadores que flanqueiam a região alvo do eQTL candidato, distância em centiMorgans do eQTL detectado a partir da região inicial, LOD score do eQTL, porcentagem da variação genotípica explicada pelo eQTL [R^2] e o valor do efeito aditivo [a] do eQTL).

Tabela 10. Gene, grupo de ligação (GL), marcadores flaqueadores, distância do início em centiMorgans (cM), LOD score, proporção da variação genotípica explicada pelo eQTL (R^2) em porcentagem e efeito aditivo pela análise do mapeamento de intervalo composto (CIM) no FullsibQTL para o caráter expressão gênica relativa da gomose dos citros a partir dos valores de $\text{Log}_2\text{Fold change}$ em híbridos de *P. trifoliata* x *C. sunki* com relação ao mapa do genitor trifoliata Rubidoux.

Gene	Grupo de ligação (GL)	Marcadores flaqueadores	Distância do início (cM)	LOD score	R^2 (%)	Efeito aditivo
PR2	1	100027137 F 0	114,46	7,05	8,52	0,36
	3	100023051 F 0	292,69	6,07	4,87	-0,55
	4	100074214 F 0	244,10	7,90	1,24	0,25
	5	X	171,00	6,79	13,66	-0,34
	9	100017077 F 0	36,23	16,56	5,31	0,88
PR4	3	100035374 F 0	29,49	14,16	0,05	0,65
	4	100065934 F 0	298,24	7,93	0,15	-0,48
	7	100054670 F 0	100,71	9,20	0,48	0,69
	8	100029154 F 0	267,07	24,75	0,16	-1,28
	9	100012681 F 0	21,23	24,49	2,97	2,75
	10	Y	132,00	6,87	0,04	0,57
PR3	2	100038467 F 0	399,83	10,42	1,48	-0,78
	3	100029500 F 0	11,15	19,47	0,92	-0,73
	7	100045437 F 0	84,62	7,36	0,05	0,34
	8	100052370 F 0	122,80	7,74	3,64	-0,79
	9	100017625 F 0	20,14	15,63	2,39	2,18
	10	100016981 F 0	133,87	4,83	0,07	-0,38
Chit, [C, <i>sinensis</i>]	1	100028088 F 0	118,64	3,49	5,34	0,48
	2	100036907 F 0	28,59	4,90	1,01	0,47
	3	100121334 F 0	196,97	16,33	0,86	-2,00
	5	100044333 F 0	206,06	5,06	4,26	-0,39
	8	100078231 F 0	70,57	15,03	10,52	-1,38
	10	100022602 F 0	0,78	5,76	0,84	-0,48
NPR3	1	100041050 F 0	28,29	13,09	1,13	0,76
	6	100034226 F 0	25,58	21,30	7,8	-0,94
	9	100028346 F 0	1,94	4,17	0,02	0,23
MKP1	1	Z	288,00	7,60	0,16	0,49
	3	100041911 F 0	309,65	5,40	0,11	0,42
	7	100151589 F 0	152,99	6,08	0,81	0,70
	8	100023207 F 0	61,42	12,06	5,16	-0,97
BSMT1	4	100095932 F 0	114,32	15,97	0,3	0,99
	7	100027169 F 0	230,53	11,49	0	1,01
	8	100050528 F 0	271,10	8,23	0,18	0,59
RPS4	2	100039214 F 0	272,81	6,92	4,53	0,43
	5	100032182 F 0	0,00	4,51	2,52	0,40
	8	100018879 F 0	112,62	10,99	3,45	-0,88
ABF	4	100022107 F 0	171,20	4,89	0	0,36
	5	U	218,00	3,82	5,15	1,85
	8	100043466 F 0	191,30	19,69	0,04	1,91
	9	100038502 F 0	0,00	8,07	0,18	0,55
EDS1	2	100039214 F 0	272,81	9,10	4,42	0,40
EIN3	2	100033773 F 0	23,03	12,85	4,47	0,64
	4	100062586 F 0	42,56	12,15	0,81	0,58
	5	100192933 F 0	182,31	3,94	8,15	-0,31
GST22	2	L	240,00	16,93	1,34	0,82
	7	100026166 F 0	233,24	17,58	0,2	0,72
	8	100053000 F 0	75,64	13,33	11,12	-1,30
	9	100012681 F 0	21,23	23,38	4,66	2,12
	10	100037719 F 0	112,49	16,36	0,32	0,88
SGT1b	2	100033773 F 0	23,03	11,03	6,73	0,70
	8	100022438 F 0	162,06	6,16	0,57	-1,75

Tabela 10. “Continuação”

WRKY46	2	100052400 F 0	23,03	10,42	4,54	0,81
	3	100071002 F 0	117,51	6,84	0	0,50
	7	100087520 F 0	190,66	9,22	0,02	0,64
	8	100040604 F 0	83,00	4,85	2,72	-0,43
WRKY62	1	100031401 F 0	38,55	3,91	1,5	0,29
	4	100022629 F 0	278,85	19,01	4,43	-2,35
	8	100016467 F 0	97,99	9,03	9,52	-1,03
WRKY70	2	100033773 F 0	23,03	22,01	6,56	1,81
	3	100030266 F 0	7,48	10,45	0	0,59
	10	100079969 F 0	7,36	9,18	0,11	0,56
ACO	2	100027768 F 0	17,48	9,56	2,31	0,49
	3	V	46,00	9,55	0,08	0,41
	4	100048965 F 0	232,75	14,79	0,39	0,61
	5	100090022 F 0	87,28	8,94	0	1,37
	9	O	8,00	8,09	0,05	-0,84
LEA5	1	W	265,00	16,50	0,14	-1,20
	2	100039323 F 0	22,23	11,64	2,24	0,62
PAL2	1	100077731 F 0	119,61	10,72	2,8	1,68
	2	100027768 F 0	17,48	21,27	2,99	1,66
	3	100027751 F 0	82,61	5,28	0,01	0,49
	5	100057266 F 0	186,33	7,71	7,66	-0,78
	6	100026731 F 0	19,73	15,61	2,1	-1,22
	8	100050528 F 0	271,10	4,25	0,26	0,50

X, Y, Z, U, L, V, O e W correspondem a marcadores que segregam completamente ligados.

X = 100144281|F|0-100037817|F|0; Y = 100046309|F|0-100016981|F|0; Z = 100052088|F|0-100030810|F|0; U = 100048863|F|0-100031439|F|0; L = 100045164|F|0-100050946|F|0; V = 100038134|F|0-100018085|F|0; O = 100038422|F|0-100049276|F|0; W = 100052088|F|0-100030810|F|0.

De forma geral, os “LOD scores” críticos calculados foram próximos a 3,0 para todos os genes avaliados nos dois mapas, sendo, portanto elevados. Tal fato já era esperado devido à utilização do modelo de mapeamento por intervalo composto (CIM) (Zeng, 1994; Gazaffi, 2009). Já os “LOD scores” dos eQTLs foram condizentes e variaram de 3,49 a 24,75 para o mapa de *P. trifoliata*, sendo essa variação de 3,0 a 33,13 para o mapa de *C. sunki*. De acordo Ferreira e Grattapaglia (1998), o LOD indica numa escala logarítmica a razão entre a probabilidade da presença de um QTL/eQTL sobre a probabilidade de sua ausência, no tocante a essa relação dependente do número de marcadores usados e do tamanho do genoma em centiMorgans. No que diz respeito aos valores de variação genotípica (R^2) explicada pelos eQTLs, tanto no mapa do trifoliata Rubidoux quanto no da tangerina Sunki houve o aparecimento de eQTLs que chegam a explicar 0%, tendo efeito nulo sobre o processo de expressão gênica. Assim, os valores de R^2 apresentaram efeitos baixos a moderados, variando de 0 a 13,66% para o mapa do genitor resistente à *P. parasitica*; e de 0 a 18,87% para o do genitor suscetível. De maneira equivalente aos valores de variação fenotípica explicados por QTLs em estudos de mapeamento (Anderson *et al.*, 2007), muitos eQTLs no presente estudo são constituídos por locos

com efeitos baixos (R^2 menor que 10%), enquanto poucos são formados por regiões cromossômicas com valores de R^2 moderados (de 10 a 20%).

A direção geral (positiva ou negativa) dos efeitos de eQTLs também foi avaliada na progênie F1 de citrandarins, sendo medida pelos valores dos efeitos aditivos de marcadores que segregam na proporção 1:1 para cada mapa parental. Nas Figuras 42 e 43, observa-se a porcentagem global de eQTLs que apresentam efeitos aditivos positivos e negativos nos mapas de *P. trifoliata* e *C. sunki*, respectivamente, de modo a ficar constatado que a maioria dos eQTLs identificados em cada mapa parental apresentaram alelos que atuaram no sentido de aumentar a expressão gênica em resposta à infecção de *P. parasitica* nos citrandarins. Características genotípicas, como a expressão de um determinado gene sob avaliação de resistência a uma dada doença, geralmente envolvem uma herança complexa e quantitativa, que é controlada por alelos em múltiplos *loci*, cada um com efeito menor e aditivo (Fehr, 1993; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

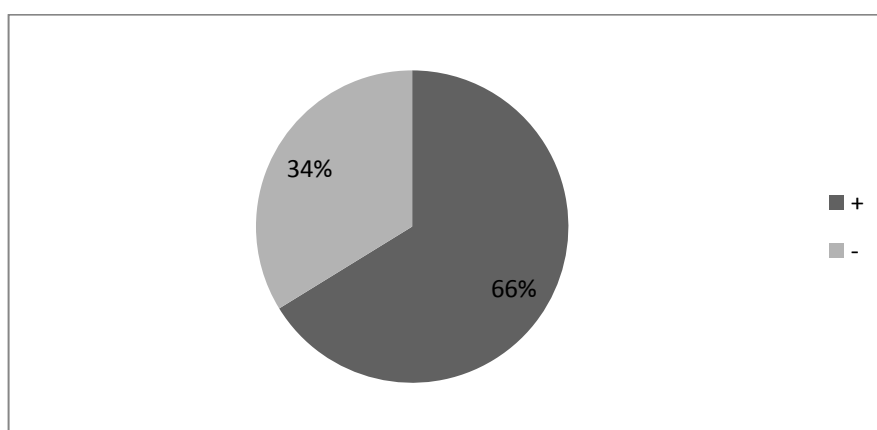


Figura 42. Quantidade (%) geral da direção de eQTLs detectados com relação ao mapa de *Poncirus trifoliata*. Em cinza-escuro e cinza-claro, eQTLs que apresentaram efeitos aditivos positivo e negativo, respectivamente.

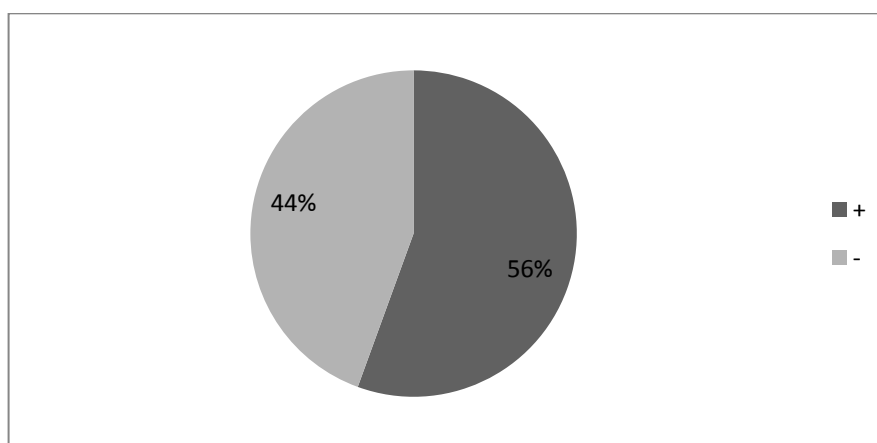


Figura 42. Quantidade (%) geral da direção de eQTLs detectados com relação ao mapa de *Citrus sunki*. Em cinza-escuro e cinza-claro, eQTLs que apresentaram efeitos aditivos positivo e negativo, respectivamente.

Tabela 11. Gene, grupo de ligação (GL), marcadores flanqueadores, distância do início em centiMorgans (cM), LOD score, proporção da variação genotípica explicada pelo eQTL (R^2) em porcentagem e efeito aditivo pela análise do mapeamento de intervalo composto (CIM) no FullsibQTL para o caráter expressão gênica relativa da gomose dos citros a partir dos valores de $\text{Log}_2\text{Fold change}$ em híbridos de *P. trifoliata* x *C. sunki* com relação ao mapa do genitor tangerina Sunki.

Gene	Grupo de ligação (GL)	Marcadores flanqueadores	Distância do início (cM)	LOD score	R^2 (%)	Efeito aditivo
PR2	3b	100029546 F 0	1,88	12,88	7,2	0,35
	4	100059630 F 0	229,41	21,88	18,87	0,55
	5	100053992 F 0	100,47	11,13	6,6	0,50
	6	100025434 F 0	59,79	18,07	12,84	0,49
	8	100060164 F 0	260,87	15,04	1,16	-0,67
PR4	1	100010395 F 0	22,80	20,46	0,64	1,58
	3a	100150606 F 0	197,53	3,78	0,01	-0,27
	3b	100090925 F 0	111,93	23,75	3,25	1,55
	4	100047171 F 0	76,80	17,83	4,4	-0,69
	6	100024711 F 0	112,81	18,50	13,5	-1,89
	7	100008205 F 0	73,22	13,71	2,81	-0,46
	8	100008714 F 0	67,47	33,13	0,2	-1,25
PR3	1	100043261 F 0	147,27	14,46	1,17	-1,05
	2	100014917 F 0	304,33	7,06	0	0,45
	4	100031883 F 0	21,05	17,23	2,03	0,93
	8	100059808 F 0	272,35	12,21	0,57	-0,69
	9	A	19,00	9,58	0,8	0,65
Chit, [C, <i>sinensis</i>]	1	100043261 F 0	147,27	12,70	3,06	-0,65
	2	100028817 F 0	42,76	6,25	0	-0,32
	3a	100046653 F 0	296,39	11,61	0	-0,73
	3b	100028699 F 0	173,03	5,05	5,71	0,35
	4	100031153 F 0	136,61	21,26	4,88	1,17
	5	100005710 F 0	141,04	15,39	4,08	1,01
	7	100019860 F 0	172,79	13,59	0	0,67
NPR3	6	100141575 F 0	184,39	7,72	0,8	0,39
	9	100201189 F 0	1,76	7,78	0,06	0,52
MKP1	1	100048494 F 0	158,73	12,12	0,5	-0,79
	2	100028817 F 0	42,76	10,34	0,07	0,70
	3a	100190059 F 0	119,45	13,03	0,18	1,21
	4	100059630 F 0	229,41	12,58	15,21	0,81
	5	100010416 F 0	6,71	8,98	3,9	0,56
	6	100025450 F 0	134,32	4,90	2,7	-1,46
	8	100039541 F 0	241,60	17,41	1,52	-1,27
BSMT1	1	100074858 F 0	139,60	20,85	0,2	-3,26
	3a	100050041 F 0	387,04	21,40	0,5	0,98
	3b	100040736 F 0	8,51	15,52	1,69	0,76
	6	100057188 F 0	29,06	6,99	1,6	0,46
	8	100022189 F 0	50,11	12,01	0	1,51
RPS4	2	100028817 F 0	42,76	9,62	0,24	-0,45
	5	100015990 F 0	353,41	3,00	5,69	0,43
	6	100025434 F 0	59,79	9,16	8,23	0,52
	8	100011067 F 0	255,46	4,14	0,36	-0,28
ABF	1	100074858 F 0	139,60	20,87	0,13	-3,40
	2	100070232 F 0	79,27	4,14	0,07	-0,56
	3a	B	430,00	12,13	0,78	-1,04
	6	100016749 F 0	23,22	22,48	0,33	1,45
EDS1	2	100172761 F 0	258,12	4,68	1,13	-0,51

Tabela 11. “Continuação”

EIN3	4	100055315 F 0	39,79	4,60	0	0,67
	3a	100035526 F 0	289,95	12,79	1,69	0,52
	3b	100017721 F 0	76,70	12,82	0,01	1,05
	4	100055315 F 0	39,79	4,60	2,07	0,67
	6	100025434 F 0	59,79	8,11	9,21	0,38
	7	100019058 F 0	17,55	14,23	1,03	0,68
GST22	1	100043261 F 0	147,27	20,75	0,36	-0,85
	3a	100190059 F 0	119,45	7,53	0,13	-0,32
	3b	100040736 F 0	8,51	17,24	2,58	2,04
	5	100009168 F 0	197,44	10,91	5,1	-0,62
	6	100031161 F 0	131,45	17,85	3,37	-0,71
	8	100005540 F 0	266,50	5,81	1,98	-0,36
SGT1b	1	100026361 F 0	17,54	12,33	3,46	0,62
	2	100023155 F 0	141,67	15,05	3,63	0,70
	3b	100011299 F 0	47,40	29,14	0,58	1,42
	5	100081742 F 0	318,67	20,04	5,6	-0,90
	6	100038521 F 0	5,15	11,48	0,2	-0,79
	9	100171586 F 0	20,40	9,32	0,3	0,65
WRKY46	1	100016536 F 0	31,72	16,35	3,75	1,57
	2	100034726 F 0	292,62	11,93	0,97	-1,61
	3b	100071708 F 0	34,77	5,03	0,16	-0,68
	4	100019371 F 0	171,77	9,72	10,28	2,62
	5	100040586 F 0	319,94	2,98	5,7	-0,93
	8	100079699 F 0	8,91	12,81	0,15	-1,04
WRKY62	3a	100166552 F 0	30,10	9,54	0,63	0,78
	3b	100009568 F 0	171,44	12,43	2,65	-0,74
	9	100197645 F 0	6,58	7,85	0	1,46
WRKY70	1	100027934 F 0	3,64	11,22	0	-0,75
	3a	100041064 F 0	390,07	5,98	0,14	1,66
	4	100087612 F 0	0,00	10,39	0,05	-1,06
	6	100020619 F 0	43,75	8,20	7,04	0,79
ACO	1	100043261 F 0	147,27	25,28	3,11	-0,94
	4	100019371 F 0	171,77	29,22	12,74	1,00
	5	100035948 F 0	46,25	21,03	1,62	-0,80
	7	100050149 F 0	237,46	15,39	1,59	0,61
LEA5	3a	100043683 F 0	271,83	19,16	1,35	-2,31
	3b	100019764 F 0	44,84	20,40	4,06	1,62
	5	100040586 F 0	319,94	19,73	3,39	-1,89
	6	100009029 F 0	50,06	11,92	8,37	0,79
	8	100005540 F 0	266,50	5,23	6,05	-0,55
PAL2	4	100035040 F 0	228,51	6,02	14,84	0,32
	6	100016749 F 0	23,22	15,57	1,81	1,04
	7	100017769 F 0	27,78	15,24	0,13	0,62

A, B e C correspondem a marcadores que segregam completamente ligados.

A = 100202826|F|0-100171717|F|0; B = 100007389|F|0-100014094|F|0; C = 100035806|F|0-100162177|F|0.

Estudos com eQTLs concorrem para a detecção dos chamados *hotspots*, isto é, possibilitam a identificação de regiões cromossômicas que afetam pelo acaso a expressão de múltiplos genes, com muitos locos próximos e fortemente ligados controlando a quantificação de vários transcritos gênicos. Tal fenômeno pode ser constatado por uma série de eQTLs sobrepostos nos grupos de ligação (GL) dos

mapas genéticos, e sua consequência pode ser atribuída a regiões do genoma ricas em genes estreitamente ligados, identificando eQTLs próximos; ou a uma única região genômica reguladora dos níveis de transcrição de um grande número de genes, a partir da detecção de eQTLs distantes. De qualquer forma, é relatado na literatura que muitos *hotspots* controlam a expressão de genes que codificam enzimas participantes das inúmeras vias metabólicas, sendo até possível alguns *hotspots* regulando a via como um todo (Kirst *et al.*, 2004; Hubner *et al.*, 2005; Rosa, 2007; West *et al.*, 2007). Dessa forma, no presente trabalho foi identificado um total de 22 *hotspots* no mapa do genitor trifoliata Rubidoux, com uma média de aproximadamente dois *hotspots* por GL, bem como 23 no mapa da tangerina Sunki, apresentando uma média de aproximadamente três *hotspots* por GL. Os genes que possuíram eQTLs sobrepostos e localizados em *hotspots* variaram desde dois até oito nos mapas genéticos (Tabela 12). Pôde-se constatar que houve intensa sobreposição de eQTLs oriundos da quantificação dos 19 transcritos gênicos, independente da via de sinalização que participam, como observado nas Figuras 44 e 45. A interposição entre os eQTLs, então, parece não seguir o relacionamento entre os genes, chegando a se encontrar inclusive eQTLs provenientes de transcritos associados a diferentes vias de sinalização dos fitormônios, que estavam sobrepostos exatamente na mesma posição ou em regiões próximas formadoras dos *hotspots*, tanto no mapa de *P. trifoliata* quanto no de *C. sunki*. Entretanto, alguns eQTLs identificados não formaram *hotspots*, controlando a expressão de seus respectivos genes isoladamente no genoma dos dois mapas.

A direção dos efeitos aditivos em *hotspots* pode seguir ambos os sentidos, com eQTLs que apresentam efeitos tanto positivos quanto negativos; ou completamente uma tendência, sugerindo locos numa região do genoma que afetam o processo de expressão gênica apenas em um único sentido para vários genes (Kirst *et al.*, 2004; Kirst *et al.*, 2005). No presente estudo, constatou-se a existência desses *hotspots* nos dois mapas, como por exemplo, um no GL 2 do genitor *P. trifoliata*, que atuou exclusivamente no sentido de aumentar a expressão de oito genes (Chitinase, EIN3, SGT1b, WRKY46, WRKY70, LEA5, ACO e PAL2), bem como dois no mapa de *Citrus sunki*, um presente no GL 1, que conferiu somente uma redução da expressão de sete genes (PR3, Chitinase, GST22, ACO, MKP1, BSMT1 e ABF); e outro no GL 6, contribuindo unicamente para o aumento da expressão de cinco genes (WRKY70, LEA5, PR2, RPS4 e EIN3) (Tabela 12).

Tabela 12. Relação dos genes que apresentaram eQTLs sobrepostos e localizados em *hotspots* para cada grupo de ligação nos dois mapas genéticos construídos para cada genitor da progênie F1 de citrandarins.

Mapa genitor <i>Poncirus trifoliata</i>		Mapa genitor <i>Citrus sunki</i>	
GL	Genes	GL	Genes
1	PR2, Chitinase e PAL2;	1	PR3-Chitinase-GST22-ACO*, MKP1, BSMT1 e ABF;
	NPR3 e WRKY62;		PR4, SGT1b, WRKY46 e WRKY70.
	MKP1 e LEA5.	2	Chitinase-MKP1-RPS4* e ABF;
2	RPS4-EDS1* e GST22;	3a	PR3 e WRKY46.
	Chitinase, EIN3-SGT1b-WRKY46-WRKY70*, LEA5, ACO-PAL2*.		Chitinase, EIN3 e LEA5;
3	PR4, PR3, WRKY70 e ACO;		MKP1-GST22*;
	PR2 e MKP1;	3b	BSMT1 e WRKY70.
4	WRKY46 e PAL2.		PR2, BSMT1-GST22*;
	PR4 e WRKY62;	4	Chitinase e WRKY62;
5	PR2 e ACO.		EIN3, SGT1b, WRKY46 e LEA5.
	PR2, Chitinase, ABF, EIN3 e PAL2.		PR2, MKP1 e PAL2;
6	NPR3 e PAL2.	5	PR3, EIN3 e WRKY70;
7	PR4 e PR3;		WRKY46 e ACO.
	BSMT1 e GST22;	6	PR2 e Chitinase;
8	MKP1 e WRKY46.		MKP1 e ACO;
	Chitinase, MKP1, GST22, WRKY46 e WRKY62;	7	RPS4, SGT1b, WRKY46-LEA5*.
	PR4, BSMT1-PAL2*;		WRKY70, LEA5, PR2-RPS4-EIN3*;
9	PR3 e RPS4;		PR4, MKP1 e GST22;
	ABF e SGT1b.	8	BSMT1, ABF-PAL2* e SGT1b.
10	PR2, PR3, PR4-GST22*, NPR3, ABF e ACO.		EIN3 e PAL2.
	PR4, PR3 e GST22;	9	PR2, PR3, MKP1, RPS4, GST22-LEA5*;
	Chitinase e WRKY70.		PR4 e BSMT1.
			PR3, NPR3, SGT1b e WRKY62.

*Genes que apresentaram eQTLs localizados exatamente na mesma posição a partir da distância do início (telômero esquerdo) em centiMorgans.

Dessa forma, genes co-regulados em plantas têm sido amplamente identificados nas análises genéticas pelo mapeamento de eQTLs, com o conceito de que diferentes níveis de transcrição provenientes de genes distintos podem está sob controle dos mesmos *loci* reguladores. Além disso, esse tipo de metodologia também permite detectar outras redes regulatórias, a partir da co-localização entre

QTLs e eQTLs, identificando associações entre o estado alélico de uma região genômica com a quantificação de transcritos gênicos dentro de QTLs envolvidos na variação das características agronômicas complexas. Como QTLs normalmente abrangem grandes regiões do genoma (no mínimo 20 cM) e geralmente muitos genes são avaliados para se desenvolver o mapeamento de eQTLs, a sobreposição entre QTLs e eQTLs pode corroborar para uma forte associação entre os níveis de transcritos gênicos e os dados fenotípicos, detectando genes diferencialmente expressos entre os fenótipos de uma progênie segregante (Gion *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2003; Cubilos *et al.*, 2012). Nesse sentido, apesar de se constatar vários *hotspots* sobrepostos aos QTLs detectados no presente trabalho, a interposição entre um eQTL proveniente do gene WRKY46 e um QTL numa mesma posição genômica foi encontrada exatamente no marcador 100087520|F|0 no GL 7 do mapa parental *P. trifoliata* a 190,66 cM do início (telômero esquerdo), indicando uma complexa rede que regula tanto a expressão gênica quanto o fenótipo. Esse gene é um fator de transcrição da família dos WRKY e sua ativação está envolvida em respostas de plantas contra a infecção de fitopatógenos (Vlot *et al.*, 2009), possuindo um padrão de expressão gênica que sugere uma participação maior frente à interação de *P. parasitica* com os híbridos de *P. trifoliata* x *C. sunki*.

Para Kirst *et al.* (2005), utilizando a estratégia *pseudo-testcross* para realizar o mapeamento de eQTLs em dois mapas genéticos parentais numa linhagem de híbridos de eucalipto, sugeriu que diferentes genótipos da progênie tem distintos *loci* reguladores nos genitores, o que talvez possa explicar as diferenças genéticas registradas na expressão gênica, tendo em vista os distintos efeitos oriundos de seus progenitores. No presente trabalho, o genitor suscetível tangerina Sunki parece ter uma maior contribuição na transmissão de alelos de resistência à progênie em resposta à infestação de *P. parasitica*, pelo fato de se ter detectado em comparação ao mapa do trifoliata Rubidoux: um único QTL de efeito negativo e moderado para explicar a variação fenotípica dos valores de comprimento da área lesionada, conferindo uma redução dos valores de CL_R; maior número de eQTLs; maior número de *hotspots* e consequentemente maior sobreposição; maior número de eQTLs localizados exatamente na mesma posição; maior equilíbrio entre *hotspots* que apresentam efeitos aditivos apenas em um único sentido; e maior número de eQTLs identificados em *hotspots* com efeitos moderados que apresentam exclusivamente efeitos positivos, atuando no sentido de aumentar a expressão dos genes

candidatos inclusos nessas zonas. Em adição a isso, alguns híbridos do grupo T/R se comportam de forma similar ao genitor *P. trifoliata*, entrando numa espécie de hibernação (repouso vegetativo e fisiológico) quando se avaliou a expressão dos 19 genes-alvo no presente trabalho. Entretanto, vale ressaltar que houve uma expressiva identificação tanto de QTLs quanto de eQTLs e *hotspots* no mapa do trifoliata Rubidoux, sugerindo que haja uma atuação dos dois genitores para conferir uma combinação favorável de QTLs/eQTLs a serem passados aos citrandarins em resposta à infecção do agente causador da gomose dos citros (Figuras 44 e 45).

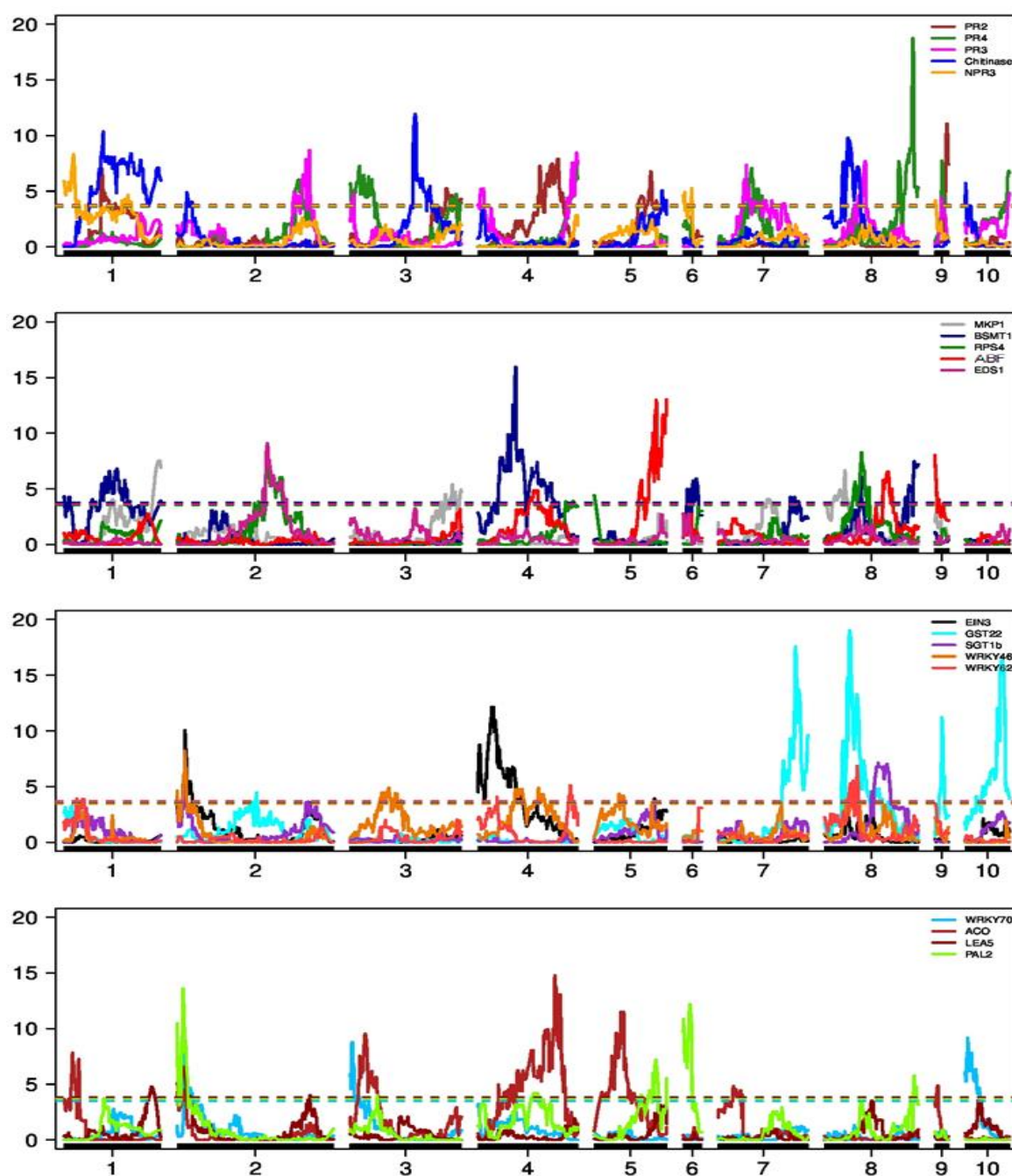


Figura 44. Distribuição de eQTLs no mapa genético de *P. trifoliata* relacionados ao processo de expressão gênica dos 19 genes avaliados quanto à defesa dos citrandarins à *P. parasitica*.

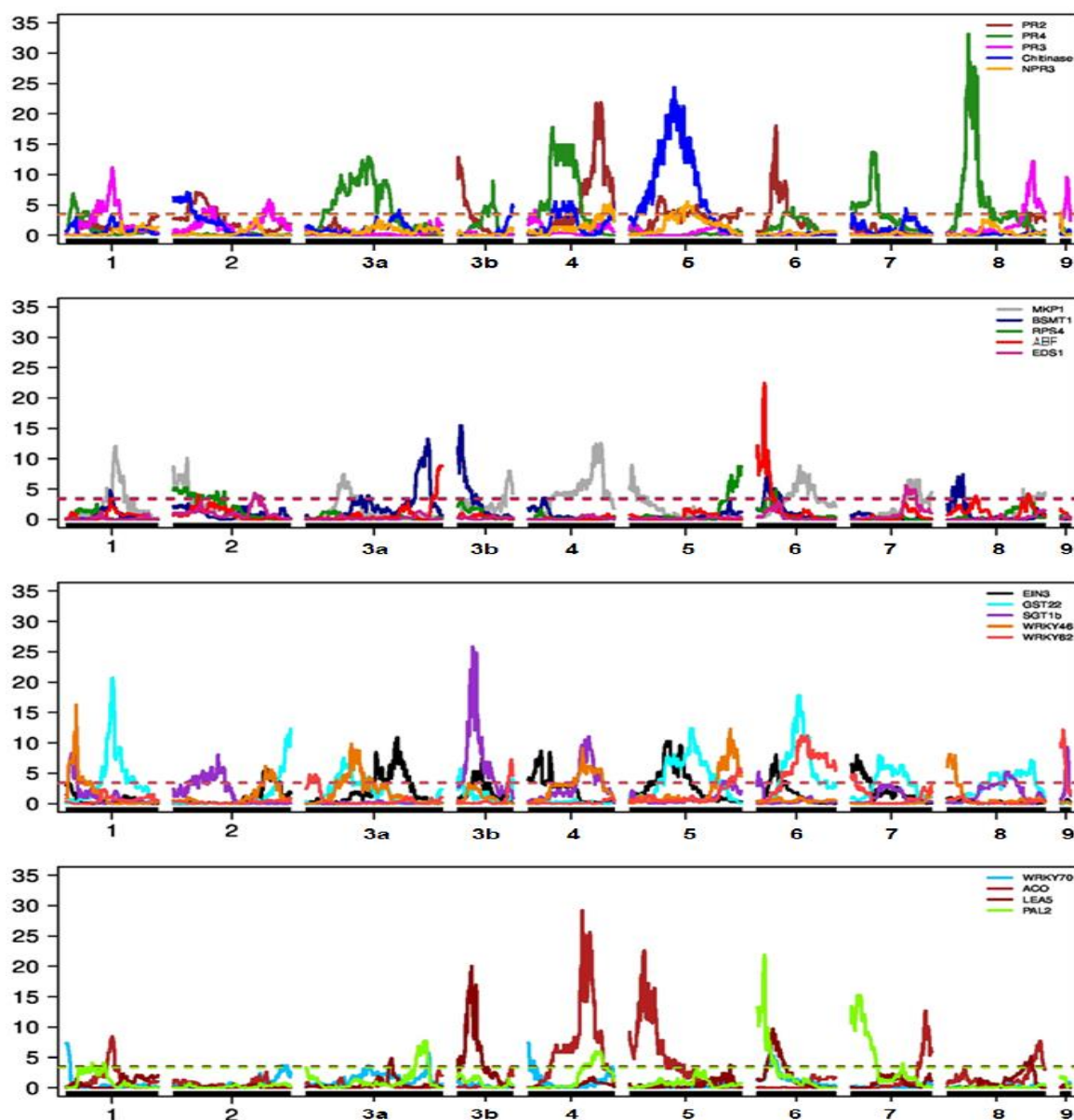


Figura 45. Distribuição de eQTLs no mapa genético de *C. sunki* relacionados ao processo de expressão gênica dos 19 genes avaliados quanto à defesa dos citrandarins à *P. parasitica*.

Perspectivas futuras podem ser realizadas quanto à localização exata dos 19 genes-alvo entre as marcas genéticas distribuídas nos dois mapas parentais, permitindo a distinção dos diversos eQTLs detectados no presente estudo, que podem ser categorizados como cis-eQTLs (eQTLs próximos do gene), explicando a variação da expressão gênica na própria região cromossômica em que o gene se encontra; ou trans-eQTLs (eQTLs distantes do gene), representando um efeito de polimorfismos genéticos que estão localizados em outras regiões do genoma. Tal procedimento traz maior informação genômica ao mapeamento de eQTLs, e pode colaborar para avanços nessa área, tendo em vista que trabalhos com eQTLs utilizando a técnica de RT-qPCR em plantas são poucos na literatura.

6. Considerações Finais

1. A análise fenotípica dos 114 genótipos (110 citrandarins, seus genitores, limão Cravo e citrumelo Swingle) frente à inoculação de *P. parasitica*, revelou que oito híbridos, juntamente com o genitor *Citrus sunki* e o porta-enxerto limão Cravo foram suscetíveis ao oomiceto e conseqüentemente, tiveram uma maior lesão, bem como 11 indivíduos formados apenas por citrandarins foram moderadamente suscetíveis, apresentando lesões intermediárias. Por outro lado, a grande maioria, isto é, 91 híbridos se mostraram tolerantes e/ou resistentes à *Phytophthora*, além do genitor *Poncirus trifoliata* e o porta-enxerto citrumelo Swingle. Portanto, mesmo dentro dos citrandarins pertencentes ao grupo T/R, pôde-se constatar grande variabilidade genética que permitiu a discriminação por agrupamento, fato demonstrado pela aplicação das estimativas de ganho genético, com quatro híbridos exibindo um alto comportamento de resistência a *P. parasitica*. Tais citrandarins constituem genótipos promissores para futuras pesquisas relacionadas à gomose. Além disso, a herdabilidade para o caráter CL_R (comprimento real da lesão) é considerada alta, demonstrando que o fator genético exerce maior influência do que o ambiental;
2. A escolha da população segregante para genotipagem e dos genitores contrastantes em relação à resistência de *Phytophthora*; a utilização dos marcadores DArT-seq e o uso da estratégia *pseudo-testcross* a partir da segregação de marcadores na proporção mendeliana 1:1 pelo programa OneMap, possibilitaram a construção de dois mapas de ligação consistentes, um para cada genitor, a fim de detectar QTLs e eQTLs (QTLs de expressão) numa progênie F1 de citrandarins;
3. A análise do mapeamento de QTLs por intervalo composto (CIM) permitiu identificar três QTLs de pequeno efeito associados à resistência a *P. parasitica* nos grupos de ligação 2, 7 e 10 do mapa de *P. trifoliata*, e apenas um QTL de efeito moderado no grupo de ligação 2 de *C. sunki*. O único QTL no mapa da tangerina Sunki chegou a explicar 16,8% da variação fenotípica e apresentou efeito aditivo negativo, o que faz com que atue no sentido de diminuir a expressão do caráter CL_R relacionado à herança da gomose dos citros. Dessa forma, parece haver uma maior contribuição para transmitir alelos de resistência à progênie por parte do genitor suscetível, com a

atuação dos dois genitores sendo de extrema importância para transmitir uma combinação favorável de QTLs aos citrandarins;

4. A quantificação dos transcritos gênicos 48 horas após a infestação por RT-qPCR de 19 genes candidatos permitiu constatar padrões diferenciais de expressão associados às diferentes vias de fitormônios (SA, JA/ET e JA/ABA) nos citrandarins quando se analisa os grupos fenotípicos formados, de modo a alguns genes terem uma maior participação na resposta de defesa ao agente causador da gomose dos citros, a partir do pressuposto de que genes diferencialmente expressos nos genitores suscetível e resistente, bem como entre os seus híbridos resistentes e suscetíveis, são alvos promissores na resistência a *P. parasitica*. Portanto, mais de uma via parece ser responsável pelo fenótipo da doença, e outros processos inespecíficos, que não medeiam a resistência gene-a-gene, provavelmente associados à ROS e às fitoalexinas, também podem estar sendo ativados na interação *Phytophthora*-citros;
5. Os dois porta-enxertos de referência para citricultura (limão Cravo e citrumelo Swingle), a partir de seus perfis de expressão para os 19 genes candidatos, ativam diferentes mecanismos de defesa frente à infecção do oomiceto;
6. Foi demonstrado que grande parte dos híbridos suscetíveis induz os genes-alvo, enquanto outros classificados como tolerantes e/ou resistentes predominantemente os reprimem;
7. O perfil de expressão gênica global do experimento, bem como a matriz de dissimilaridade entre os genes candidatos permitiram estabelecer análises consistentes de agrupamento entre os genótipos selecionados e os genes candidatos, indicando que a característica comprimento da lesão associada à herança complexa da gomose dos citros é governada pela repressão e indução de genes, envolvendo tanto genética quanto ambiente, e que alguns genes parecem ter uma maior relação na expressão dos diferentes fenótipos frente à infecção de *P. parasitica*;
8. O estudo da expressão de genes candidatos associados à resistência a fitopatógenos e ao oomiceto *P. parasitica* via RT-qPCR e a análise do mapeamento de eQTLs por intervalo composto (CIM) foi importante para mapear regiões genômicas nos dois mapas parentais que atuam no processo de expressão gênica para a característica fenotípica CL_R relacionada à

herança da gomose dos citros, permitindo identificar 74 eQTLs no mapa de *P. trifoliata* e 90 no de *C. sunki*. Alguns eQTLs nos dois mapas estavam fortemente sobrepostos, havendo a detecção de consistentes *hotspots* (“zonas quentes”) de eQTLs relacionados aos 19 genes-alvo. Além disso, a co-localização de um QTL com um eQTL em um mesmo marcador flanqueador no mapa do trifoliata Rubidoux indicou a formação de uma complexa rede reguladora tanto da expressão gênica quanto do fenótipo;

9. A análise do mapeamento de eQTLs, assim como do mapeamento de QTLs, revelou que o genitor suscetível ao agente causador da gomose dos citros *C. sunki* parece ter uma maior contribuição para transmitir alelos de resistência à progênie, com a ação mútua dos dois genitores sendo indispensável na passagem aos citrandarins de uma combinação favorável de eQTLs, que conferem defesa à *P. parasitica*.

7. Referências bibliográficas

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. London: Academic Press, 1988, 922 p.;
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. Phylum Oomycota: In **Introductory Mycology**. Edited by: ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. & BLACKWELL, M., ed. John Wiley, 1996, p. 683-737;
- ALVAREZ, L. A. et al. Seasonal susceptibility of citrus scions to *Phytophthora citrophthora* and *P. nicotianae* and the influence of environmental and host-linked factors on infection development. **European Journal of Plant Pathology**, v. 124, n. 4, p. 621-635, 2009;
- AMARA, I. et al. Insights into LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT (LEA) proteins in plants: from structure to the functions. **American J. of Plant Sciences**, v. 5, p. 3440-3445, 2014;
- ANDERSON, J. A.; CHAO, S. & LIU, S. Molecular breeding using a major QTL for *fusarium* head blight resistance in wheat. **Crop Science**, v. 47, p. 112-119, 2007;
- ANDERSON, J. C. et al. Arabidopsis MAP KINASE PHOSPHATASE 1 (AtMKP1) negatively regulates MPK6-mediated PAMP responses and resistance against bacteria. **The Plant Journal**, v. 67, p. 258-268, 2011;
- ARGUESO, C. T.; HANSEN, M. & KIEBER, J. J. Regulation of ethylene biosynthesis. **J. Plant Growth Regul.**, v. 26, p. 92-105, 2007;
- AZEVEDO, C. et al. Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity. **The EMBO Journal**, v. 25, p. 2007-2016, 2006;
- BALLARÉ, C. L. Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 5, p. 249-257, 2011;
- BARROS, F. C. et al. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Biosc. J.**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 231-239, 2010;
- BARTELS, S. et al. MAP KINASE PHOSPHATASE 1 and PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE 1 are repressors of salicylic acid synthesis and SNC1-mediated responses in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 21, p. 2884-2897, 2009;
- BENITEZ, Y. Molecular analysis of the interaction between *Olea europaea* and the biotrophic fungus *Spilocaea oleagina*. **Mol. Plant Pathol.**, v. 6, p. 425-438;
- BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F. & CARVALHO, F. I. F. de. DNA Marcadores Moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1997;
- BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P. & OLIVEIRA, R. Melhoramento para resistência a doenças. In: BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P. & OLIVEIRA, R. **Melhoramento de Plantas**, p. 11-18, 2007;
- BLUMER, S. & POMPEU JUNIOR, J. Avaliação de citrandarins e outros híbridos de trifoliata como porta-enxertos para citros em São Paulo. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal-SP, v. 27, n. 2, p. 264-267, 2005;

BOAVA, L. P. **Estabilidade de QTLs ligados à resistência dos citros a gomose, causada por *Phytophthora parasitica***. 2004. 81 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Proteção de Plantas), Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, 2004a;

BOAVA, L. P. et al. Expression of defense-related genes in response to mechanical wounding and *Phytophthora parasitica* infection in *Poncirus trifoliata* and *Citrus sunki*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 76, p. 119–125, 2011a;

BOAVA, L. P. et al. Global gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica*. **BMC Genomics**, v. 12, p. 39, 2011b;

BOAVA, L. P. et al. Mapeamento e estabilidade de QTLs ligados à resistência dos citros a gomose, causada por *Phytophthora parasitica*. In: XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2004, Maringá. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. S279, 2004b;

BOAVA, L. P. et al. Resistência de citrandarins e citranges a *Phytophthora parasitica*. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 24, n.1, p. 135-144, 2003;

BOCCAS, B. & LAVILLE, E. **Les maladies a *Phytophthora* des agrumes**. IRFA, França, ed. SETCO, 162 p.;

BORÉM, A. & FRITSCHÉ-NETO, R. [ed.] **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013, 336 p.;

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 1997, 547 p.;

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

BRUN, M.; JOHNSON, C. D. & RAMOS, K. S. Clustering: revealing intrinsic dependencies in microarray data. In: DOUGHERTY, E. R. et al. (Ed.). **Genomic signal processing and statistics**. New York: Hindawi Publishing Corporation, 2005, p. 129-162;

CAIXETA, M. P. et al. Espécies de *Phytophthora* associadas à gomose em pomares de citros no Estado do Paraná, Brasil. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 39, n. 4, p. 242-247, 2013;

CALSA JUNIOR, T.; BENEDITO, V. A. & FIGUEIRA, A. V. de O. Análise serial da expressão gênica. **Rev. Biotec. Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, p. 88-100, 2004;

CANTERI, M. G. et al. SASM-AGRI: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Rev. Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p. 18-24, 2001;

CARNEIRO, M. S. & VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 2, p. 89-100, 2002;

- CARNEIRO, M. S. et al. RAPD-based genetic linkage maps of Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **Genome**, v. 45, p. 670-678, 2002;
- CARNEIRO, N. P.; GUIMARÃES, C. T. & MAGALHÃES, J. P. Tipo de marcadores e genômica de plantas. **Biosc. J.**, Uberlândia, v. 20, p. 119-132, 2004;
- CARVALHO, M. L. T. **Reação de porta-enxertos híbridos de citros à infecção de tronco e raízes por *Phytophthora parasitica***. 2000. 87 p. Tese (Doutorado – Genética e Melhoramento), Universidade Estadual de Campinas, 2000;
- CARVALHO, N. L. Resistência genética induzida em plantas cultivadas. **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 7, n. 7, p. 1379-1390, 2012;
- CASER, D. V. & AMARO, A. A. Evolução da produtividade na citricultura paulista. **Informações econômicas**. Instituto de Economia Agrícola, São Paulo, v. 34, p. 7-12, 2004;
- CAVALCANTE et al. Interação patógeno planta: respostas frente ao ataque. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v. 8, n. 3, p. 90-97, 2013;
- CHAN, Z. Expression profiling of ABA pathway transcripts indicates crosstalk between abiotic and biotic stress responses in Arabidopsis. **Genomics**, v. 100, p. 110-115, 2012;
- CHANG, S.; PURYEAR, J. & CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, Athens, v. 11, n. 2, p. 113-116, 1993;
- CHAO, Q et al. Activation of the Ethylene Gas Response Pathway in Arabidopsis by the Nuclear Protein Ethylene-insensitive3 and Related Proteins. **Cell**, v. 89, p. 1133-1144, 1997;
- CHISHOLM, S. T. Et al. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, Massachusetts, v.124, n. 4, p. 803-814, 2006;
- CHOI, H. et al. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. **The J. of Biol. Chemistry**, v. 275, n. 3, p. 1723-1730, 2000;
- CHURCHILL, G.A. & DODGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative values for quantitative trait mapping. **Genetics**, v.138, p. 963-971, 1994;
- COERINI, L. F. **Expressão de genes das vias de jasmonato e etileno na resposta de plantas a citros às bactérias *Candidatus Liberibacter spp.*, causadoras do *Huanglongbing***. 2014. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Microbiologia Agrícola), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiros”, Universidade de São Paulo, 2014;
- CORDEIRO, M. C. R. & SÁ, M. F. G de. Biotecnologia e resistência a patógenos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 10, p. 34-39, 1999;
- CRISTOFANI-YALY, M. et al. Programa de Melhoramento de Citros por hibridação controlada no Centro APTA Citros Sylvio Moreira em 1997-2005. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 26, n. 1, p. 121-134, 2005;

CRISTOFANI-YALY, M. et al. Seleção de citrandarins (Tangerina 'Sunki' vs. *Poncirus trifoliata*) para porta-enxertos de citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 28, n. 1-2, p. 71-79, 2007;

CRISTOFANI-YALY, M.; MACHADO, M. A. & GATTAPAGLIA, 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;

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. & CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: ed. UFV, v. 1, 2004, 480 p.;

CRUZ, E. M. **Efeito da saturação e do tamanho da população F2 e de retrocruzamento sobre a acurácia de mapeamento genético**. 2006. 133 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, 2006;

CRUZ, V. M. V.; KILLIAN, A. & DIERIG, D. A. Development of DArT marker platforms and genetic diversity assessment of the U.S. collection of the new oilseed crop *Lesquerella* and related species. **Plos One**, v. 8, n. 5, p. 1-13, 2013;

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

DALIO R. J. D. **Deciphering mechanisms of pathogenicity and resistance induction in the interaction between *Phytophthora* spp. and European beech (*Fagus sylvatica* L.)**. Ph.D. Thesis. Technische Universitaet Muenchen (TUM), Freising, Germany, 2013;

DALIO, R. J. D. et al. Efeitos na interação planta-patógeno. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 22, p. 25-68, 2014;

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

DANGL, J. L. & JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. **Nature**, v. 411, p. 826-833, 2001;

DAVIES, F.S. & ALBRIGO, L.C. **Citrus**. Crop Production Science in Horticulture. 2^a ed., Inglaterra: Cab International, 1994, 254p.;

DEAN, J.V., MOHAMMED, L.A. & FITZPATRICK, T. The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. **Planta**, v. 221, p. 287-296, 2005;

DEMPSEY, D. M. A. et al. **Salicylic acid biosynthesis and metabolism**. The Arabidopsis Book 9, 2011, 24 p.;

DIAZ-PUENTES, L-N. Resistencia sistémica adquirida mediada por él ácido salicílico. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 10, n. 2, p. 257-267, 2012;

DODDS, P. N. & RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews – Genetics**, London, v. 11, n. 8, p. 539-548, 2010;

DOERGE, R. Constructing genetic maps by rapid chain delineation. **Journal of Quantitative Trait Loci**, v. 2, n. 6, p. 121-132, 1996;

DONADIO, L. C.; STUCHI, E. S. & CYRILLO, F. L. de L. **Tangerinas ou mandarinas**. Jaboticabal: Funep, 1998, n. 5, 40 p.;

DROST, D. R. et al. Diversification in the genetic architecture of gene expression and transcriptional networks in organ differentiation of *Populus*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 107, p. 8492-8497, 2010;

FAO, Food and agriculture organization of the United Nations. 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citrus/en/>>. Acesso em: 16 agosto 2016;

FEHR, W. R. **Principles of cultivar development**. New York: McMillian Publishing Company, 1993, 527 p.;

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. (Eds.). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria e Editora Rural, p. 283-342, 2001;

FEICHTENBERGER, E. et al. Doenças dos citros. In: BERGAMIN FILHO, A. et al. **Manual de Fitopatologia – doenças das plantas cultivadas**. São Paulo, Ed. Agron. Ceres, v. 2, p. 239-269. 2005;

FEICHTENBERGER, E. **Manejo ecológico de gomose de *Phytophthora* dos citros**. São Paulo, Rhodia Agro Ltda., 1996, 42p.;

FEICHTENBERGER, E. Manejo integrado das principais doenças fúngicas dos citros no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 76-86, 2003;

FERNANDES, C. de F. et al. **Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2009, 14 p.;

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998;

FONSECA, S. et al. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. **Nat. Chem. Biol.**, v. 5, p. 344-350, 2009;

FRADIN, E.F. & THOMMA, B. Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by V-dahliae and V-albo-atrum. **Mol. Plant Pathol.**, v. 7, n. 2, p. 71-86, 2006;

FU, Z. Q. et al. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. **Nature**, v. 486, p. 228-232, 2012;

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. **Manual de morte súbita dos citros**. Araraquara: Fundecitrus, 2006, 12 p.;

GARCIA, C. H. & NOGUEIRA, M. C. S. Utilização da metodologia REML/BLUP na seleção de clones de eucalipto. **Scientia Forestalis**, n. 68, p. 107-112, 2005;

GARCION, C. et al. Characterization and biological function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE 2 gene of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.**, v. 147, p. 1279-1287, 2008;

GASPAROTTO, L.; JUNQUEIRA, N. T. V. & PEREIRE, J. C. R. **Doenças dos Citros no Estado do Amazonas**. Manaus: EMBRAPA-CPAA, 1998, 20 p.;

GAZAFFI, R. **Desenvolvimento de modelo genético-estatístico para mapeamento de QTLs em progênie de irmãos completos, com aplicação em cana-de-açúcar**. 2009. 103 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2009;

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

GION, J. M. et al. Mapping candidate genes in *Eucalyptus* with emphasis on lignification genes. **Mol. Breed.**, v. 6, p. 441-449, 2000;

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 43, p. 205-227, 2005;

GLAZEBROOK, J. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 301-308, 2001;

GRAHAM, J. H. & TIMMER, L. W. Phytophthora Diseases of Citrus. Soil and Water Science Department, **Institute of Food and Agricultural Sciences**, University of Florida, 2003, 11 p.;

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. 1121-1137, 1994;

GRATTAPAGLIA, D. Integrating genomics into *Eucalyptus* breeding. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 3, p. 369-379, 2004;

GRENVILLE-BRIGGS, L.J. & WEST, P. V. The biotrophic stages of oomycete-plant interactions. **Advances in Applied Microbiology**, v. 57, p. 217-243, 2005;

GRIMM, G. R. & ALEXANDER, A. F. Citrus leaf pieces as traps of *Phytophthora parasitica* from slurries. **Phytopathology**, St. Paul, v. 63, n. 6, p. 669-673, 1973;

HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexins: What have we learned after 60 years? **Ann. Rev. Phytopathol**, v. 37, p. 285-306, 1999;

He, Y. et al. Selection and validation of reference genes for quantitative real time PCR in *Gentiana macrophylla*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-13, 2016;

HEARN, C.J.; HUTCHISON, D.J. & BARRET, H.C. Breeding citrus rootstocks. **HortScience**, Mount Vernon, v. 9, n. 4, p. 357-358, 1974;

- HENRY, G. et al. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immune elicitors. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, Gembloux, v. 16, p. 257-268, 2012;
- HOLLOWAY, B. et al. Genome-wide expression quantitative trait loci (eQTL) analysis in maize. **BMC Genomics**, v. 12, p. 336-343, 2011;
- HU, Y.; DONG, Q. & YU, D. Arabidopsis WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. **Plant Science**, v. 186, p. 288-297, 2012;
- HUBNER, N.; WALLACE, C. A. & ZIMBAHL, H. et al. Integrated transcriptional profiling and linkage analysis for identification of genes underlying disease. **Nature Genetics**, v. 37, p. 243-253, 2005;
- HUTCHISON, D.J. & O'BANNON, J.O. Evaluating the reaction of citrus selections to *Tylenchulus semipenetrans*. **Plant Disease Reporter**, Washington, DC, v. 56, n. 9, p. 747-751, 1972;
- IQBAL, M. J. et al. Microsatellite markers identify three additional quantitative trait loci for resistance to soybean sudden-death-syndrome (SDS) in Essex x Forrest RILs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 187-192, 2001;
- JACCOUD, D. et al. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 4, p. 1-7, 2001;
- JANSEN, R.C. & NAP, J.P. Genetical genomics: the added value from segregation. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 7, p. 388-391, 2001;
- JISHA, V. et al. Overexpression of an AP2/ERF type transcription factor OsEREBP1 confers biotic and abiotic stress tolerance in rice. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. 1-24, 2015;
- JONES, J. D. & DANGLE, J. L. The plant immune system. **Nature**, New York, v. 444, p. 323-329, 2006;
- JUDELSON, H. S. & MESSENGER-ROUTH, B. Quantitation of *P. cinnamomi* in avocado roots using a species- specific DNA probe. **Phytopathology**, v. 86, p. 763-768, 1996;
- KAOSIRI, T.; ZENTMYER, G.A. & ERWIN, D.C. Stalk length as a taxonomic criterion for *Phytophthora palmivora* isolates from cacao. **Canadian Journal of Botany**, v.56, p.1730-1738, 1978;
- KATSIR, L. et al. Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 4, p. 428-435, 2008;
- KAZAN, K. et al. DNA microarrays: new tools in the analysis of plant defense responses. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, p. 177-185, 2001;
- KENDE, H. Ethylene biosynthesis. **Annual Rev. of Plant Physiol.**, v. 44, p. 283-307, 1993;

- KIM, Kang-C. et al. Arabidopsis WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. **The Plant Cell**, v. 20, p. 2357-2371, 2008;
- KIRST, M. et al. Coordinated genetic regulation of growth and lignin revealed by quantitative trait locus analysis of cDNA microarray data in an interspecific backcross of *Eucalyptus*. **Plant Physiol.**, v. 135, p. 2368-2378, 2004;
- KIRST, M. et al. Genetic architecture of transcript-level variation in differentiating xylem of a eucalyptus hybrid. **Genetics**, v. 169, p. 2295-2303, 2005;
- KOLLER, O. L. (Org.) **Citricultura catarinense**. Florianópolis: ed. Epagri, 2013, 319 p.;
- KONISHI, M. & YANAGISAWA, S. Two different mechanisms control ethylene sensitivity in Arabidopsis via the regulation of EBF2 expression. **Plant Signaling & Behavior**, v. 9, n. 3, p. 749-751, 2008;
- KOO, Y. J. et al. Overexpression of SALICYLIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE reduces salicylic acid-mediated pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol. Biol.**, v. 64, p. 1-15, 2007;
- KOORNNEEF, A. & PIETERSE, C. M. J. Cross talk in defense signaling. **Plant Physiology**, Rockville, v. 146, p. 839-844, 2008;
- KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. **Ann. Eugen.**, v. 12, p. 172-175, 1944;
- KUJUR, A. et al. Integrated genomics and molecular breeding approaches for dissecting the complex quantitative traits in crop plants. **J. Biosc.**, v. 38, n. 5, p. 971-987, 2013;
- KUMAR, D. Salicylic acid signaling in disease resistance. **Plant Science**, v. 228, p. 127-134, 2014;
- KUSNIERZK, A. et al. Testing the importance of jasmonate signalling in induction of plant defences upon cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) attack. **BMC Genomics**, v. 12, n. 423, p. 1-16, 2011;
- LADEIRA, P. R. S. de; ISAAC, C. & FERREIRA, M. C. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. **Rev. Med.**, São Paulo, v. 90, n. 1, p. 47-51, 2011;
- LANTERI, S. et al. A first linkage map of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. scolymus L.) based on AFLP, S-SAP, M-AFLP and microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, p. 1532-1542, 2006;
- LARANJEIRA, F. F. et al. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, p. 61-104, 2005;
- LI, D. et al. Arabidopsis ABA receptor RCAR1/PYL9 interacts with an R2R3-Type MYB transcription factor, AtMYB44. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, p. 8743-8490, 2014;

LI, J.; BRADER, G. & PALVA, E. T. The WRKY70 Transcription Factor: A node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. **The Plant Cell**, v. 16, p. 319-331, 2004;

LILLY, S. T. et al. Identification and validation of reference genes for normalization of transcripts from virus-infected *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 3, p. 294-304, 2011;

LIMA, R. P. M. et al. Genetic linkage maps of Sunki mandarin and Poncirus trifoliata with DArT-seq markers. 2015, Foz do Iguaçu. In: **Anais...** Foz do Iguaçu, Brasil, n. 619, 2015;

LIU, B. H. **Statistical Genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis**. ed. CRC Press: Flórida, 1997, 648 p.;

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

LIU, D. et al. Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using Quantitative Real-Time PCR. **Plos One**, v. 7, n. 9, p. 1-14, 2012;

LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001;

LOBO, A. M. B. O. & LOBO, R. N. B. **Considerações estatísticas na análise de expressão gênica gerados pela técnica de RT-qPCR**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2014, 32 p.;

LORENZO, O. & SOLANO, R. Molecular players regulating the jasmonate signaling network. **Current Opinion Plant Biology**, v. 8, p. 532-540, 2005;

LORENZO, O. et al. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **Plant Cell**, v. 15, p. 165-178, 2003;

LORENZO, O. et al. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 16, p. 1938-1950, 2004;

LUKENS, L. & DOWNS, G. Bioinformatics techniques for understanding and analyzing tree gene expression data. **Genomics of Tree Crops**, p. 17-38, 2012;

LYONS, R.; MANNERS, J. M. & KAZAN, K. Jasmonate biosynthesis and signaling in monocots: a comparative overview. **Plant Cell**, v. 32, p. 815-827, 2013;

MACHADO, M. A.; CRISTOFANI-YALY, M. & BASTIANEL, M. Breeding, genetic and genomic of citrus for disease resistance. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 158-172, 2011;

MAFRA, V. et al. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. **Plos One**, v. 7, n. 2, p. 1-11, 2012;

MALUF, M. P. GUERREIRO FILHO, O. **Avaliação fenológica de frutos de café a partir da quantificação da expressão de genes marcadores: proposta de uma ferramenta complementar**. Brasília: Embrapa Café, 2011, 30 p.;

MANG, Hyung-G. et al. Absciscic acid deficiency antagonizes high-temperature inhibition of disease resistance through enhancing nuclear accumulation of resistance proteins SNC1 and RPS4 in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 24, p. 1271-1284, 2012;

MARGARIDO, G. R. A., SOUZA, A.P. & GARCIA, A. A. F. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. **Hereditas**, v. 144, p. 78-79, 2007;

MARTIN, R. R.; JAMES, D. & LÉVESQUE, C. A. Impact of molecular diagnostic technologies on plant diseases management. **Annual Rev. Phytopathology**, v. 38, p. 207-239, 2000;

MASAGO, H. et al. Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soil and plants. **Phytopathology**, v. 67, p. 425-428, 1977;

MATIELLO, R. R. **Patossistema milho x *Colletotrichum graminicola*: Estudo de herança, mapeamento de genes de resistência e estimativas de danos de produção**. 2004. 128 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2004;

MATIELLO, R. R.; BARBIERI, R. L. & CARVALHO, F. I. F. de. Resistência de plantas a moléstias fúngicas [Revisão Bibliográfica]. Santa Maria: **Ciência Rural**, v. 27, n. 1, p. 161-168, 1997;

MAUCH-MANI, B. & MAUCH, F. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. **Current Opinion Plant Biology**, v. 8, p. 409-414, 2005;

MEDINA FILHO, H. P. et al. Resistência de clones e híbridos de porta-enxertos de citros à gomose de tronco causada por *Phytophthora parasitica*. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 534-540, 2003;

MEDINA FILHO, H. P. et al. Resistência de híbridos e de clones de porta-enxertos de citros à infecção de raízes por *Phytophthora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 169-178, 2004;

MENEZES, H. Imunidade inata e específica em plantas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 195-212, 2009;

MENG, X. & ZHANG, S. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. **Annual Rev. Phytopathol.**, v. 51, n. 12, p. 1-22, 2013;

MEYERS, B. C. et al. Genome wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 809-834, 2003;

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada**. Belo Horizonte: UFMG, 2005, 297p.;

MOORE, D. S. **The Basic Practice of Statistics**. New York: W. H. Freeman & Company, 2007, 721 p.;

MORAES, M. L. T. et al. Demonstração da utilização do software SELEGEN para o melhoramento de espécies perenes. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 7, n. 12, 2008;

MOREAU, M.; TIAN, M. & Klessig, D. F. Salicylic acid binds NPR3 and NPR4 to regulate NPR1-dependent defense responses. **Cell Research**, v. 22, n. 12, p. 1631-1633, 2012;

NEVES, M. F. et al. **O retrato da citricultura brasileira**. 1. ed. Ribeirão Preto: 2010, v. 1, 137 p.;

NEVES, M. F.; JANK, M. S. & LOPES, F. F. **Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: A Agenda 2015**. Agroanalysis (FGV), v. 27, p. 3-5, 2007;

NOVAIS, C. M. & PIRES-JUNIOR, M. PCR em Tempo Real. **Rev. Biotec. Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, p. 10-13, 2004;

NURNBERGER, T. et al. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 249-266; 2004;

O'DONNELL, P. J. et al. Susceptible to intolerance – a range of hormonal actions in a susceptible Arabidopsis pathogen response. **Plant J.**, v. 33, p. 245-257, 2003;

OLIVEIRA, R. P. de et al. Melhoramento genético de plantas cítricas. Belo Horizonte: **Informe Agropecuário**, v. 35, n. 281, p. 22-29, 2014;

OLIVEIRA, R. P. de. Biologia molecular. In: CUNHA SOBRINHO, A. P. da et al. (Ed.). **Cultura dos citros**. Brasília: Embrapa Mandioca e Fruticultura, v. 1, n. 6, p. 161-172, 2013;

OLIVEIRA, R. P. do et al. **Porta-enxertos para citros**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008, 45 p.;

OSTENDOORP, M. et al. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 19-28, 2001;

Paran, I. & Zamir, D. Quantitative traits in plants: beyond QTL. **Trends In Genetics**, v. 19, n. 6, p. 303-306, 2003;

PARK, S. W. et al. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. **Science**, Washington, v. 318, p. 113-116, 2007;

PARMENTIER, I. et al. Candidate gene markers associated with somatotropic axis and milk selection. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 17, p. 139-148, 1999;

PASCHOLATI, S. F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agenes bióticos na proteção de plantas contra patógenos**. 1998. 123 p. Tese (Livre-Docência), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1998;

PEREIRA, T. B. **Seleção de progênies F₄ de cafeeiros utilizando o procedimento REML/BLUP**. 2012. 60 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia – Produção Vegetal), Universidade Federal de Lavras, 2012;

PIETERSE, C. M. J. et al. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 1571-1580, 1998;

PIETERSE, C. M. J. et al. Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Development Biology**, v. 28, p. 489-521, 2012;

PIETERSE, C. M. J. et al. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 13, p. 277-295, 2005;

PIETERSE, C. M. J. et al. Networking by small-molecules hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 5, p. 308-316, 2009;

POMPEU JUNIOR, J. & BLUMER, S. Híbridos de trifoliata como porta-enxertos para laranjeira Pêra. **Pesq. Agropec. Trop.**, v. 44, n. 1, p. 9-14, 2014;

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, p. 61-104, 2005;

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.C.P.; POMPEU JUNIOR, P.; AMARO, A.A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, v. 1, p. 265-280., 1991;

PUNJA, Z. K & ZHANG, Y. Y. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. **Journal of Nematology**, v. 25, n. 4, p. 526-540, 1993;

QUEIROZ, B. P. V. & MELO, I. S. Antagonism of *Serratia marcescens* towards *Phytophthora parasitica* and its effects in promoting the growth of citrus. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, p. 448-450, 2006;

RAPPA, C. (Ed.). Busca da qualidade é destaque no VII Dia da Tangerina. **Informativo Centro de Citricultura**, Cordeirópolis, n. 108, 2004;

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L. & CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatol. bras.**, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003;

RESENDE, M.D.V. Software SELEGEN–REML/BLUP. Curitiba: **Embrapa Florestas**, 2002, 67p (Documentos 77);

ROBB, J. et al. Arsenal of elevated defense proteins fails to protect tomato against *Verticillium dahliae*. **Planta**, v. 236, n. 2, p. 623-633, 2012;

ROBB, J.; LEE, B. & NAZAR, R.N. Gene suppression in a tolerant tomato-vascular pathogen interaction. **Planta**, v. 226, n. 2, p. 299-309, 2007;

ROSA, G. J. de M. Delineamento de experimentos em genética genômica. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 36, p. 211-218, 2007;

- Salvi, S. & Tuberosa, R. To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 6, p. 297-304, 2005;
- SAMBROOK, J. E. & RUSSEL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002, 2700 p.;
- SÁNCHEZ-SEVILLA, J. F. et al. Diversity Arrays Technology (DArT) marker platforms for diversity analysis and linkage mapping in a complex crop, the octoploid cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*). **Plos One**, v. 10, n. 12, p. 1-22, 2015;
- SANSALONI, C. Diversity Arrays Technology (DArT) and next-generation sequencing combined: genome-wide, high throughput, highly informative genotyping for molecular breeding of Eucalyptus. **BMC Proceedings**, v. 5, n. 7, p. 1-2, 2011;
- SANTOS, A. F. dos & LUZ, E. D. M. N. A gomose da acácia-negra no Brasil. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 113-118, 2007;
- SCHADT, E. E. Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. **Nature**, v. 422, p. 297-301, 2003;
- SCHENK, P. M. et al. Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. **PNAS**, v. 97, p. 11655-11660, 2000;
- SCHINOR, E. H. et al. Caracterização agronômica e molecular de acessos de *Citrus sunki* do Banco de Germoplasma de Citros do Centro APTA Citros Sylvio Moreira. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 32, n. 1, p. 27-37, 2011;
- SCHMITTGEN, T. D. & LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008;
- SCHWESSINGER, B. & ZIPFEL, C. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 4, p. 389-395, 2008;
- SELS, J. et al. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 941-950, 2008;
- SEMPIONATO, O. R.; STUCHI, E. S. & DONADIO, L. C. **Viveiro de citros**. Jaboticabal: Funep, 1997, n. 2, 37 p.;
- SHAH, J. & ZEIER, J. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 30, p. 1-16, 2013;
- SHI, C. et al. Identification of candidate genes associated with cell wall digestibility and eQTL (expression quantitative trait loci) analysis in a Flint x Flint maize recombinant inbred line population. **BMC Genomics**, v. 8, n. 22, p. 1-16, 2007;
- SILVA, J. F. V. Resistência genética de soja a nematoides do gênero *Meloidogyne*. In: FERRAZ, L. C. C. B. et al. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001, p. 95-127;
- SILVA, R. A. da et al. **Defesa de plantas contra o ataque a fitopatógenos**. Seropédica: Embrapa Agrícola, 2008, 49 p.;

SIVIERO, A. **Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* x *Poncirus trifoliata* à gomose.** 2001. 125 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Proteção de Plantas), Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, 2001;

SIVIERO, A. et al. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em plântulas e plantas jovens de citros. **Fitopatol. bras.**, v. 27, n. 6, p. 1-7, 2002a;

SIVIERO, A. et al. Identification of QTLs associated with citrus resistance to *Phytophthora gummosis*. **Journal of Applied Genetics**, v.47, n.1, p. 23-38, 2006;

SIVIERO, A. et al. Mapeamento de QTLs associados à produção de frutos e sementes em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 741-743, 2002b;

SIVIERO, A.; FURTADO, E. L. & MACHADO, M. A. Métodos de inoculação e avaliação de doenças causadas por *Phytophthora* em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 1, p. 203-219, 2002c;

SNUSTAD, D. P. & SIMMONS, M. J. **Fundamentos de genética.** 6 ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 739 p.;

SONG, J. T. et al. Overexpression of AtSGT1, an Arabidopsis salicylic acid glucosyltransferase, leads to increased susceptibility to *Pseudomonas syringae*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1128-1134, 2008;

SPIEGELAERE, W. D. et al. Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 1-13, 2015;

SPOEL, S. H. & DONG, X. How do plants achieve immunity? Defense without specialized immune cells. **Nature Reviews Immunology**, New York, v. 12, p. 89-100, 2012;

STAM, P. Construction of integrated genetic maps by means of a new computer package: JoinMap. **Plant Journal**, v. 3, p. 739-744, 1993;

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011;

STAUB, J.E; SERQUEN, F.C. & GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience**, Alexandria, v. 31, n. 5, p. 729-740, 1996;

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B. & MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 235-270, 1997;

SWINGLE, W.T. The botany of *Citrus* and its relatives. Revisão de Philip C. Reece. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J. & BATCHELOR, L.D. (eds.). **The citrus industry.** Berkeley, California: University of California, v. 1, n. 3, p. 190-430, 1967;

TALON, M. & GMITTER Jr., F. G. Citrus Genomics [Review Article]. **International Journal of Plant Genomics**, 2008, 17 p.;

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

TAO, Y. Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. **Plant Cell**, v. 15, p. 317-330;

TEIXEIRA, J. E. C. **Genes de defesa de Citrus sunki e Poncirus trifoliata: expressão constitutiva e induzida por Phytophthora parasítica**. 2005. 119 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Federal de Lavras, 2005;

THOMMA, B. P. H. J.; NURNBERGER, T. & JOOSTEN, M. H. A. J. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. **Plant Cell**, Rockville, v. 23, p. 4-15, 2011;

TIMMER, L. W. et al. Comparison of ELISA techniques and standard isolation methods for *Phytophthora* detection in citrus orchards in Florida and California. **Plant Disease**, v. 77, p. 791-796, 1993;

TOLEDO, E. R. de et al. Mapeamento de QTLs: uma abordagem Bayesiana. **Revista Brasileira de Biometria**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 117-114, 2008;

TON, J. et al. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in Arabidopsis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, n. 1, p. 27-34, 2002;

TRUDGILL, D. L. Resistance to and tolerance of parasitic nematodes in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 167-192, 1991;

TYLER, B. M. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. **Annual Review Phytopathology**, v. 40, p. 137-167, 2002;

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

VAN ESSE, H.P. et al. Tomato transcriptional responses to a foliar and a vascular fungal pathogen are distinct. **Mol. Plant-Microbe Interact**, v. 22, n. 3, p. 245-258, 2009;

VAN LOON, L. C. & VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999;

VAN WEES, S. C. M. et al. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, p. 8711-8716, 2000;

VAN WEES, S. C. M.; VAN DER ENT, S. & PIETERSE, C. M. J. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, p. 443-448, 2008;

VIVANCO, J. M. et al. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. **Investigación y Ciencia**, v. 1, p. 68-75, 2005;

VLOT, A.C et al. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 47, p. 177-206, 2009;

WANG, K. et al. SGT1 positively regulates the process of plant cell death during both compatible and incompatible plant–pathogen interactions. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 5, p. 597-611, 2010;

WASTERNAK, C. & HAUSE, B. Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals of Botany**, London, v. 111, p. 1021-1058, 2013;

WASTERNAK, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annali di Botanica**, Roma, v. 100, p. 681-697, 2007;

WENZL, P. et al. Diversity Arrays Technology (DART) for whole-genome profiling of barley. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 101, n. 26, p. 9915-9920, 2004;

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

WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M. & TIMMER, L.W. **Compendium of citrus diseases**. St. Paul: APS Press., 2000, 80p.

WIT, E. & MCCLURE, J. **Statistics for microarrays; design, analysis and inference**. Hoboken, EUA: John Wiley, 2004, 265 p.;

XIA, L. et al. DART for high-throughput genotyping of Cassava (*Manihot esculenta*) and its wild relatives. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, p. 1092-1098, 2005;

YAN, A. et al. General Method for QTL mapping in multiple related populations derived from multiple parents. **Rice Science**, v. 16, n. 1, 2009;

YELENOSKY, G.; BROWN, R.T. & HEARN, C.J. Tolerance of trifoliata orange selection and hybrids to freezes and flooding. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Orlando, Florida, v. 86, p. 99-104, 1974;

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

ZARPELON, T. G. et al. Genetic mapping and validation of QTLs associated with resistance to *Calonectria* leaf blight caused by *Calonectria pteridis* in *Eucalyptus*. **Tree Genetics & Genomes**, v. 11, p. 803-811, 2015;

ZENG, Z. B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v. 136, p. 1457-1468, 1994;

ZENTMYER, G. A. & MITCHELL, D. J. *Phytophthora* diseases of fruit trees in the tropics. **Rev. Trop. Plant Path.**, v. 2, p. 287-309, 1986;

ZHANG, Y. et al. Expression of RPS4 in tobacco induces an AvrRps4-independent HR that requires EDS1, SGT1 and HSP90. **Plant J.**, v. 40, p. 213-224, 2004;

ZULIAN, A.; DORR, A. C. & ALMEIDA, S. C. Citricultura e agronegócio cooperativo no Brasil. **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 11, p. 2290-2306, 2013;

ZURBRIGGEN, M. D.; CARRILLO, N. & HAJIREZAEI, M. R. ROS signaling in the hypersensitive response. When, where and what for? **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, p. 393-396, 2010.