

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

doutorado

BC/56556

IB/ 82029

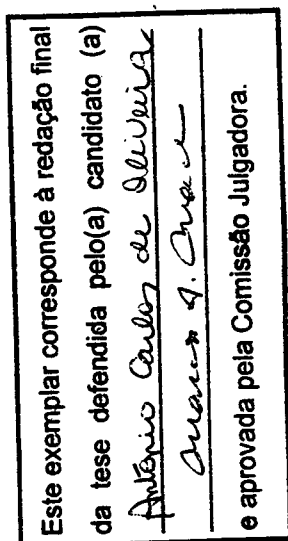
INSTITUTO DE BIOLOGIA



Antonio Carlos de Oliveira



**Clorose Variegada dos Citros:
quantificação molecular do agente causal,
avaliação de trocas gasosas de plantas infectadas e
mapeamento de locos de resistência quantitativa de
citros à *Xylella fastidiosa* Wells et al. (1987) com fAFLPs.**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas em cumprimento parcial aos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Vegetal e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Machado

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
2003

UNIDADE 13/82029
 Nº CHAMADA 12017
 V EX
 TOMBO BC/ 56556
 PROC. 16/124/03
 C ☐ D ☒
 PREÇO 264,00
 DATA 12/11/03
 Nº CPD

5.5.16 12.11.03

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

OL4c

Oliveira, Antonio Carlos de

Clorose variegada dos citros: quantificação molecular do agente causal, avaliação de trocas gasosas de plantas infectadas e mapeamento de locus de resistência quantitativa de citros à *Xylella fastidiosa* Wells (1987) com fAFLPs / Antonio Carlos de Oliveira.--
Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Marcos Antônio Machado

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

1. Mapeamento genético. 2. Melhoramento genético. 3. Diagnóstico.
I. Machado, Marcos Antônio. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA:

BANCA EXAMINADORA:

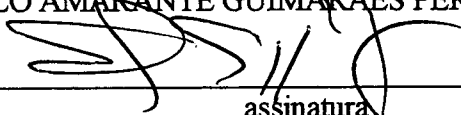
TITULARES:

Prof. Dr. MARCOS ANTÔNIO MACHADO, CAPTACSM/IAC (Orientador)



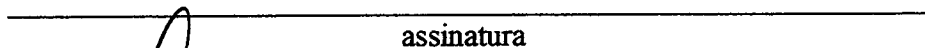
assinatura

Prof. Dr. GONÇALO AMARANTE GUIMARÃES PEREIRA, DGE/UNICAMP



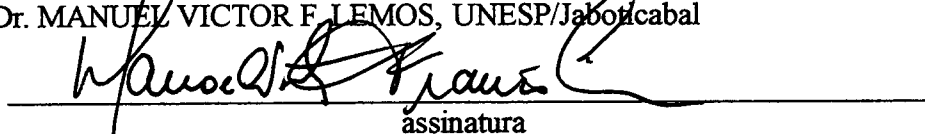
assinatura

Profa. Dra. YOKO BORATO ROSATO, CBMEG/UNICAMP



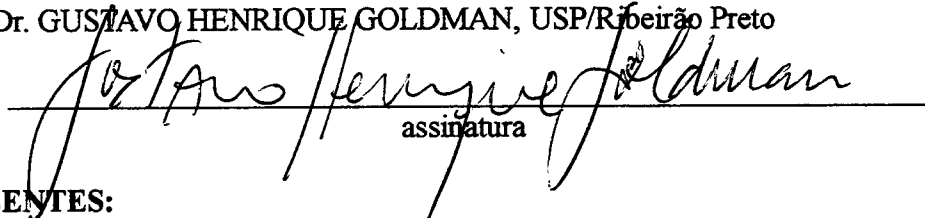
assinatura

Prof. Dr. MANUEL VICTOR F. LEMOS, UNESP/Jaboticabal



assinatura

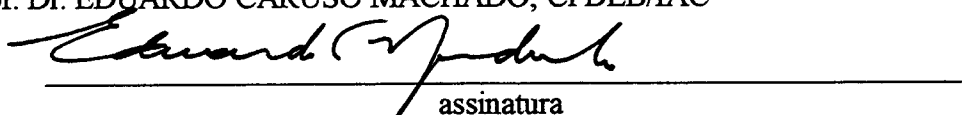
Prof. Dr. GUSTAVO HENRIQUE GOLDMAN, USP/Ribeirão Preto



assinatura

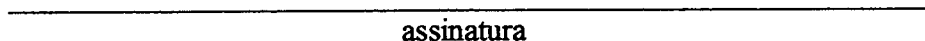
SUPLENTE:

Prof. Dr. EDUARDO CARUSO MACHADO, CPDEB/IAC



assinatura

Prof. Dr. CLAUDIO LUIZ MESSIAS, DGE/UNICAMP



assinatura

A meus pais, Mário e Aparecida;
pelo exemplo maior de trabalho e justiça
e pelas incansáveis batalhas travadas em prol de seus filhos,
que me servem de guia durante todos os dias.

A meu irmão, José Mário,
pela sua generosa amizade e imensa bondade para todos aqueles que o
cercam.

À minha sogra, D. Aparecida (*in memoriam*),
pelo exemplo de abnegação e perseverança.

À minha esposa, Verinha,
sem a qual o meu céu desabaria. Pelo seu apoio incondicional e pela
compartilha dessa aventura. À minha grande interlocutora intelectual,
para quem essa Tese é dedicada com amor e gratidão.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Todo o trabalho que realizamos está na dependência direta ou indireta do apoio e estímulo de pessoas e de instituições que nós acolhem como profissionais. Devo externar, dessa forma, meus agradecimentos a muitos e em especial:

Ao Dr. Marcos A. Machado, pela orientação, ensinamento, crédito e oportunidade de trabalho;

À UNICAMP, por me proporcionar uma excelente formação acadêmica no Mestrado e no Doutorado;

À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos (Processo Nº 98/06217-0);

Ao Dr. Joaquim Teófilo Sobrinho, ex-diretor do Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’/IAC, pela utilização dessa grandiosa infra-estrutura de pesquisa;

Ao Prof. Dr. Gustavo H. Goldman (USP/Ribeirão Preto), pelo suporte e estímulo fornecidos durante o desenvolvimento do ensaio de PCR quantitativo da *X. fastidiosa*;

Ao Dr. Eduardo C. Machado (CPDEB/IAC), pelo suporte e estímulo fornecidos durante a avaliação de trocas gasosas das plantas infectadas;

À Dra Mariângela Cristofani (EMBRAPA/IAC), pelo suporte e estímulo fornecidos durante a geração dos mapas genéticos;

Ao Prof. Dr. Luís E. Aranha Camargo (ESALQ/USP) por importantes comentários feitos durante o preparo da primeira versão do projeto de pesquisa da Tese de Doutoramento;

Aos Drs. Oliveira Guerreiro Filho e Walter J. Siqueira (IAC) e ao Prof. Dr Antonio Augusto F. Garcia (ESALQ/USP), pelas importantes discussões sobre a análise de dados;

Ao parecerista *ad hoc* da agência financiadora do projeto de pesquisa de Tese e aos ‘referees’ dos periódicos em que foram publicados alguns dos resultados deste trabalho, pelas importantes sugestões e comentários apresentados;

Ao Dr. Herculano P. Medina Filho (Centro de Café/IAC) e à Profa. Dra. Laura M. M. Otobboni (CBMEG/UNICAMP), pelas importantes sugestões e comentários apresentados durante a análise da pré-banca da Tese;

Aos Profs. Drs. Eduardo C. Machado (IAC), Gonçalo A. G. Pereira (UNICAMP), Gustavo H. Goldman (USP) e Manuel Victor F. Lemos (UNESP), pelas importantes sugestões e opiniões apresentadas por ocasião da defesa desta Tese;

A Édson F. Araújo, Valdenice M. Novelli (UEFS/BA) e Maria Júlia Corazza-Nunes, William M. C. Nunes (UEM/PR), pelo espontâneo coleguismo acadêmico, determinante para o meu aprendizado das atividades laboratoriais;

A Camile P. Semighini (USP/Ribeirão Preto), Camilo L. Medina e Marinês Bastianel (IAC), que me permitiram aproveitar de suas experiências de vida;

Aos Profs. Drs. João R. S. Lopes (ESALQ) e Anete Pereira de Souza (UNICAMP) pelos treinamentos da inoculação da bactéria e geração de marcadores AFLPs em seus laboratórios, respectivamente;

A Helvécio D. Coletta Filho e Camila Caldana (IAC), pelo treinamento da multiplicação *in vitro* de *X. fastidiosa*. A Valdenice M. Novelli (UEFS/BA) e Milena de L. A. Lima (UNICAMP), pelo treinamento na geração de marcadores SSR e AFLP, respectivamente;

Aos Profs. Drs. Marcelo G. Canteri (UEPG/PR) e Valério P. Pillar (UFRGS/RS) pela utilização dos aplicativos estatísticos *SASM-Agri* e *MULTIV*, respectivamente, e o auxílio fornecido na interpretação dos dados;

A Alexandre M. Amaral (EMBRAPA/IAC), Fernando G. Júnior (CEFET/MG), Gustavo Astua-Monge (IAC) e Lígia F. Paoletti (IEL/UNICAMP), pelo auxílio na revisão e tradução de textos em Inglês;

À Doutoranda Vera Pacheco, pela leitura dos textos em Português;

Aos pesquisadores, funcionários e estagiários do CAPTACSM, em especial a Francisco F. Laranjeira, Débir N. Gomes e Aristides N. Garcia pelo respeito e amizade;

Ao casal Dona Chica e Sr. Adão, funcionários do CAPTACSM, por quem admiro pela dedicação ao trabalho;

Ao Dr. Paulo R. Dipe (UNIP/Campinas), pela recente, mas promissora amizade;

Aos Profs. Drs. Claudia R. B. Haddad (UNICAMP), Daniel S. Pimenta (UFJF/MG) e aos Drs. Reinaldo P. Ferreira (EMBRAPA) e Walter J. Siqueira (IAC), por serem amigos e solícitos em momentos importantes de minha vida acadêmica;

Aos amigos de Graduação em Biologia (UFJF/MG), que tanto me fazem falta, em especial a Gisele C. Almeida, Laudelino Kerpp e Regina I. P. Freitas, por tudo que se aprendeu naqueles ótimos anos de estudo.

*“A ciência se parece um pouco com aquela
piada do bêbado que está procurando debaixo
de um poste a chave que ele perdeu do outro
lado da rua, porque é ali que a luz está.
Não há outra escolha.”*

Noam Chomsky

*“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e
infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”*

Albert Einstein

Lista de Abreviaturas:

A: taxa de assimilação fotossintética líquida de CO₂

ABA: ácido abscísico

AG: ácido giberélico

AIA: ácido indol acético

APM: análise pontual de marcadores

BSA: bulked segregant analysis

CAPTACSM: Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’

CVC: clorose variegada dos citros

DIBA: dot immunobinding assay

DNA: ácido desoxirribonucléico

DPP: doença do ‘phony’ em pessegueiro

DPV: déficit de pressão de vapor

DPV: doença de pierce da videira

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ERIC-PCR: Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR

fAFLP: fluorescent amplified fragment length polymorphism

FRET: Förster resonance energy transfer

GL: grupo de ligação

gs: condutância estomática

ISSR: inter-simple sequence repeat

MIC: mapeamento por intervalo composto

MIC: mapeamento por intervalo composto

MIM: mapeamento por intervalo múltiplo

MIS: mapeamento por intervalo simples

nt: nucleotídeo

ORF: open readin frame

PCR: polymerase chain reaction

QRL: quantitative resistance loci

QTL: quantitative trait loci

RAPD: random amplified polymorphic DNA

RC: retrocruzamento
REP-PCR: repetitive extragenic palindromic PCR
RFC: requeima da folha do cafeeiro
RFLP: restriction fragment length polymorphism
RTQ-PCR: real-time quantitative PCR
SSR: simple sequence repeat
TGH: transferência gênica horizontal
TM: taxa multiplex
TME: taxa multiplex efetiva
TMM: taxa multiplex mapeada
VNTR: variable number of tandem repeats
Xcc: *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*
Xf: *Xylella fastidiosa*
Xf/CVC: *Xylella fastidiosa* causadora da CVC
Xf/DPV: *Xylella fastidiosa* causadora da DPV
Xf/RFC: *Xylella fastidiosa* causadora da RFC
 ψ a: potencial da água

SUMÁRIO

Parte	Página
1. RESUMO.....	xi
2. SUMMARY.....	xiii
3. INTRODUÇÃO.....	1
4. OBJETIVOS GERAIS.....	7
5. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
5.1. A <i>Xylella fastidiosa</i>	9
5.2. A clorose variegada dos citros.....	25
5.3. Construção de mapas genéticos em citros.....	43
5.4. Genes de resistência de plantas a fitopatógenos.....	65
5.5. A geração de marcadores moleculares AFLP.....	69
5.6. Detecção e quantificação de bactérias fitopatogênicas por meio de PCR quantitativo em tempo real.....	75
6. CAPÍTULOS.....	83
1. <u>Identification of sexual and nucellar <i>Citrus</i> seedlings through single and duplex PCR of simple sequence repeat locus.....</u>	83
2. <u>Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers.....</u>	89
3. <u>In vitro rescue of embryos of <i>Citrus</i> and identification of hybrids by morphometric feature and molecular markers.....</u>	97
4. <u>Adaptation of minipreps-SDS and single-step in the extraction of citrus DNA for PCR analyses.....</u>	101
5. <u>Quantification of <i>Xylella fastidiosa</i> from citrus trees by Real-Time Polymerase Chain Reaction assay.....</u>	105
6. <u>Mapeamento genético de marcadores fAFLPs em uma progênie BC₁ entre variedades cítricas resistente e suscetível à <i>Xylella fastidiosa</i> Wells (1987).....</u>	113
7. <u>Mapeamento genético de QRLs de citros à <i>Xylella fastidiosa</i>, agente causal da clorose variegada dos citros.....</u>	163
7. CONCLUSÕES GERAIS.....	229
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	233
8. RELAÇÃO DE ATIVIDADES ACADÊMICO-CIENTÍFICAS DESENVOLVIDAS PELO CANDIDATO DURANTE O DOUTORADO.....	283

Clorose Variegada dos Citros: quantificação molecular do agente causal, avaliação de trocas gasosas de plantas infectadas e mapeamento de locos de resistência quantitativa de citros à *Xylella fastidiosa* Wells (1987) com fAFLPs.

Autor: ANTONIO CARLOS DE OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. MARCOS ANTÔNIO MACHADO

1. RESUMO

Este trabalho objetivou construir mapas genéticos de *amplified fragment lenght polymorphism* (AFLP) de tangor ‘Murcott’ [*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osb.] e laranja doce ‘Pêra’ [*C. sinensis* (L.) Osb.] e desenvolver *real-time quantitative* PCR (RTQ-PCR) para a *Xylella fastidiosa* (*Xf*) Wells (1987) causadora da clorose variegada dos citros (CVC). Genotipagem de 312 híbridos BC₁ dessas variedades foi realizada por análise (i) fingerprinting de *simple sequence repeat* (SSR), empregando-se extração *single-step* de DNA de citros; e (ii) visual, por índice morfométrico do ápice foliar, ambos descritos neste trabalho. Progenie de 87 híbridos foi submetida a *fingerprinting* AFLP, amplificado por *primers* *EcoRI* e *MseI* e visualizado por fluorescência (fAFLPs). Mapas para os parentais foram construídos pelo software Mapmaker (LOD score $\geq 3,0$ e $\theta \leq 0,40$) com 121 fAFLPs de segregação mendeliana 1:1 [mapa ‘Murcott’: 65 marcadores, 9 grupos de ligação (GLs), tamanho total de 1651,47 cM e intervalo entre marcadores de 29,5 cM; mapa ‘Pêra’: 55 marcadores, 5 GLs, 1596,2 cM e 31,9 cM]. Adicionalmente, mapa para tangor ‘Murcott’ foi construído pelo software JoinMap (LOD score $\geq 3,0$ e $\theta \leq 0,25$) com fAFLPs de segregação 1:1 e 3:1 (227 marcadores; 9 GLs; 845 cM e 4,25 cM). Quanto ao RTQ-PCR, foram desenvolvidos *primer* (CCSM-1) e sonda (TAQCVC) específicas para as estirpes da *Xf* causadora da CVC (*Xf*/CVC). Foi demonstrada especificidade desse protocolo à estirpes de *Xf*/CVC, validação da classificação de resistência e suscetibilidade de ‘Murcott’ e ‘Pêra’ à *Xf* e possível distribuição espacial e temporal da *Xf* no interior das folhas de citros. Adicionalmente, diferentes níveis de resistência foram detectados na progenie e nos parentais após inoculação artificial com *X. fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987). Níveis de

resistência foram determinados pela mensuração da performance de trocas gasosas de plantas sob condições controladas usando analisador infra-vermelho portátil de trocas gasosas (Li 6400 - LICOR), e pela determinação da concentração de *X. fastidiosa* no xilema foliar por meio de PCR quantitativo em tempo real (RTQ-PCR). Medidas dessas variáveis e o emprego do programa QTL Cartographer v.2.0 permitiram determinar a posição de dois loci de resistência quantitativa (QRL) e de seis putativos QRLs (pQRLs) associados com a resistência à *X. fastidiosa* em citros. A identificação desses QRLs/pQRLs poderão ser úteis para a identificação precoce de híbridos que exibam resistência à CVC por meio de seleção assistida por marcadores. Trabalhos futuros que envolvam a geração de mapas genéticos de elevada densidade permitirão a clonagem dos genes responsáveis por essa resistência e sua transferência para outras variedades cítricas.

Palavras-chave: citros, *Xylella fastidiosa*, mapeamento genético, locus de resistência quantitativa

Citrus Variegated Chlorosis: molecular quantification of causal agent, evaluation of gas exchange of infected plants, and mapping of citrus quantitative resistance loci at *Xylella fastidiosa* Wells (1987) with fAFLPs.

Author: ANTONIO CARLOS DE OLIVEIRA

Advisor: Prof. Dr. MARCOS ANTÔNIO MACHADO

2. SUMMARY

The aims of this study were to build genetic maps of amplified fragment-length polymorphism (AFLP) of 'Murcott' tangor [*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osb.] and 'Pêra' sweet orange [*C. sinensis* (L.) Osb.] and to investigate the development of real-time quantitative PCR (RTQ-PCR) to *Xylella fastidiosa* (*Xf*) responsible for the citrus variegated chlorosis (CVC). Genotyping of 312 BC₁ hybrids of those varieties were accomplished by the following analysis: (i) simple sequence repeat (SSR) fingerprinting, by using a single-step DNA extraction of citrus; and (ii) visual evaluation, through a leaf apex morphometric index. The progeny of 87 hybrids was submitted to the AFLP fingerprinting, amplified by primers *Eco*RI and *Mse*I and visualized by fluorescence (fAFLPs). Maps for the parents were built by the Mapmaker software (LOD score ≥ 3.0 and $\theta \leq 0.40$) with 121 fAFLPs of 1:1 Mendelian segregation ['Murcott' map: 65 markers, 9 linkage groups (LGs), total size of 1,651.47 cM and interval among markers of 29.5 cM; 'Pêra' map: 55 markers, 5 LGs, 1,596.2 cM and 31.9 cM]. Additionally, the map for 'Murcott' tangor was built by the JoinMap mapping software (LOD score ≥ 3.0 e $\theta \leq 0.25$) with fAFLPs of segregation 1:1 and 3:1 (227 markers; 9 LGs; 845 cM and 4.25 cM). Regarding the RTQ-PCR, a specific primer (CCSM-1) and a probe (TAQCVC) were developed for strains of *Xf*, causal agent of CVC (*Xf*/CVC). It was demonstrated the specificity of the protocol to strains of *Xf*/CVC, validation of the resistance and susceptibility classification of 'Murcott' and 'Pêra' to *Xf*, and possible temporal and spatial distribution patterns of the bacterium into citrus leaves. In addition, different levels of resistance were assessed in the progeny and the parental lines after artificial inoculation with *X. fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987). Such

levels were determined by both measuring performance of gas exchange of plants under controlled conditions, using a portable gas exchange infrared analyzer (Li 6400 - LICOR), and by determining the *X. fastidiosa* concentration in the leaf xylem through real-time quantitative PCR (RTQ-PCR). Measurements of those variables and the use of QTL Cartographer v.2.0 allowed us to determine the position of two quantitative resistance loci (QRLs) and six putative QRLs (pQRLs) associated with resistance to *X. fastidiosa* in citrus. The identification of those QRLs/pQRLs could be useful for the early identification of hybrids exhibiting resistance to CVC through marker-assisted selection. Future work involving the generation of a high density genetic map would allow the cloning of the genes responsible for that resistance and their transfer to other citrus varieties.

Key-words: citrus, *Xylella fastidiosa*, genetic maps, quantitative resistance loci

3. INTRODUÇÃO

Dentre os âmbitos da atual agroindústria brasileira, a cultura de citros (*Citrus spp.*) distingue-se pela sua expressiva importância sócio-econômica. Alavancada pelo mercado externo, a citricultura cresce desde os anos 60 (Moreira & Moreira, 1991), respondendo o Brasil, sozinho, por 30% da produção mundial de laranja [*C. sinensis* (L.) Osb.] (ABECITRUS, 2003). Algo em torno de 60% da produção é exportada sob a forma de suco, gerando divisas de US\$ 1,5 bilhão/ano (Ministério..., 2000).

O parque citrícola paulista, constituído de 200 milhões de árvores e ocupando uma área de 800.000 ha, responde por 76% da produção do país (Amaro, 1999) e encontra-se firmado na exportação de suco. Sua importância sócio-econômica é refletida no número de propriedades rurais (30.000) e de cidades (167) em que se encontra instalado (Mutton & Senhorini, 1993).

Embora o Brasil possua condições adequadas ao cultivo de citros, a produtividade média obtida por planta/safrá é de 90 Kg, bem menor que os 240 Kg obtidos na Florida/USA, 2º maior centro produtor mundial (FAO, 1999). A supremacia brasileira na produção de citros é estabelecida em função da constante expansão das áreas de cultivo, não havendo paralelo quanto ao aumento na produtividade por árvore. Concorrem para esses baixos patamares de produtividade fatores abióticos (clima, fertilidade do solo e irrigação) e bióticos (combinações copa/porta-enxerto e, principalmente, pragas e doenças) que, atuando isolada ou conjuntamente, constituem fatores limitantes à citricultura (Machado, 1992).

A expansão acelerada da área de cultivo de citros acarreta constantes desafios fitossanitários (Machado, 1992). O histórico da citricultura é assinalado por uma sucessão de doenças acarretadas por diferentes agentes etiológicos, sendo descritas mais de 30 doenças (Whiteside *et al.*, 1996). Na citricultura brasileira, um dos principais problemas fitossanitários é a clorose variegada dos citros (CVC) (Feichtenberger *et al.*, 1997), acarretada pela *Xylella fastidiosa* Wells (1987) [*Xf*] (Chang *et al.*, 1993).

A CVC foi detectada em 1987 em pomar de laranja ‘Pêra’ enxertada sobre limão ‘Cravo’ em Macaúbal, região centro-oeste do estado de São Paulo e posteriormente no Triângulo Mineiro (Rossetti *et al.*, 1990b; Salva *et al.*, 1995). Com o progresso

avassalador dessa bacteriose, a citricultura paulista passa pela sua pior fase desde a epidemia do vírus da tristeza, que quase a dizimou na década de 40 (Moreira & Pio, 1991).

A CVC é uma doença limitante, i.e., não mata a planta (Paiva *et al.*, 1996), embora acometa folhas, ramos e frutos severamente em laranjeiras doce, acarretando danos na produção (Laranjeira, 1997b). Árvores sintomáticas produzem frutos pequenos (77 g, contra 203 g, em média, de frutos sadios) de casca enrijecida, inviáveis para o consumo ‘*in natura*’ e/ou extração de suco (Beretta *et al.*, 1993), acarretando perdas de 30% da produção (AGRIANUAL, 1999). A incidência da CVC vem crescendo nos últimos anos no parque citrícola paulista, de 22% em 1996 para 34% em 2000, perfazendo 68 milhões de plantas afetadas pela doença. Os prejuízos ultrapassaram US\$ 100 milhões à cadeia produtiva de citros de São Paulo em 2000, quando considerados o controle de insetos vetores, poda de plantas contaminadas, redução da produção comercial e replantio de pomares com plantas certificadas, isentas da bactéria (Ayres, 2001).

Apesar do seqüenciamento do genoma da *Xf* causadora da CVC (*Xf/CVC*) (Simpson *et al.*, 2000), não há medidas de controle que possam ser recomendadas para o patossistema (Leite *et al.*, 2001).

Doenças bacterianas podem ser controladas fitossanitária (convivência e/ou combate), biológica e/ou geneticamente (Sigee, 1993). Medidas de convivência com a *Xf* visa a reduzir o potencial de pressão de inóculo da bactéria por meio da erradicação de plantas daninhas, plantas de citros sintomáticas com até 1,5 ano de idade e de plantas com produção de frutos miúdos, com 2 a 4 anos de idade (Garcia Jr. *et al.*, 1995). Poda de ramos afetados é indicada para plantas mais velhas, com o mesmo objetivo. Contudo, essa medida é trabalhosa e ineficiente, já que devido ao movimento sistêmico e irregular da *Xf* no interior da planta, a poda pode não ser totalmente eficaz (Coletta Filho *et al.* 1997). Poda de ramos e erradicação de plantas daninhas não resultou diferenças em relação à produtividade para laranja ‘Valência’ (Roberto & Carlos, 1999). Por sua vez, plantio de mudas isentas da *Xf* concorre para a redução da pressão de inóculo no campo (Carvalho & Laranjeira, 1994), mas não garante que as mudas permanecerão livres da bactéria, indefinidamente.

Abordagens fitossanitárias de combate à CVC vêm sendo também experimentadas. O controle químico da *Xf* e de seus insetos vetores, por meio de aplicação de antibióticos e inseticidas visam, respectivamente, à redução da população de fitopatógenos e de insetos vetores. Emprego de bactericida se mostra, contudo, economicamente inviável (Laranjeira, 1997c), podendo levar ao surgimento de estirpes resistentes da bactéria. A aplicação de inseticidas, apesar de controlar satisfatoriamente a população de cigarrinhas, não encontra efeito na redução do progresso das doenças causadas por *Xf* (Laranjeira, 1997c).

Com referência ao controle biológico da *Xf*/CVC, constatou-se certa relação entre ausência de sintomas da CVC e isolamento de *Curtobacterium flaccumfaciens* em plantas assintomáticas de citros infectadas (Araújo *et al.*, 2002). A natureza antagônica desse microorganismo à *Xf*/CVC, se confirmada em diferentes condições de campo do parque citrícola brasileiro, poderá conferir algum grau de resistência de plantas cítricas à CVC.

Considerando o caráter sistêmico da *Xf*, o que torna extremamente difícil o seu controle e, que as medidas químicas e fitossanitárias visam à redução temporária do potencial de pressão de inóculo, com vistas a reduzir as taxas de progresso epidemiológico da CVC (Donadio & Moreira, 1997; Feichtenberger *et al.*, 1997), a obtenção de plantas dotadas de resistência genética à *Xf* é preconizada como a alternativa racional de controle dessa bacteriose. Esforços em programas de melhoramento visando à resistência ou à tolerância à *Xf* vêm sendo perseguidos nos diferentes patossistemas em que essa bactéria está envolvida (Norton, 1986; Gould *et al.*, 1991; Mortensen *et al.*, 1977). Em se tratando do patossistema *Xylella*-Citros, há enorme demanda de variedades resistentes, de modo a assegurar a continuidade da atividade citrícola (Rodas, 1994). Genótipos resistentes à CVC podem ser alcançados através da exploração da variabilidade genética disponível em germoplasmas por meio de seleção massal de ramos/plantas, oriundos de mutações genéticas espontâneas, assintomáticas em pomares altamente contaminado com a doença, ou através de melhoramento genético (Machado *et al.*, 1994).

A avaliação de germoplasma disponível no Brasil não detectou resistência à *Xf* entre os acessos de laranja doce (Li, 1997; Laranjeira *et al.*, 1998a), espécie em que a

CVC é mais severa. Por sua vez, revelaram-se como plantas-escape materiais tidos como “resistentes”, selecionados em pomares com CVC de diferentes regiões do parque citrícola paulista (Machado, M.A.; comunic. pessoal, 2002).

Mesmo já tendo sido gerados alguns híbridos resistentes à *Xf* (Laranjeira, 1997b), o melhoramento genético não resultou, até o momento, em híbridos de laranja doce resistentes a esse fitopatógeno (Mourão Filho *et al.*, 1997), incluindo a variedade laranja ‘Pêra’ que ocupa 41% dos pomares de São Paulo (Amaro *et al.*, 1997). Hibridação natural pode resultar híbridos de laranja doce resistentes à *Xf*, como é o caso do tangor ‘Victória’, híbrido entre tangerina [*C. reticulata* Blanco] e laranja, descoberto em um pomar paulista. Esse híbrido apresenta tolerância à CVC, além de características horticulturais de copa similares às de laranja doce e produção de suco em quantidade e qualidade satisfatórias (Li *et al.*, 2000)

A exploração da hibridação controlada em citros, para fins de melhoramento, depara-se com os entraves biológicos de depressão por endogamia, esterilidade, heterozigosidade elevada, incompatibilidade, longo ciclo reprodutivo e de juvenilidade das plantas, natureza poliembriônica nucelar e poliploidia (Davies & Albrigo, 1994), o que dificulta a hibridação em larga escala e a determinação da herança genética de características, tornando descontínuo e/ou extremamente demorado o melhoramento genético em citros (Grosser & Gmitter Jr., 1990).

O tempo requerido na geração de híbridos de citros resistentes à *Xf* pode ser abreviado através do emprego de marcadores moleculares em diferentes etapas de programas de melhoramento genético, tais como (i) no rápido estabelecimento de populações segregantes de cruzamentos entre materiais genéticos promissores; (ii) no mapeamento genético de QRLs (“Quantitative Resistance Loci”) de citros à *Xf* e (iii) na seleção assistida por marcador de híbridos portadores de QRLs à *Xf*.

Considerando que a síntese de híbridos de citros requer escolha de parentais com caracteres favoráveis ao melhoramento genético (Hearn *et al.*, 1974), e que, uma vez selecionado um híbrido resistente à *Xf*, este deva ter interesse comercial (Mourão Filho *et al.*, 1997), cruzamentos entre laranja ‘Pêra’ e variedades híbridas de tangerina e laranja, como é o caso do tangor ‘Murcott’, constituem materiais genéticos fortemente promissores.

Em se tratando da laranja 'Pêra', sua indicação se deve à sua elevada importância econômica dentro do agronegócio citrícola, face à sua excelente qualidade de suco. Infelizmente, essa variedade de laranja doce apresenta elevado grau de suscetibilidade à *Xf* (Laranjeira *et al.*, 1998a). Por sua vez, tangor 'Murcott' é uma variedade reconhecidamente resistente à *Xf* (Laranjeira *et al.*, 1998a), além de possuir excelentes características hortícolas, o que a torna uma das frutas cítricas de maior consumo *in natura* (Figueiredo *et al.*, 1997).

Assim, síntese e seleção de novos genótipos de citros que combinem qualidade de fruta e resistência à *Xf* poderiam ser amplamente aceitos por parte do produtor rural, já que apresentaria qualidades similares da variedade majoritária no mercado, inclusive na ausência da doença, além de ser uma medida de controle acessível economicamente a todos citricultores e de reduzir a poluição ambiental com inseticidas (Reifschneider & Lopes, 1998).

Disso se conclui que o incremento de programas de melhoramento genético, visando à resistência à *Xf* em variedades híbridas de laranja doce, a partir da adoção combinada de tecnologia de marcadores moleculares e de estratégias de avaliação precoce de resistência de citros à *Xf* concorre para a agilização da síntese e identificação de híbridos de laranja doce resistentes à *Xf*. Programas de melhoramento tendo por base populações de híbridos de laranja 'Pêra' e tangor 'Murcott' podem resultar genótipos que mantenham a qualidade de fruta, proveniente da laranja 'Pêra', e que seja incorporado resistência à *Xf*, resultante de tangor 'Murcott', à semelhança do que foi obtido pela natureza em tangor 'Vitoria'. Novos genótipos híbridos de 'Murcott' x 'Pêra' podem vir a se tornar, após testes de resistência à bactéria sobre pressão de inóculo de campo, variedades comerciais de laranja resistentes à *Xf*.

4. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho objetivou identificar e localizar QRLs de citros à *Xf*. A Tese é dividida em sete capítulos. Nos três primeiros descrevem-se os procedimentos adotados na identificação de híbridos BC₁ entre tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’, por meio de marcadores microssatélite (Capítulo 1), índice morfométrico foliar (Capítulo 2) e resgate *in vitro* de embriões (Capítulo 3), requeridos para constituir a população-mapa. No Capítulo 4 relatam-se as adaptações de rápidos *minipreps* para extração de DNA de citros. No Capítulo 5 descreve-se o desenvolvimento de ensaio RTQ-PCR para *X. fastidiosa*. No Capítulo 6 é descrita a geração de marcadores fAFLP polimórficos a partir dos indivíduos da população-mapa, cujo *fingerprinting* molecular foi empregado na construção de mapas genéticos de ligação referentes aos parentais ‘Murcott’ e ‘Pêra’. No Capítulo 7 são relatados os resultados referentes ao mapeamento genético de QRLs de citros à *Xf*.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1. A *Xylella fastidiosa*

Histórico, Taxonomia e Hospedeiros

A *Xylella fastidiosa* Wells (1987) [*Xf*] é uma bactéria fitopatogênica de específica colonização de traqueídeos e vasos constituintes do xilema em raízes, caules, folhas e frutos (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996; Beretta *et al.*, 1996). A *Xf* tem uma ampla faixa de hospedeiros, com uma extensa distribuição geográfica (Américas e parte da Ásia), e induz diversas doenças (Van Sluys *et al.*, 2003).

O primeiro relato de doença provocada pela *Xf* data do século XIX, em videira (Pierce, 1892). Acreditava-se que a doença de Pierce de videira (DPV) tivesse etiologia viral, dado o comprometimento do sistema vascular das plantas e sua transmissão por insetos vetores (Purcell & Hopkins, 1996). Com a detecção de organismos tipo Rickettsia (Goheen *et al.*, 1973; Hopkins & Mollenhauer, 1973) e o isolamento em meio de cultura axênico complexo de uma bactéria XLB (“*xylem-limited bacteria*”) a partir de videiras infectadas (Davis *et al.*, 1978), a hipótese da natureza viral da doença foi descartada.

Na década de 80, verificou-se, por meio de polimorfismo de DNA, que a bactéria causadora da DPV não pertencia à Família Rickettsiaceae, sendo taxonomicamente descrita como pertencente ao Grupo Proteobacteria, sub-divisão Gama, Ordem Lysobacteriales, Família Lysobacteriaceae, gênero *Xylella*, o qual inclui somente a *Xylella fastidiosa*, relacionada geneticamente às bactérias do grupo *Xanthomonas* (Wells *et al.*, 1987). A *Xf* é uma bactéria aeróbia estrita, aflagelada, apigmentada, baciliforme (1-4 µm de comprimento por 0,25-0,50 µm de diâmetro), gram-negativa e se caracteriza, especificamente, pela sua parede celular ondulada formada por três camadas de membranas (Chagas *et al.*, 1992). É também identificada por não esporular, não formar halo e por não se movimentar, sendo positiva para a catalase e hipurato e negativa para amilase, β-galactosidase, fosfatase, H₂S, indol, lipase e oxidase (Purcell *et al.*, 1979; Wells *et al.*, 1987; Hopkins, 1989; Lima, 1995).

A maioria das plantas superiores é hospedeira da *Xf*. Estirpes *Xf*/DPV foram transmitidas por insetos vetores a 75 das 100 espécies testadas, incluindo 28 famílias de mono e dicotiledôneas. A maioria das plantas colonizadas pela *Xf* foi assintomática (Freitag, 1951).

A *Xf* causa sérios danos a importantes culturas (Raju & Well, 1986; Hopkins, 1989; Timmer *et al.*, 2000). As principais doenças incluem (i) atrofia da vinca (McCoy *et al.*, 1978), erva 'ragweed' (Timmer *et al.*, 1983); (ii) declínio em carvalho (Hearon *et al.*, 1980); (iii) escaldadura da folha da ameixeira (Kitajima *et al.*, 1975); (iv) requeima da folha da amendoeira (Mircetich *et al.*, 1976), amoreira vermelha (Kostka *et al.*, 1986), árvores lenhosas ["sugar maple" (Hartman & Jarlfours, 1996), "red maple" (Sherald *et al.*, 1987) e "sweetgum" (Hartman & Jarlfours, 1996)], cafeeiro (Paradela Filho *et al.*, 1995), elmo americano (Hearon *et al.*, 1980), hibisco (Kitajima *et al.*, 2000), pereira chinesa (Leu, 1993), plátano (Sherald *et al.*, 1983), videira (Goheen *et al.*, 1973); (v) redução de porte em alfafa (Goheen *et al.*, 1973) e pessegueiro (Hopkins *et al.*, 1973b) e (vi) clorose variegada em citros [CVC] (Rossetti *et al.*, 1990a).

No Brasil, além de citros e café, a *Xf* causa doenças em outras plantas cultivadas como ameixeira (French & Kitajima, 1978), hibisco (Kitajima *et al.*, 2000) e vinca (Ueno *et al.*, 1998). É constatada a sua multiplicação em seringueira (Fonseca *et al.*, 2001) e em dezenas de plantas invasoras de pomares de ameixeira (Leite *et al.*, 1997) e de citros (Harakawa *et al.*, 1994b; Traversolo *et al.*, 1996; 1999; Lopes *et al.*, 1999; Traversolo & Leite Jr., 1996; Rossetto & Duarte, 2001), muitas delas cosmopolitas no Brasil.

A *Xylella fastidiosa* e a CVC

A CVC foi observada pela primeira vez no Brasil em 1987 em variedades comerciais de laranja doce (Rossetti *et al.*, 1990b). À semelhança de outros patossistemas em que a *Xf* está envolvida, a doença provocada por essa bactéria em citros foi interpretada, inicialmente, como sendo devida à etiologia viral (Rossetti *et al.*, 1997) ou a desequilíbrios nutricionais (Malavolta & Prates, 1991; Malavolta *et al.*, 1992; Costa *et al.*, 1992). Essas hipóteses iniciais foram abandonadas com a constatação microscópica de grandes quantidades de bactéria de morfologia similar à *Xf* no interior

de vasos do xilema em plantas com CVC (Rossetti *et al.*, 1990a). Seguindo-se os estudos de microscopia (Rossetti *et al.*, 1990a; Chagas *et al.*, 1992), a *Xf* é isolada de plantas com CVC (Leite Jr & Leite, 1991) e, finalmente, com o re-isolamento de estirpe de *Xf* de tecidos de plantas sintomáticas artificialmente infectadas, completam-se os Postulados de Koch quanto à natureza etiológica da CVC (Chang *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993; Hartung *et al.*, 1994).

Detecta-se a *Xf* em folhas, ramos, frutos (mesocarpo, eixo central e endocarpo), raízes, diferentes partes das sementes (testa, tegma, cotilédone e embrião) (Scherer *et al.* 2000; Pria Jr., 2000; He *et al.*, 2000), o que demonstra que a bactéria é transportada e/ou migra para todas as regiões xilemáticas da planta.

A *Xf* (estirpe 9a5c, isolada de laranja ‘Valência’) é o primeiro fitopatógeno cujo genoma foi totalmente seqüenciado (Simpson *et al.*, 2000). Seu genoma é constituído de 2.679.305 pb, constituído de um cromossomo circular e dois plasmídeos (pXF51 e pXF1.3). Análises desse genoma detectaram quantidades próximas de ORFs: 2.782 (Simpson *et al.*, 2000) e 2.985 (Bhattacharyya *et al.*, 2002) ORFs, com 47% e 58% delas com função protéica putativa, respectivamente.

A condição de fitopatógeno da *Xf* em citros e em outros patossistemas é singular (Camargo, 2002). O genoma da *Xf* não apresenta genes *avr* (avirulência), *hrp* (resposta de hipersensibilidade e patogenicidade) ou *hrc* (*hrp* conservada) (Simpson *et al.*, 2000). Genes *avr* codificam fatores elicitores de patogenicidade, enquanto que genes *hrp* e *hrc* codificam proteínas do sistema secretor do tipo III, além de regular a transcrição de genes *avr* (Castro, 1999; Lambais *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2001bc). Esse sistema secretor, comum a bactérias fitopatogênicas e representado incompletamente no genoma da *Xf* com apenas uma ORF no plasmídeo XF51, homóloga à proteína VirB7 (Bhattacharyya *et al.*, 2002), injeta proteínas envolvidas na patogenicidade e virulência, dentre elas, o produto protéico do gene *avr*, no interior da célula hospedeira (Galan & Collmer, 1999). As moléculas elicitoras *avr* definem a especificidade do hospedeiro, já que podem ser reconhecidas, ou não, por receptores citoplasmáticos do hospedeiro, codificados por genes R (resistência) da planta. Assim, se a planta possuir um gene R específico para o gene *avr* do patógeno, ocorrerá a ativação de genes da planta que levam RH (reação de hipersensibilidade), mediada por apoptose ou morte celular

programada na área sob ataque do fitopatógeno, restringindo a colonização do tecido (Staskawicz *et al.*, 1995; Vivian & Gibbon, 1997; Hutcheson, 2001).

A ausência de genes *avr* e *hrp* no genoma da *Xf* pode refletir a estratégia evolutiva da bactéria de se transmitir somente por insetos vetores e de se restringir unicamente ao xilema das plantas hospedeiras (Wixon, 2000), o que pode explicar a gama de hospedeiros da *Xf*, sintomáticos ou não, em um grande número de gêneros e famílias de plantas.

A *Xf/CVC* apresenta lenta multiplicação e, conforme o nome incita, exige condições térmicas (26-28°C), pH (6,5-6,9) e nutricionais (meio axênico complexo) específicas, não sendo facilmente isolável e cultivável em meios de cultura (Chang *et al.*, 1993). Essas características parecem resultar de seu hábitat em vasos de xilema, que transporta seiva bruta, pobre de nutrientes (Keen *et al.*, 2000). Embora seja uma bactéria fastidiosa, a *Xf* apresenta os genes necessários para a produção de energia por meio de glicólise via frutose, glicerol, glicose e manose (Wixon, 2000).

Relação patógeno-vetor

Desde que a *Xf* foi relacionada à CVC (Rossetti *et al.*, 1990a), suspeitas do envolvimento de vetores na transmissão da doença foram levantadas. A participação de insetos foi primeiramente evidenciada a partir de plantas em pomares com CVC que apresentaram sintomas apenas quando estavam desprotegidas por telado (Rossetti *et al.*, 1995). Posteriormente, confirmou-se que a *Xf/CVC* é transmitida por cigarrinhas sugadoras da seiva do xilema [Ordem Hemiptera, Sub-ordem Homóptera, Divisão Auchenorrhynca, Famílias Cicadellidae (Sub-família Cicadellinae) e Cercopidae] (Salva *et al.*, 1995). A *Xf* se aloja estritamente na parte anterior do tubo digestivo (estomodéu) das cigarrinhas, aderida ao forro cuticular do pré-cibário (canal de alimentação), cibário (câmara de sucção) e da porção anterior do esôfago (Lopes *et al.*, 1996).

Até o momento, foram identificadas 11 espécies de cigarrinhas do xilema transmissoras da *Xf/CVC* em condições de pomares e em viveiros no Brasil: *Acrogonia terminalis* (Young), *A. virescens* (Metcalf), *Bucephalogonia xanthophis* (Berg), *Dilobopterus costalimai* (Young), *Ferrariana trivittata* (Signoret), *Homalodisca ignorata* (Young), *Macugonalia leucomelas* (Walker), *Oncometopia facialis* (Signoret),

Parathona gratio (Blanchard), *Plesiommata corniculata* (Young) e *Sosesimia grossa* (Signoret) (Lima *et al.*, 1994; Lopes *et al.*, 1996; Roberto *et al.*, 1996; Krüchner *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2000; Fundecitrus, 2001). Essas cigarrinhas são arranjadas em dois grupos, de acordo com a sua localização preferencial, quer seja em plantas de citros (*Acrogonia sp.*, *D. costalimai* e *O. facialis*), quer em plantas invasoras de pomares de citros (*B. xanthopis* e *M. leucomelas*) (Salva *et al.*, 1995).

Insetos vetores de *Xf*/CVC possuem baixa taxa de infectividade natural, alcançando 6,3% para *Acrogonia sp.* (Pereira, 2000) e 8,9% em *D. costalimai* (Yamamoto *et al.*, 2001), ao contrário de outros patossistemas em que *Xf* está envolvida, cuja frequência de transmissão por insetos vetores é bem maior (Laranjeira *et al.*, 1999). Isso pode se dever à reduzida porcentagem de vasos xilemáticos portando a *Xf* em citros (Pascholati *et al.*, 2002).

A transmissão de *Xf*/CVC por cigarrinhas está relacionada às suas adaptações morfo-fisiológicas para a alimentação de seiva do xilema (Purcell, 1990). Transferência da *Xf* da planta para o inseto ocorre durante a sua alimentação, realizada pelo cibário, que suga a seiva bruta no xilema mesmo sob tensão negativa (Purcell, 1990). A inoculação da *Xf* pelo inseto na planta parece se dar pela (i) ação da tensão negativa da seiva bruta, que forçaria o conteúdo existente no trato digestivo do inseto a deslocar-se em direção à planta (Purcell, 1990), no caso de se consumir o ato da alimentação ou pela (ii) rejeição pelo inseto de amostras de seiva bruta obtidas, durante o reconhecimento de tecidos da planta por sensilos gustativos do pré-cibário. Essas amostras seriam expelidas de volta para a planta, carregando, junto, células *Xf* desprendidas do trato digestivo, no caso de não se consumir a alimentação (Lopes, 1996).

As cigarrinhas transmitem *Xf* em todas as suas fases do ciclo de vida. Os insetos jovens transmitem a bactéria desde a aquisição da *Xf* até a troca do exo-esqueleto, quando perdem a infectividade, já que há troca do forro cuticular do estomodéu. Insetos adultos, que não mais sofrem ecdise, infectam plantas indefinidamente, já que a *Xf* se multiplica no inseto (Lopes, 1996), constituindo a etapa da vida do inseto mais relevante para a transmissão da *Xf* (Gravena *et al.*, 1997). A transmissão da *Xf* nos insetos vetores é não-circulativa, não havendo transmissão transovariana da bactéria (Freitag, 1951; Lopes, 1996).

As cigarrinhas *A. terminalis*, *D. costalimai* e *O. facialis* são as mais freqüentes na citricultura paulista (Lima *et al.*, 1994; Salva *et al.*, 1995; Roberto *et al.*, 1996). O hábito alimentar dessas cigarrinhas é variável, ocorrendo preferencialmente sobre folhas novas, haste de brotações e ramos novos, respectivamente (Lopes, 1996). Acredita-se que a variação no hábito alimentar das diferentes cigarrinhas vetores de *Xf/CVC* explique a variação existente entre o número e a posição dos ramos infectados com a doença nas plantas. Acredita-se que haja cigarrinhas que agem como vetores diretos (citros a citros) ou indiretos (citros-hospedeiro intermediário-citros) (De Negri & Garcia Jr., 1993).

A relação do número de cigarrinhas que transmitem *Xf/CVC* deve aumentar. Foram identificadas mais de 70 espécies de cigarrinhas em pomares de citros (Paiva *et al.*, 1996). Todas as cigarrinhas que se alimentam de seiva do xilema de citros são potencialmente transmissoras da *Xf* (Purcell, 1990; 1994). Incluem-se também as cigarrinhas não especializadas na sucção do xilema como candidatas a vetores da *Xf/CVC*, que eventualmente ingerem seiva do xilema (Purcell, 1990).

A adaptação da *Xf* para sua transmissão por cigarrinhas decorre, possivelmente, da presença de seis ORFs homólogas a adesinas afimbriais no genoma da bactéria. Essas proteínas relacionam-se a adesão de bactérias patogênicas animais às estruturas internas de insetos vetores e animais parasitados. Uma das ORFs é similar à *uspA1* de *Moraxella catarrhalis*, duas ORFs à *hsf* de *Haemophilus influenzae*, relacionado a adesão dessa bactéria às células epiteliais do trato respiratório por meio de um pilus, que na *Xf* se localiza nos pólos celulares, e três ORFs à hemaglutinina (*pspA*) de *Neisseria meningitidis* (Keen *et al.*, 2000; Lambais *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2001b).

Além de adesinas afimbriais, a *Xf* deve interagir com o inseto vetor, para efeito de adesão, por meio de quitinase, já que possui ORF homóloga que codifica para essa enzima (Machado *et al.*, 2001bc).

As ORFs para adesinas afimbriais em *Xf* parecem ter sido adquiridas evolutivamente a partir da transferência gênica horizontal (TGH) para o seu genoma, mediado por bacteriófagos. Há evidências da presença de quatro sítios de integração de bacteriófagos λ , que responderiam por 7% do tamanho do genoma da *Xf* (Wixon, 2000). A natureza conjugativa do pXF51 pode também ter operado na TGH relacionada à

patogênese (Marques *et al.*, 2001b). Recentemente foi descoberta uma “ilha genômica” em *Xf*/CVC, a giCVC1, de 67 kb, dotada de genes com elevada homologia a outros organismos. “Ilhas genômicas” carregam diferentes genes individuais que se acumulam em fagos durante sua passagem por outras espécies bacterianas. Evidências sugerem que o mecanismo de TGH mediado por “ilhas genômicas” possa ter atuado, decisivamente, em uma rápida evolução da *Xf* (Van Sluys *et al.*, 2003).

Origem e variabilidade genética da *Xylella fastidiosa* de citros

Há, em geral, um paralelo entre as vias metabólicas codificadas em genomas de bactérias fitopatogênicas, tamanho desses genomas e o estilo de vida que essas bactérias possuem (Van Sluys *et al.*, 2002). Bactérias parasitas obrigatórias caracterizam-se pelo seu menor genoma quando comparado com as de vida livre (Doolittle, 2002).

Em se tratando da *Xf*, supõe-se que a bactéria seja um fitopatógeno ‘mínimo’, filogeneticamente relacionado à *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), baseado na similaridade genômica e na diferença do tamanho dos genomas da *Xf* ($\cong 2,7$ Mb) e da *Xcc* ($\cong 5,5$ Mb). As peculiaridades de cada um desses genomas refletiriam suas diferentes estratégias de patogenicidade. A maior complexidade genômica de *Xcc* se justificaria pelo fato de infectar ativamente suas plantas hospedeiras, requerendo a biossíntese de uma série de substâncias e/ou estruturas celulares podendo, ainda, sobreviver de forma saprófita sobre as folhas, quando se encontra fora de seu hospedeiro, como ocorre com *Ralstonia solanacearum*. Por sua vez, a miniaturização do genoma da *Xf* se justificaria pelo fato de infectar passivamente seus hospedeiros, por meio de cigarrinhas, não precisando, portanto, de aparato bioquímico específico para a penetração das plantas e por sobreviver exclusivamente no interior do ambiente quase invariável dos vasos do xilema, não apresentando habitats alternativos (Keen *et al.*, 2000; Camargo, 2002).

Sabe-se que a maioria das plantas hospedeiras da *Xf* localiza-se nas Américas (Purcell, 1997), com exceção da Pereira chinesa (Leu, 1993). Acumulam-se evidências da existência de subespécies ou patovares dentre as estirpes de *Xf*, tais como, variações no espectro de hospedeiros, homologia de DNA e magnitude da fastidiosidade, o que sugere longo período de associação com seus hospedeiros (Purcell & Hopkins, 1996; Timmer *et al.*, 2000).

Desde a descrição da primeira estirpe de *Xf/CVC*, identificada em 1993 (Chang *et al.*, 1993; Hartung *et al.*, 1994), relações genéticas entre estirpes de *Xf/CVC* com a de outros hospedeiros vêm sendo determinadas. Dependendo da técnica empregada, ora se distinguem geneticamente estirpes de *Xf/CVC* das demais estirpes de *Xf*, como é o caso de testes serológicos (Chang *et al.*, 1993; Lee *et al.* 1993), análise cladística de RAPDs (Pooler & Hartung, 1995b; Chen *et al.*, 2002), *fingerprint* de rDNA 16S (Chen *et al.*, 2002); ora se agrupa estirpes de *Xf/CVC* com as de outros hospedeiros, como obtido pela análise de *fingerprint* de tRNA por PCR, que agrupou estirpes de *Xf/CVC* com as de amoreira (Beretta *et al.*, 1997) e por estudos de ERIC- e REP-PCR, que agrupou estirpes *Xf/CVC* com as de ameixeira (Wendland, 2000).

Com o surgimento da requeima da folha do cafeeiro (RFC), aventou-se a hipótese de que estirpes de *Xf/CVC* originaram-se de *Xf* existente em café, já que (i) a CVC surgiu em uma região do cinturão citrícola brasileiro onde previamente se cultivava café; (ii) árvores de café remanescentes nessas áreas apresentavam alta incidência de RFC; (iii) a *Xf* é detectada em lavouras de café, distantes de pomares cítricos e (iv) estirpe *Xf/RFC* ocorre em cafezais próximos a pomares contaminados com a *Xf* (Paradela *et al.*, 1995, 1997; Lima *et al.*, 1998).

Através de testes sorológicos e de PCR específicos para *Xf/CVC*, detectou-se a bactéria em café com RFC (Lima *et al.*, 1998). Concomitantemente, diferentes estudos baseados em eletroforese de proteínas (Mehta *et al.*, 2000), polimorfismo AP-PCR (Costa *et al.*, 2000), RAPD (Lacava *et al.*, 2001; Mehta *et al.*, 2000), RFLP (Leite Jr. *et al.*, 2000) e usando primers para amplificação de rDNA 16S (Chen *et al.*, 2000) e da “ilha genômica” giCVC1 (Van Sluys *et al.*, 2003) detectaram íntima relação genética entre estirpes *Xf/CVC* e *Xf/RFC*. Completa homologia entre as estirpes de *Xf* desses dois hospedeiros também foi encontrada, como atestado por PCR-RFLP da sequência espaçadora 16S-23S e rDNA 16S (Rosato *et al.*, 1998; Metha *et al.*, 2001; Mehta & Rosato, 2001) e ERIC-PCR e REP-PCR (Wendland, 2000; Qin *et al.*, 2001). Testes de patogenicidade demonstraram, inclusive, que a estirpe *Xf/CVC* é patogênica em café (Li *et al.*, 2001), sugerindo que as estirpes de *Xf* desses dois hospedeiros não são patogenicamente especializadas.

Ainda não se sabe quantos haplótipos de *Xf*/CVC, geneticamente diferenciados, existem na natureza. Distinção entre haplótipos de *Xf*/CVC foi alcançada empregando-se marcadores REP-PCR (Wendland, 2000; Mehta *et al.* 2001) e VNTR (Coletta Filho *et al.*, 2001). Colonização simultânea em uma mesma planta cítrica foi detectada, o que pode decorrer de recombinação genética entre haplótipos de *Xf* ou de inoculações de *Xf* de diferentes fontes de inóculo pelas cigarrinhas (Wendland, 2000; Coletta-Filho & Machado, 2002). Estudos mostraram que a diversidade genética e a estrutura populacional de *Xf*/CVC são independentes da diversidade entre hospedeiros em que foram isoladas (Coletta-Filho & Machado, 2002). Contudo, identificou-se maior diversidade genética da *Xf* na região Noroeste de São Paulo, porção do parque citrícola paulista severamente afetada pela CVC (Wendland, 2000).

Mecanismos de patogenicidade da *Xylella fastidiosa* em citros

Existem dois aspectos-chave da patogenicidade da *Xf*/CVC que são intimamente relacionados às adaptações evolutivas de que essa bactéria fora dotada: (i) sobrevivência a um tipo inóspito e específico do tecido da planta (xilema) e (ii) modo de transmissão pelo qual alcança essa parte da planta para a sua colonização (insetos vetores).

Por ser uma bactéria estrita ao xilema, a *Xf* tem a imperativa necessidade de se agregar entre si e de interagir com a superfície interna do xilema. Essa agregação entre células de *Xf* seria necessária para (i) suportar flutuações ambientais, principalmente a tensão negativa do movimento ascendente da água no interior do xilema; (ii) capturar nutrientes (ácidos orgânicos, íons inorgânicos e aminoácidos) que se encontram em baixa concentração, diluídos na seiva bruta; (iii) concentrar exoenzimas bacterianas para agir diretamente contra o tecido do hospedeiro e (iv) acumular substâncias detoxificantes, protegendo-se contra defesas do hospedeiro (Dow & Daniels 2000; Keen *et al.*, 2000; Lambais *et al.*, 2000; Leite *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2001).

Logo após o contato inicial da *Xf* com o hospedeiro, há multiplicação de células bacterianas formando um ‘biofilme’ no interior do xilema (Marques *et al.*, 2001a; Leite *et al.*, 2002). O termo “biofilme” é empregado para designar comunidade de microorganismos (bactérias e fungos) que abriga, estabiliza e otimiza as condições vitais

quando disposta, imóvel, sobre superfície de ambientes instáveis e com fluxo constante de líquidos (Leite *et al.*, 2001; Marques *et al.*, 2002).

Estruturas fimbriais do tipo IV mediam, em bactérias fitopatogênicas, a interação inicial com a superfície do hospedeiro para formação de biofilmes (Soto & Hultgren, 1999). A *Xf* conta com 26 das 36 ORFs conhecidas na natureza envolvidas na biogênese dessas substâncias (Simpson *et al.*, 2000; Lambais *et al.* 2000; Machado *et al.*, 2001bc), que são observadas em microscopia eletrônica de *Xf* (Silva *et al.*, 2000).

A consolidação de agregados de células de *Xf* e sua adesão ao interior do xilema de citros suscetíveis parecem ser exercidas por um glicocálice, constituído de polissacarídeos extra-celulares, que reveste a *Xf*/CVC. Cápsulas polissacarídeas bacterianas, constituídas de heteropolissacarídeos ácidos, possuem vários papéis na patogênese (Hayward & Mariano, 1997). Indícios da existência do glicocálix em *Xf*, chamado de goma fastidiana (Leite *et al.*, 2001), baseiam-se em (i) imagens de microscopia eletrônica de células de *Xf* envoltas em matriz extra-celular, aderidas ao lúmen de elementos traqueídeos de citros (Chagas *et al.*, 1992) e às estruturas do sistema digestivo de cigarrinhas (Brlansky *et al.*, 1983) e na (ii) detecção de um cluster de genes de 12 Kb no cromossomo da *Xf*, similar ao operon *gum* de *X. campestris*, responsável pela produção do glicocálix em *Xcc* (goma xantana) (Simpson *et al.*, 2000).

A ausência de três genes *gum* (I, L e G) no genoma da *Xf*/CVC sugere que a bactéria sintetize um tipo de goma diferente, possivelmente constituída de unidades de tetrasacarídeo polimerizado, na qual são adicionadas outras substâncias, o que justificaria a menor viscosidade da goma fastidiana em relação à xantana (Silva *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2001bc).

A goma fastidiana de *Xf*/CVC parece ser importante na interação planta-bactéria, via formação de biofilme (Marques *et al.*, 2001a; 2002) e nos processos de patogênese, como acontece com fitopatógenos dos gêneros *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* (Costerton & Irwin, 1981; Leigh & Coplin, 1992; Denny, 1995), sendo típica de bactérias que colonizam ambientes com contínua corrente de fluídos, sob rochas e trato intestinal de animais (Hopkins, 1995). Admite-se que as fibras polisacarídicas da goma fastidiana sejam carregadas negativamente, o que as tornam uma 'bioresina' trocadora de íons, onde nutrientes ionizados dissolvidos na seiva são retidos e enzimas

exteriorizadas pela bactéria são conservadas e concentradas para execução de suas atividades biológicas (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996).

Estudos recentes de microscopia eletrônica e de micro-análise de raios-X revelaram que os processos de agregação das células de *Xf* e adesão das mesmas ao interior do xilema podem prescindir da produção da goma fastidiana. Foi constatado, *in vitro* e *in vivo*, que a superfície celular de *Xf* apresenta grupos tióis, compostos orgânicos sulfatados dispostos em proteínas transmembranas. Em estado negativo (adesivo), compostos tióis pertencentes a células adjacentes, podem formar pontes di-sulfeto e/ou atrair estruturas positivas, como adesinas, conferindo agregação celular. Adesão do agregado de bactérias seria obtida via formação de pontes de cátion Mg^{++} e, principalmente Ca^{++} , entre os grupos thiol e a parede do xilema, ambos carregados negativamente (Leite *et al.*, 2002). Dessa maneira, a goma fastidiana da *Xf* apenas consolidaria o biofilme, promovendo o seu crescimento arquitetônico-estrutural, participando secundariamente na sua formação (Leite *et al.*, 2001). Evidência experimental baseada na manutenção do padrão de agregação de estirpes de *Xf* mutantes para genes do operon *gum*, responsável pela síntese desse expolissacarídeo, suporta a hipótese de Leite *et al.* (2001) de que células de *Xf* se agregam por meio de formação de pontes de cátions entre os grupos thiol e o xilema (Souza, 2002).

Por sua vez, o outro aspecto-chave da patogenicidade da *Xf*/CVC diz respeito ao *modus operandis* pelo qual a bactéria tem acesso ao xilema de suas plantas hospedeiras. O inseto infectado com *Xf* a disseminará passivamente para plantas durante sua alimentação. Inicialmente as células de *Xf* permanecem circunscritas aos vasos xilemáticos perfurados pelo inseto. À medida que coloniza esse vaso, a população bacteriana aumenta, acarretando a necessidade de translocamento ativo da *Xf* para novos feixes de xilema da planta. Contudo, ainda não é compreendido como se dá a dispersão da bactéria no sistema xilemático de plantas infectadas por *Xf*.

Os principais elementos constituintes do xilema são traqueídeos e vasos de membrana. Ambos são células mortas, não contendo citoplasma e tem parede secundária lignificada. Os elementos de vasos se juntam em suas extremidades por meio de perfurações. Essas aberturas permitem disseminação longitudinal de bactérias restritas ao xilema dentro dos vasos. Sobre as paredes laterais, tanto os traqueídeos como os

vasos de membrana têm aberturas, chamadas 'pits', cujas membranas separam elementos adjacentes (Bové, 2002).

Como a *Xf* é maior que os poros que ligam os vasos xilemáticos (Hopkins, 1989), a colonização ascendente e descendente do xilema, vaso-a-vaso, decorre, possivelmente, do rompimento das perfurações da membrana da parede celular que separam os vasos do xilema (Bové, 2002).

No patossistema *Xylella-videira*, a degradação dessa barreira física foi aventada como sendo devida a um aparato de enzimas extra-celulares que degradariam celulose, hemicelulose, lignina, pectina e proteínas (Hopkins, 1985a). Foi demonstrado, posteriormente, que *Xf*/DPV sintetiza proteases extra-celulares (Fry *et al.*, 1994). Admite-se que a patogenicidade de *Xf*/DPV depende mais de movimento vaso a vaso do que da multiplicação da *Xf* dentro dos vasos do xilema. Foi observada que a taxa de multiplicação de estirpes *Xf*/DPV virulentas e avirulentas é semelhante no local da inoculação, contudo, estirpes *Xf*/DPV virulentas infectam dez vezes mais vasos xilemáticos do que estirpes avirulentas (Hopkins, 1989).

Com o seqüenciamento do genoma da *Xf*/CVC, foram identificados dois genes que codificam celulasas, um gene para pectinase, um para glicolase e, no mínimo, quatro genes para proteases (três endo-1,4 β -glucanases e uma celobiohidrolase), bem como genes necessários para a secreção extra-celular dessas enzimas, que podem degradar, em conjunto, a parede celular (Simpson *et al.*, 2000). Expressão heteróloga dessas ORFs vem confirmando sua atividade biológica, como a comprovada atividade endoglicolítica de celulasas (Wulff *et al.*, 2001).

Identificou-se um padrão diferenciado de colonização pela *Xf* dos quatro tipos de vasos xilemáticos (escalariforme, espiral, pontuado e reticulado) do pecíolo foliar de citros. A microscopia eletrônica revelou colonização maciça preferencialmente em vasos pontuados do xilema, que são caracterizados por uma maior proporção de lignina e pontuações (> 1 mm em diâmetro) e separam vasos xilemáticos apenas pela parede celular primária (Alves *et al.*, 2001). A parede celular das pontuações dos vasos pode ser rompida pelas celulasas da *Xf*, permitindo assim a colonização de vasos adjacentes (Alves *et al.*, 2001). Supõe-se que, com a degradação da parede celular, além de a bactéria avançar lateralmente pelo sistema condutor da planta hospedeira, sejam

disponibilizados carboidratos indispensáveis para a sua sobrevivência (Lambais *et al.*, 2000).

Comparação dos genomas de *Xf*/CVC e *Xf*/DPV revelou que o gene precursor da poligalacturonase, essencial para a síntese de enzimas de degradação da parede celular, apresenta-se funcional na estirpe da *Xf* que coloniza videira e afuncional (códon de terminação) em *Xf* de citros. O status inativo desse gene em *Xf*/CVC pode explicar sua menor agressividade de migração inter-vaso do que a estirpe de *Xf*/DPV (Van Sluys *et al.*, 2003).

Dentre as enzimas que degradam a parede celular, as pectolíticas são as mais importantes como fatores de virulência (Hayward & Mariano, 1997). O genoma da *Xf* não possui genes que codifiquem pectinases. Isso talvez esteja relacionado ao fato desse fitopatógeno infectar passivamente a planta, via insetos vetores, não requerendo aparato bioquímico direcionado para a invasão de plantas (Keen *et al.*, 2000).

O período compreendido entre a inoculação da *Xf* na planta pelos insetos vetores e a colonização de vasos xilemáticos adjacentes é particularmente longo nos patossistemas em que a bactéria está presente e parece depender da taxa e extensão de colonização (Hopkins & Thompson, 1984). Patogenicidade de diferentes tipos de bactérias fitopatogênicas gram-negativas, tais como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aureofasciens*, *P. aeruginosa*, *Rhizobium leguminosarum* e *Erwinia carotovora*, que coloniza tecido vascular, é dependente de percepção de “quorum” (*quorum-sensing molecules*). Esse mecanismo baseia-se na síntese, por parte do fitopatógeno, de moléculas sinalizadoras a partir do momento em que a população atinge uma determinada concentração. Alcançado um limiar específico, as “quorum-sensing molecules” regulam a expressão gênica diferencial do fitopatógeno relacionada à patogenicidade (Fuqua *et al.*, 1994; Shapiro, 1998).

No patossistema *Xylella*-videira, observou-se que a patogenicidade de estirpes de *Xf*/DPV parece depender de sua multiplicação até uma população limiar, próxima ao ponto de inoculação, o que antecede o seu deslocamento para outros vasos xilemáticos (Fry & Milholland, 1990a).

O genoma da *Xf* não é dotado do mecanismo clássico de percepção de quórum, isto é, a bactéria não tem o sistema de sinalização baseado em lactona homoserina (LH),

típica de fitobactérias gram-negativas (Bhattacharyya *et al.*, 2002). Contudo, a *Xf* é dotada de duas ORFs que codificam proteínas tipo *LuxR*, envolvidas no mecanismo de percepção de “quorum” em *X. campestris* baseado em moléculas sinalizadoras difusas não dependentes de LH (Lambais *et al.*, 2000; Bhattacharyya *et al.*, 2002).

A suposição de que a modulação da expressão de alguns genes de patogenicidade de *Xf/CVC* siga a lógica do mecanismo da percepção de quorum foi avaliada experimentalmente, em meio de cultura, determinando-se que a expressão de alguns genes de patogenicidade putativos da *Xf*, responsáveis pela síntese de precursores da goma fastidiana e pelo grau de polimerização da goma, foi significativamente acentuada sob elevada concentração populacional (Scarpari, 2001). A validação *in vivo* da percepção de quorum em *Xf* poderia justificar, em parte, a longa demora na expressão da sintomatologia da CVC.

Por fim, sabe-se que o genoma da *Xf* não possui aparato enzimático para a biogênese de flagelo, o que a torna imóvel. Assim, qualquer movimento da bactéria no interior da planta deve ser, provavelmente, controlado pela hidrodinâmica que opera dentro do xilema (Bhattacharyya *et al.*, 2002). Sugere-se, também, que enzimas de degradação da parede celular possam ser induzidas e/ou secretadas pela planta, no interior do xilema infectado, em resposta à presença da bactéria e/ou que a pressão criada pelas bactérias ao colonizar os vasos possa romper os poros da membrana inter-vasos, permitindo a bactéria mover-se sistemicamente (Hopkins, 1989).

Deteção da *X. fastidiosa* em citros

Existem diferentes métodos de diagnóstico de *Xf/CVC*, cada qual apresentando suas vantagens e desvantagens, que incluem análise microscópica (Rossetti *et al.*, 1990a; Chagas *et al.*, 1992; Mizubuti *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 1997; El Tassa *et al.*, 1997), isolamento microbiológico primário (Leite Jr & Leite, 1991), testes sorológicos, tais como ELISA, DIBA, *Tissue blot* e *Western blot* (Beretta *et al.*, 1991, 1992; Lee *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1993; Garnier *et al.*, 1993; Harakava *et al.*, 1994b; Harakava & Beretta, 1994; Hartung *et al.*, 1994; Hill & Purcell, 1995; Ricci *et al.*, 1997; Leite Jr. *et al.*, 1997; Machado *et al.*, 1997), imunofluorescência (Brlansky *et al.*, 1998; Monteiro *et al.*, 2001) e PCR (Minsavage *et al.*, 1994; Pooler & Hartung, 1995; He *et al.*, 1996;

Beretta *et al.*, 1997; Pooler *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2000).

Os métodos de diagnóstico têm sido úteis em estudos de diferentes aspectos do patossistema *Xylella*-citros, tais como, avaliação da transmissão da bactéria em experimentos de inoculação artificial ou mediada por insetos; desenvolvimento de métodos de poda para combate à CVC, identificação de hospedeiros alternativos da bactéria e monitoramento de plantas matrizes (Beretta *et al.*, 1997).

No geral, métodos baseados em microscopia são geralmente demorados, tornando-se limitados e ineficientes. O cultivo *in vitro* da bactéria, além de lento, é inconsistente com alguns hospedeiros e isolados, incorrendo em constantes ameaças de contaminação (Henson & French, 1993). Para *Xf*, o isolamento primário apresenta baixa confiabilidade, já que a técnica pode falhar, diagnosticando a ausência da bactéria em determinado tecido da planta em que há a presença de *Xf* (Fry & Milholland, 1990b; Hill & Purcell, 1995).

A técnica da PCR apresenta vantagens em relação aos métodos sorológicos. As técnicas do ELISA e PCR apresentam limiar de $1,3 \times 10^5$ UFC/ml e $1,3 \times 10^3$ UFC/ml, respectivamente, tendo o teste PCR sido 100 vezes mais sensível que ELISA (2×10^4 a 1×10^5 UFC/ml para ELISA e 2×10^2 a 1×10^3 UFC/ml por PCR), tanto em extratos de tecidos de videira naturalmente infectados, quanto de amostras de tecidos inoculados artificialmente (Minsavage *et al.*, 1994), o que é fundamental para se detectar a bactéria no início da colonização do tecido (Beretta *et al.*, 1997). Outra vantagem da PCR reside em sua especificidade a uma determinada estirpe da *Xf*, o que não acontece em testes sorológicos, devido ao emprego de anticorpos policlonais (Machado *et al.*, 1997). A principal desvantagem da PCR, comum também em testes sorológicos, é a incapacidade de se distinguir entre células de *Xf* vivas ou mortas (Minsavage *et al.*, 1994), já que DNA persiste nas células, variavelmente, após sua morte (Lopez & Cambra, 1996).

5.2. A Clorose Variegada dos Citros (CVC)

Histórico e distribuição

A CVC, também denominada como “amarelinho”, foi constatada em 1987 em Macaúbal/SP (Rossetti *et al.*, 1990b) e, posteriormente, disseminou-se para as regiões norte e nordeste paulistas e triângulo mineiro (Rossetti & De Negri, 1990); Rio de Janeiro (Goes *et al.*, 1993); Distrito Federal (Tubelis *et al.*, 1993a); Goiás (Tubelis *et al.*, 1993b); Paraná (Leite & Jacomino, 1993); Minas Gerais (Mizubuti *et al.*, 1994); Sergipe (Laranjeira *et al.*, 1996); Rio Grande do Sul (El Tassa *et al.*, 1997); Santa Catarina (Leite Jr. *et al.*, 1997) e Bahia (Santos Filho *et al.*, 1997). A CVC também já foi encontrada no Paraguai (Segnana *et al.*, 1998).

Já na Argentina, doença similar, denominada “pecosita”, foi detectada em 1984 (Contreras, 1992). A colonização de plantas *Xf/pecosita* resulta em menor severidade de sintomas do que em relação à *Xf/CVC*, embora essas duas doenças sejam provocadas por estirpes de *Xf* idênticas (Rossetti *et al.*, 1998). Diagnóstico da bactéria e expressão de sintomas de pecosita ocorrem somente em laranjeiras (Laranjeira, 1997b), não constituindo uma doença limitante para a citricultura Argentina (Minsavage *et al.*, 1994). A diferença entre a severidade da CVC e da pecosita parece corresponder às condições climáticas das regiões em que surgiram essas doenças de citros provocadas pela *Xf*.

A CVC não foi, ainda, detectada na Europa e nos Estados Unidos, sugerindo que a doença esteja circunscrita à América do Sul (Timmer *et al.*, 2000). Desde que se cultiva citros e videira na Flórida/EUA, a mais de um século, há apenas o relato de *Citrus jambhiri* Lush. e *C. sinensis* (L.) Osb. como hospedeiras alternativas assintomáticas de *Xf/DPV* (Hopkins & Adlerz, 1988). Estirpes de *Xf/CVC*, quando artificialmente inoculadas em videira, são patogênicas produzindo sintomas idênticos à DPV (Li *et al.*, 2002). Transmissão recíproca de estirpes pode ser interpretada como decorrentes do elevado grau de identidade (98%) entre os genomas de estirpes de *Xf/CVC* e *Xf/DPV* (Van Sluys *et al.*, 2003). Recentemente, determinou-se que *Oncometopia nigricans* Walker, cigarrinha comum nos pomares cítricos da Flórida/USA, é capaz de transmitir a *Xf/CVC* (Brlansky *et al.*, 2002).

Mecanismos de transmissão

Além de sua transmissão propagativa não-circulativa através de cigarrinhas (Lopes *et al.*, 1996), a *Xf*/CVC pode ser transmitida através de enxertia de borbulhas infectadas, face à sua habilidade de sobreviver dentro de tecidos usados em multiplicação vegetativa (Jacomino *et al.*, 1993). O plantio de mudas contaminadas com a doença foi o principal fator responsável pela rápida disseminação da CVC no parque citrícola brasileiro, já que os insetos vetores não se deslocam a longas distâncias (Garcia Jr. *et al.*, 1995). A enxertia natural de raízes de plantas de citros também permite a transmissão da bactéria (He *et al.*, 2000). A CVC não se dissemina por meio de semente ou por instrumento cortante (Sugimori *et al.*, 1995), vento ou tratos culturais (Laranjeira, 1997b).

Resistência, tolerância e suscetibilidade de citros à *Xf*

De um modo geral, a resposta à infecção por *Xf* varia dentro de cada variedade/espécie estudada (Lima, 1995).

Variedades-copa de citros suscetíveis à *Xf*, que expressam sintomas da CVC nas quais se detecta a bactéria, constituem todas as variedades de laranja doce (Beretta *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993; Machado *et al.*, 1993; 1994; Carvalho *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996; Machado *et al.*, 1997; Laranjeira *et al.*, 1998a; Salibe *et al.*, 2001). Os sintomas da CVC são constatados com maior severidade entre as variedades comerciais, notadamente na laranja ‘Pêra’ (Lee *et al.*, 1992; Pompeu Jr. *et al.*, 1994; Laranjeira *et al.*, 1995; Laranjeira *et al.*, 1998a), com acentuada redução da produção de frutos (Laranjeira *et al.*, 1995; Laranjeira *et al.*, 1998b). Até o momento, não se registrou nenhuma variedade ou clone de laranja doce resistente ou tolerante à bactéria (Mourão Filho *et al.*, 1997). Quando muito, detectou-se um gradiente de suscetibilidade de laranjeiras doce à *Xf*. Variedades mais suscetíveis (‘Barão’ e ‘Pêra’) e menos suscetíveis (‘Baía’, ‘Baianinha’, ‘Hamlin’, ‘Ovale’ e ‘Westin’) à bactéria (Laranjeira *et al.*, 1995) e diferenças entre clones e variedades de laranjas precoces, de meia estação e tardias (Li, 1997) foram identificadas. Essa diferença quanto ao grau de suscetibilidade entre clones de uma mesma variedade de citros à *Xf* é atribuída a mutações espontâneas e/ou à baixa eficiência de transmissão do vetor (Machado *et al.*, 1994). Identificou-se também que a

laranja 'Lue Gim Gong' se apresenta promissora para cultivo sob convivência com a CVC na região de Mirassol/SP (Laranjeira & Pompeu, 1998).

Variedades-copa tolerantes à *Xf*, que não expressam sintomas da CVC, mas em que se detecta a multiplicação da *Xf*, são as variedades cidra 'Etrog'; citrange 'Troyer'; laranja azeda 'São Paulo'; limas ácidas 'Galego' e 'Tahiti'; limões 'Amber', 'Camargo', 'Rugoso' A e B e 'Sanguíneo 2'; limões verdadeiros 'Eureca' e 'Siciliano'; pomelo 'Marsh Seedless'; tângelos 'Fairchild', 'Lee', 'Mineolla', 'Orlando', 'Thornton' e 'Weber'; tangerinas 'Batangas', 'Campeona', 'Cravo', 'Clementina', 'Cleópatra', 'Dancy', 'Depressa', 'King', 'Moreal', 'Nicarágua', 'Oneco', 'Parson Special', 'Poncan' e 'Sunki' e toranja 'Comprida' (Beretta *et al.*, 1993; Machado *et al.*, 1993, 1994b; Garcia Jr. *et al.*, 1995; Li, 1996, 1997; Laranjeira *et al.*, 1997c, 1998; Salibe, 2001).

Variedades-copa resistentes à *Xf*, que não expressam sintomas da CVC e nem se detecta a multiplicação da bactéria, possivelmente devido à sua baixíssima concentração na planta, constituem as variedades limas ácidas 'Mexicana'; lima doce 'Dourada'; limões 'Cravo' e 'Volkameriano'; limões verdadeiros 'Eureca Km 47', 'Feminello de Siracusa', 'Lisboa tetraplóide' e 'Monachello'; pomelos 'Kunquat', 'Periforme' e 'Star Ruby'; tângelos 'Fremont', 'Nova', 'Osceola', 'Robinson', 'Sampson', 'Sunburst' e '2560'; tangerinas 'África do Sul', 'Clementina caçula', 'Creola', 'Ellendale', 'Kara', 'Mexerica do Rio', 'Okitsu', 'Satsuma' e 'Warnuco'; toranjas 'Vermelha' e alguns híbridos de 'Satsuma' x 'Natal' (Laranjeira *et al.*, 1998a; Machado *et al.*, 1993, 1994b; Li, 1997; Salibe, 2001). Híbridos de citros como o 'Ambersweet' [(*C. reticulata* x *C. paradisi*) x *C. sinensis*] e alguns híbridos de 'Satsuma' x 'Natal' e tângelos 'Fremont', 'Nova', 'Osceola', 'Robinson', 'Sampson', 'Sunburst' e '2560' também são resistentes à *Xf* e constituem genótipos altamente promissores (Laranjeira *et al.*, 1998a). Variedades-copa dos gêneros *Fortunella*, *Microcitrus* sp. e *Poncirus trifoliata* também são resistentes à *Xf* (Laranjeira *et al.*, 1998a; Salibe, 2001).

Com relação às variedades de tangores, foram descritos comportamentos de resistência a suscetibilidade quanto à CVC. Suscetibilidade à *Xf* foi detectada na variedade "Tankan" (Laranjeira *et al.*, 1998a), tolerância para as variedades 'Dalmo', 'IVIA-C-165', 'Mimosa', 'Sabará', 'Tangerona' e 'Victoria' (Li *et al.*, 2000; Laranjeira

et al., 1998a; Souza *et al.*, 2000) e resistência para as variedades ‘Fallglo’ e ‘Murcott’ (Laranjeira *et al.*, 1998b).

Classificação de tangor ‘Murcott’ quanto à infecção à *Xf* é variável, dependendo da intensidade do sistema de inoculação da *Xf* adotado. Sob pressão de inóculo de campo altamente infectado, requerendo do inseto vetor para a sua contaminação, o tangor ‘Murcott’ é resistente à *Xf* (Laranjeira *et al.*, 1998b). Utilizando-se de sobre enxertia de borbulhas de ‘Murcott’ em plantas infectadas com CVC, detectou-se a multiplicação da bactéria nesse tangor sem, contudo, expressar sintomas da doença (Machado *et al.*, 1994). Por sua vez, garfagem de ramos infectados com a *Xf* em plantas de tangor ‘Murcott’, obteve-se expressão atípica de sintomas foliares da CVC (Li, 1997).

As principais variedades porta-enxerto de citros empregados no Brasil (limões ‘Cravo’ e ‘Volkamericano’ e tangerina ‘Cleópatra’) são suscetíveis à *Xf*, não acarretando, contudo, uma taxa diferencial do progresso da CVC (Laranjeira *et al.*, 2001). A *Xf* não foi detectada em *Citrus reshni*, *C. sunki*, *C. limonia* e no híbrido *C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*, sugerindo a possibilidade de sua utilização como porta-enxertos (Laranjeira *et al.*, 1998a).

CVC, idade das plantas e condições edafoclimáticas

A severidade da CVC é associada à idade e às condições edafoclimáticas das plantas. A doença apresenta maior agravamento em plantas de até sete anos (De Negri, 1990) e seus sintomas tornam-se severos durante o período quente e seco do ano (De Negri & Garcia Jr., 1993; Garcia Jr. *et al.*, 1995), notadamente nas regiões norte e noroeste de São Paulo (Gravena *et al.*, 1997).

A evolução mais rápida da CVC em plantas jovens deve-se, possivelmente, à sua maior taxa de crescimento vegetativo, ou seja, maior movimentação de água e da *Xf* no interior da planta (Machado *et al.*, 1997). Contudo, plantas sintomáticas de CVC com mais 15 anos de idade, já foram também detectadas (Lee *et al.*, 1993).

A maior severidade da CVC nas regiões norte e noroeste de SP deve-se ao menor regime pluviométrico e a temperaturas mais quentes a que as plantas são submetidas, quando comparadas às condições edafoclimáticas das regiões centro e sul do Estado (Sentelhas & Araújo, 2001). O maior déficit de pressão de vapor (DPV) dessas regiões

deve aumentar o fluxo de seiva exigido para a manutenção da hidratação foliar, resultando em maior sistemicidade da colonização da planta pela *Xf* (Machado *et al.*, 2001a). Longos períodos de estresse hídrico e DPV resultam em decréscimo da taxa de assimilação de CO₂ (A) e da capacidade fotossintética de plantas com CVC, tornando-as mais suscetíveis à *Xf* nessas duas regiões citrícolas (Medina, 2002).

Estudo fisiológico laboratorial validou os resultados encontrados por Medina (2002) sobre a severidade da CVC em condições de campo, acrescentando que a magnitude da temperatura atmosférica, por si só, interfere na fotossíntese de laranja ‘Pêra’ infectadas pela *Xf*. Regime de temperatura de 35/20°C (dia/noite), similar ao encontrado em períodos quentes e secos nas regiões norte e noroeste de SP, resulta em menor condutância estomática, comprometimento de reações bioquímicas e aumento da atividade fotorrespiratória em plantas infectadas pela bactéria, quando comparada à performance de plantas sadias (Ribeiro, 2002).

O gradiente de aumento da severidade da CVC, constatado do sul às regiões do norte e noroeste de SP, não encontra relação com diversidade genética significativa de haplótipos da *Xf* do parque citrícola paulista (Qin *et al.*, 2001).

O efeito do estresse hídrico sobre a severidade de sintomas também foi estudado no patossistema *Xylella/Parthenocissus quinquefolia*, espécie de videira nativa de florestas. Constatou-se que o estresse hídrico aumenta a severidade e o desenvolvimento de sintomas de requeima foliar provocados pela *Xf* (McElrone *et al.*, 2001), evidenciando que a condutividade hidráulica reduzida do caule é o efeito primordial da colonização do xilema pela *Xf* (McElrone *et al.*, 2003).

Sintomatologia

O diagnóstico visual da CVC é realizado através da manifestação de sintomas em folhas, ramos, frutos, sementes e na copa da planta como um todo.

Folhas maduras apresentam os sintomas iniciais da CVC, caracterizados por pontos amarelos e marrons nas faces adaxial e abaxial, respectivamente. O primeiro sintoma surge predominantemente durante o período de estresse hídrico, enquanto o segundo ocorre na época das chuvas, em função da proliferação de fungos oportunistas (Rossetti *et al.*, 1998; Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999). Ambos sintomas

evoluem, respectivamente, em manchas cloróticas variegadas e bolosidades gomosas pardacentas (Gravena *et al.*, 1997). Sintomas de deficiência de nutrientes, tipo clorose internerval, podem surgir e desaparecer (Machado *et al.*, 1992), bem como murcha foliar, nas horas mais quentes do dia (Laranjeira, 1997b; Medina, 2002). Folhas jovens raramente apresentam sintomas da CVC, podendo, contudo, apresentarem-se filiformes e com tamanho reduzido (Machado *et al.*, 1992).

Estudo de anatomia patológica de tecidos foliares contendo bolosidades gomosas da CVC revelou a ocorrência de desfacelamento da estrutura do parênquima esponjoso do mesófilo. Foram observadas células parenquimatosas em atividade meristemática, com reduzidos espaços intercelulares, apresentando divisões celulares anormais em direção à epiderme abaxial. Células do mesófilo de regiões cloróticas apresentam redução de cloroplastos morfo-funcionais, associada a uma maior concentração de hesperidina (Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999).

Os ramos afetados possuem, geralmente, entre-nós encurtados o que, juntamente com uma maior frequência de brotamento das gemas desses ramos, em relação aqueles sadios, conferem-lhe aspecto “envassourado” (Amorim *et al.*, 1993; Laranjeira, 1997b).

Sintomas da CVC em frutos surgem após os sintomas foliares em ramos afetados. A frutificação tende a ser em “pencas”, com frutos pequenos, endurecidos e queimados, às vezes, pelo sol, com amarelecimento da casca não associado ao amadurecimento interno e (Malavolta *et al.*, 1990; Palazzo & Carvalho, 1992; Lee *et al.*, 1993; Menegucci *et al.*, 1995; Lima *et al.*, 1997; Laranjeira *et al.*, 1998a). As propriedades organolépticas dos frutos (aumento do teor de sólidos solúveis e acidez) também são afetadas, em decorrência da diminuição do suco (Laranjeira & Palazzo, 1994), o que compromete, obviamente, o seu emprego para a produção de suco de laranja e o seu consumo *in natura*. Há considerável redução do peso e do número de frutos produzidos (Palazzo & Carvalho, 1992; Laranjeira & Palazzo, 1994; Feichtenberger *et al.*, 1997), acarretando decréscimo de até 67%, 76% e 80% na produção de frutos para as laranjas ‘Natal’, ‘Valência’ e ‘Pêra’, respectivamente (Ayres, 2000).

Frutos doentes podem apresentar goma pardacenta no albedo e nos gomos (Malavolta *et al.*, 1990; Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999) e grande quantidade de

cristais de hesperidina no interior dos feixes vasculares e das células do pericarpo (Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999). Sabe-se que a hesperidina é uma substância comum em frutos imaturos de laranja. Sua alta concentração nos frutos com CVC pode ser causada pela menor disponibilidade de água, o que os torna endurecidos (Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999).

A CVC acarreta redução no peso e do percentual de germinação de sementes de frutos contaminados. O peso do embrião + cotilédono das sementes de frutos doentes é 25% menor do que as de frutos sadios. Decorridos 15 dias de plantio, somente 36% das sementes de frutos com CVC germinaram, contra 86% de frutos sadios (Pria Jr. *et al.*, 2000).

Sintomas gerais na copa da planta estão relacionados à lentidão ou paralisação de crescimento, desfolha de ramos apicais (*die back*), murcha generalizada das folhas de plantas severamente afetadas, sintoma inespecífico recorrente em pomares das regiões norte e nordeste (Laranjeira, 1997b), diminuição da vegetação interna da copa, porém, raramente a planta morre por apresentar CVC (Lee *et al.*, 1991; Feichtenberger *et al.*, 1997; Laranjeira, 1997b). Ocasionalmente são relatados surtos de abortamentos florais (Malavolta & Prates, 1990).

Os sintomas da CVC, independente da parte da planta acometida, são inespecíficos, requerendo avaliação do quadro sintomatológico geral da planta para adequada caracterização da bacteriose (Lima *et al.*, 1997).

Raízes de plantas afetadas pela CVC não apresentam sintomas visuais da doença (Malavolta *et al.*, 1990), embora o xilema radicular de citros também seja colonizado pela *Xf* (He *et al.*, 2000).

Epidemiologia da CVC

A CVC é uma bacteriose que ataca severamente laranjeiras doces. Se medidas químicas e/ou fitossanitárias não forem tomadas em um pomar infectado, a incidência da doença pode chegar a 90% das plantas, decorridos 12 anos após a detecção da primeira planta infectada (Gottwald *et al.*, 1993). No auge da epidemia da CVC, a difusão da doença no estado de São Paulo alcançou uma velocidade de aproximadamente 70 Km/ano (Tubelis *et al.*, 1993).

Estudos epidemiológicos evidenciaram que as taxas de progresso da CVC são variáveis ao longo do tempo. Menor progresso de disseminação da CVC ocorre nas épocas de maior déficit hídrico e estagnação de crescimento das plantas (outono e inverno) e as de maior progresso, cinco vezes mais rápida, ocorre nos períodos de maior disponibilidade de chuvas e de desenvolvimento vegetativo (primavera-verão) (Laranjeira, 1997c). Essas constatações epidemiológicas permitiram a Laranjeira (1997c) sugerir que (i) maior número de infecções efetivas devem ocorrer preferencialmente durante a primavera-verão, face às condições ideais para alimentação dos vetores e (ii) a infecção que ocorre em um ano só deve resultar sintomas visuais da doença na primavera-verão do ano subsequente.

O cenário epidemiológico da CVC descrito por Laranjeira (1997c) vem sendo corroborado. Constatou-se que o período de maior disseminação da CVC ocorre quando a temperatura e precipitação pluviométrica começam a se elevar, o que coincide com a abundância do inóculo no xilema de citros e de insetos vetores (Pereira, 2000), bem como a disponibilidade de novas brotações (Roberto & Yamamoto, 1998; Pereira, 2000). Por sua vez, constatou-se que o crescimento populacional de cigarrinhas tem início com as chuvas da primavera, atingindo seu ápice no verão ou outono e diminuindo no inverno (Lopes, 1999).

Mecanismos de patogenicidade da *Xylella fastidiosa*

Em virtude da *Xf* não possuir genes *avr*, *hrp* e *hrc* (Simpson *et al.*, 2000), os típicos estádios iniciais de fitopatogênese (reconhecimento, adesão e penetração) (Hayward & Mariano, 1997) não ocorrem em doenças provocadas pela *Xf*. Na ausência do principal mecanismo de patogenicidade, o sistema de secreção do tipo III, bactérias endógenas, como a *Xf*, devem apresentar outros mecanismos de patogenicidade (Bové & Garnier, 2002). Há considerável discordância quanto ao(s) mecanismo(s) de patogenicidade e virulência subjacente(s) às doenças provocadas por *Xf* (Hopkins, 1989). Disfunção do sistema condutor de água e seqüestro de nutrientes (Esaú, 1948; Hopkins, 1989), produção de fitotoxinas e/ou antibióticos (Mircetich *et al.*, 1976) e desequilíbrio de fitormônios (Frensh & Stasse, 1978) são os mecanismos propostos de patogenicidade.

Evidências experimentais suportam a hipótese de que o principal mecanismo de patogênese da *Xf*/DPV seja a indução de estresse de água devido à oclusão dos vasos xilemáticos em virtude: (i) da interação célula-célula, (ii) da interação do agregado bacteriano à parede interna do xilema e (iii) da produção de goma e tilose pelo hospedeiro (Fry & Milholland, 1990b). A goma corresponde a um conjunto de secreções polissacarídicas viscosas, originadas da destruição da parede celular ou da lamela média (Vander Molen *et al.*, 1977) e a tilose constituem protuberâncias das células parenquimáticas, dispostas no interior de vasos do xilema (Romeiro, 1987). Foi demonstrada que a deposição de goma e formação de tiloses e pectinas nos vasos xilemáticos antecedem o surgimento de sintomas foliares da DPV (Esaú, 1948).

Estudos de trocas gasosas e relações hídricas em plantas de videira sadias e infectadas com a *Xf* atestam alterações associadas ao estresse de água atribuídas à disfunção vascular decorrente da colonização pela *Xf*. Detecta-se maior resistência ao fluxo de seiva nos vasos xilemáticos do pecíolo da folha de videira com DPV do que em folha sadia (Goodwin *et al.*, 1973), podendo se detectar resistência de 60-200 vezes maior do que em folhas sadias (Goodwin *et al.*, 1988). Quantidade de vasos xilemáticos peciolares obstruídos pela *Xf*, estresse hídrico mensurado pelo potencial de água, conteúdo relativo de água no tecido foliar e severidade dos sintomas foliares na DPV são correlacionados (Hopkins, 1985). Estresse hídrico decorrente de infecção por *Xf* em videira é similar aquele obtido por baixa oferta de água no solo, acarretando diminuição de condutância estomática (*gs*) e redução de taxa de assimilação fotossintética líquida de CO₂ (*A*) de folhas de videiras doentes, enquanto esses parâmetros fisiológicos são relativamente constantes em plantas sadias (Goodwin *et al.*, 1988).

Bloqueio eficiente de diferentes patógenos vasculares é obtido por oclusão física da área infectada (Beckman, 1964), que parece ser um mecanismo de resistência à dispersão de fitopatógenos vasculares (Elgersma, 1973). Gomas e tiloses e, principalmente, pectina parecem prevenir (i) fisicamente a dispersão da *Xf* no interior do xilema de variedades de videira resistentes à *Xf*, já que, ao bloquear parcial ou totalmente o xilema, dificulta o fluxo de seiva para a parte aérea da planta e, conseqüentemente, a disseminação da *Xf* (Fry & Milholland, 1990b) e, também, (ii) quimicamente, por se tratarem de substâncias tóxicas a fitopatógenos (Hopkins, 1989).

A análise por microscopia eletrônica revelou que tiloses e gomas em xilema peciolar e foliar de videiras tolerantes e suscetíveis à *Xf* estavam, respectivamente, ausente e presente em grande quantidade no interior dos vasos (Mollenhauer & Hopkins, 1976). Em outro estudo, que empregou cortes histológicos e técnicas de coloração, observou-se que videira suscetível não conseguiu, aparentemente, localizar a bactéria com gomas e tiloses, não interrompendo sua movimentação sistêmica ascendente. Contudo, seus vasos das nervuras foliares encontravam-se parcialmente obstruídos por substâncias pécticas, em diferentes locais em que a planta aparentemente tentava localizar o bloqueio do deslocamento da bactéria (Fry & Milholland, 1990b). Esse bloqueio por pectinas, associado à oclusão natural dos vasos pela *Xf*, resulta um aumento do déficit hídrico e, conseqüentemente, a expressão de sintomas fenotípicos peculiares da doença na videira (Fry & Milholland, 1990ab). O mecanismo de bloqueio da dispersão da bactéria na variedade de videira ‘Muscadine’, resistente à *Xf*/DPV, é baseado em moderadas quantidades de oclusão física vascular, o que reduz a população da *Xf* e permite a planta sobreviver para produzir novos vasos xilemáticos (Hopkins & Thompson, 1981). Dessa maneira, a síntese dessas substâncias por variedades de videira resistentes à *Xf* caracteriza uma resposta da planta à invasão desse fitopatógeno vascular (Fry & Milholland, 1990b).

Variedades de videira suscetíveis à *Xf* aparentemente não conseguem bloquear a bactéria e prevenir sua movimentação sistêmica pela planta. Aliado a isso, ocorre uma superprodução de pectinas, o que deve contribuir para o desenvolvimento da DPV (Fry & Milholland, 1990b).

Para o patossistema *Xylella*-pessegueiro, a hipótese da oclusão física do xilema como mecanismo fundamental de patogênese da *Xf* também foi evidenciada experimentalmente. Ramos de pessegueiro com DPP apresentam menor condutividade hidráulica e maior quantidade de vasos afuncionais, decorrentes de obstrução física em virtude da colonização da bactéria (Evert, 1987).

No patossistema *Xylella*-citros, há uma gama de evidências sinalizando que a patogênese da *Xf* possa também se dever ao bloqueio na translocação de água e nutrientes causado pela colonização bacteriana.

Reduzido fluxo de água para os frutos de plantas com CVC é o fator primordial na diminuição do tamanho e do peso de frutos (Gazzola *et al.*, 1991) e da alteração de suas características internas, como concentração de açúcares (Laranjeira & Palazzo, 1999).

Por sua vez, estudos de trocas gasosas e relações hídricas foliares evidenciam que o bloqueio de fluxo de água em vasos xilemáticos de citros pela *Xf* acarreta os sintomas foliares da CVC. Redução significativa nas taxas de A e de transpiração (E) em folhas de plantas com CVC é atribuída, em diferentes estudos, ao decréscimo na taxa de g_s que, a seu modo, encontra-se relacionado ao potencial da água na folha (ψ_a) decorrente do bloqueio físico pela *Xf* do sistema condutor e aumento da resistência do fluxo de seiva bruta (Machado *et al.*, 1994a; Habermann, 1999; Machado *et al.*, 2001a; Gomes, 2001; Medina, 2002). Esse processo é típico em folhas de plantas infectadas por patógenos que causam resistência ao fluxo de água no xilema, acarretando redução da hidratação foliar (Machado *et al.*, 1994a).

Embora g_s e E ocorram em baixa magnitude em plantas com CVC, o que resultaria em menor perda de água pelas plantas, ainda assim o ψ_a de plantas doentes foi menor do que o ψ_a de plantas sadias, sugerindo que as relações hídricas de plantas afetadas pela bacteriose sejam comprometidas, possivelmente pelo aumento da resistência ao transporte de água (Machado *et al.*, 1994a). Constatou-se que para plantas com CVC sob fertirrigação controlada, a doença acarreta diminuição gradativa do ψ_a , A e g_s , mesmo irrigadas, quando comparadas a plantas sadias irrigadas (Medina, 2002). Adicionalmente, o fluxo de seiva no xilema em laranjeiras infectadas com a *Xf*, assintomáticas para a CVC, é até 60% menor em relação a plantas sadias (Oliveira *et al.*, 2000b).

Além de comprometer trocas gasosas e relações hídricas foliares, a obstrução física do xilema pela colonização da *Xf* acarreta diminuição da eficiência do metabolismo fotossintético de plantas com CVC. Após 22 meses de inoculação artificial de laranjeiras, o aumento na razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) e a diminuição na eficiência no uso da água foram detectados (Medina, 2002). A redução da eficiência intrínseca da fotossíntese, medida pela razão A/C_i , encontra-se relacionada

ao decréscimo da atividade de carboxilação no mesófilo e foi identificada em laranjeiras com CVC (Habermann, 1999).

À semelhança do patossistema *Xylella-videira*, citros infectados por *Xf* apresentam goma (Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999). Estudo de microscopia eletrônica de vasos de xilema de citros com a *Xf* permitiu verificar respostas de plantas à bactéria, caracterizadas pelo acúmulo de gomas, produção de cristais no lúmen dos vasos e hiperplasia de células nas folhas (Alves, 2003). De acordo com esse autor, microanálise de raios X sugere que esses cristais sejam de hesperidina, glicosídeo comum em plantas de laranjeira, que contém vitamina P, comumente relacionada ao mecanismo de defesa de plantas de citros (Alves, 2003). Bolosidades gomosas de intensidade variável, de acordo com a variedade cítrica, foram observadas no xilema do tronco de plantas, abaixo do ponto de inoculação artificial da bactéria, e foram interpretadas como uma reação da planta à colonização pela *Xf* (Jacomino *et al.*, 1993). O grau de intensidade do acúmulo da goma no tronco, considerado como uma reação da planta à infecção pela bactéria, é varietal, sendo mais intenso em tangerina ‘Ponkan’ e no tangelo ‘Orlando’ (Jacomino *et al.*, 1993). A oclusão física por goma do xilema, tanto de plantas cítricas (Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999) quanto de café (Queiroz-Voltan *et al.*, 1998) infectadas com *Xf* diminui no sentido da folha para o caule. Divisões celulares atípicas no mesófilo e no córtex da região da nervura foliar de cafeeiro com RFC não originam bolosidades gomosas no filopiano, ao passo que em citros há síntese e acúmulo de substâncias gomosas nessa região foliar. Esses resultados sinalizam que os danos causados pela colonização da *Xf* em tecidos foliares cítricos são mais severos que aqueles produzidos no café, permitindo presumir que citros são mais suscetíveis à *Xf* do que cafeeiro (Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999). Obstruções por goma em plantas de laranja ‘Pêra’ e ‘Valência’ são freqüentes, ao passo que não se detecta esse composto em vasos xilemáticos de limão ‘Cravo’ infectados com *Xf*, permitindo inferir que o acúmulo de goma no xilema se deve ao modo diferenciado de resposta dessas variedades cítricas à infecção pela bactéria (Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999). Estudo fisiológico de laranjeiras com CVC atesta que agregados da bactéria, goma e tilose obstruem vasos do xilema, sendo a taxa de fotoassimilação dessas plantas até 60% menor do que das plantas sadias (Machado *et al.*, 2001a). Sugere-se que a produção de

goma fastidiana pela *Xf* permite a formação de grandes agregados de células da bactéria, acarretando também a interrupção do fluxo regular da seiva nos vasos do xilema (Hopkins, 1985; Leite *et al.*, 2001), à semelhança de outros tipos de polissacarídeos extracelulares produzidos por bactérias fitopatogênicas (Dow & Daniels, 2000).

Contudo, não há prova experimental incisiva de que a colonização da *Xf* em seus diferentes hospedeiros resulte, por si só, em suficiente oclusão física de vasos do xilema, disfunção do sistema condutor de água e, conseqüentemente, estresse hídrico.

No patossistema *Xylella*-amendoeira, por exemplo, menos de 15% dos vasos xilemáticos de plantas com requeima foliar encontravam-se infectados pela *Xf* (Mircetich *et al.*, 1976). Já no patossistema *Xylella*-pessegueiro, não se observa relação entre concentração de *Xf*, condutividade hidráulica do caule e desenvolvimento vegetativo de plantas acometidas pela bacteriose (Anderson & French, 1987; Evert, 1987). No patossistema *Xylella*-videira, murcha foliar não é uma característica notória da DPV (Goodwin *et al.*, 1988).

Para o patossistema *Xylella*-citros, a relação entre vasos colonizados pela *Xf* e sintomas foliares da bacteriose não é tão evidente. Estudos de microscopia eletrônica de pecíolos de folhas com sintomas leves e severos da CVC, localizadas em um mesmo ramo, mostraram que há mais bactérias em pecíolos de folhas com sintomas mais intensos da CVC, embora não tenha sido detectada diferença estatística em relação ao número médio de células de *Xf* em folhas com sintomas leves da doença, o que permitiu concluir que a sintomatologia da CVC não está relacionada à proporção de vasos colonizados (Pascholati *et al.*, 2002).

Assim, os demais mecanismos de patogenicidade da *Xf* aventados (seqüestro de nutrientes, produção de fitotoxinas e/ou antibióticos e desbalanço fitormonal) devem, portanto, concorrer, isolada ou sinergisticamente, para agravar o mecanismo primário de estresse hídrico decorrente da oclusão física de vasos do xilema pela *Xf* (Hopkins, 1989; Machado *et al.*, 2001a).

Redução significativa de determinados nutrientes nas folhas das plantas sintomáticas infectadas com *Xf* é geralmente detectada, o que pode resultar de sua absorção pelas bactérias no interior da planta (Hopkins, 1989; Chang & Donaldson, 1993).

Com o seqüenciamento do genoma da *Xf*CVC (Simpson *et al.*, 2000), identificou-se a existência de um grande número de ORFs que codificariam proteínas de transporte de diferentes substâncias, tais como ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos, íons inorgânicos (fosfato, nitrato, nitrito e sulfato), peptídeos e vitaminas, o que capacitaria a bactéria a competir pelos nutrientes dissolvidos que compõem a seiva bruta (Machado *et al.*, 2000bc). Plantas com CVC têm deficiência de Fe (Beretta *et al.*, 1991; Gravena *et al.*, 1998) o que pode estar implicado com a existência de 140 ORFs em *Xf* que codificam proteínas putativamente relacionadas ao transporte e metabolismo desse elemento químico (Wixon, 2000). Contudo, deficiências nutricionais de Fe, bem como de outros nutrientes, não se caracterizam como sintomas ou fases específicas da CVC (Laranjeira, 1997b).

Sintomas foliares das doenças provocadas por *Xf* podem ser acentuados pela produção de proteínas tóxicas (Mircetich *et al.*, 1976) e/ou antibióticos (Hopkins, 1995) pela *Xf*. Fitotoxinas são produtos de baixo peso molecular sintetizados pelos patógenos que são reconhecidamente envolvidos no desenvolvimento de doenças, causando danos aos tecidos vegetais (Scheffer, 1983; Hayward, 1997). São substâncias móveis e não apresentam atividade enzimática, hormonal ou como fator de transcrição genética (Goodman *et al.*, 1986), representadas por derivados de aminoácidos, esteróides, peptídeos, glicopeptídeos, policetídeos, quinonas e terpenóides (Pascholati, 1995). Fitotoxinas podem alterar a permeabilidade e/ou o potencial de membranas celulares, resultando em desequilíbrio iônico e ativação ou inibição enzimáticas, dentre outras disfunções celulares e atuar como antimetabólitos, induzindo deficiências nutricionais na planta (Pascholati, 1995).

Embora fitotoxinas sejam substâncias prejudiciais às plantas hospedeiras mesmo sob baixas concentrações (Hayward, 1997), a baixa correlação entre concentração populacional de *Xf* e a sintomatologia da escaldadura da folha em amendoeira (Mircetich *et al.*, 1976) e da ameixeira japonesa (French & Kitajima, 1978) e a não identificação de substâncias bacterianas com efeito tóxico sobre a planta, por exemplo, sinalizam para a não participação de fitotoxinas da *Xf* na patogênese dessas doenças (Purcell & Hopkins, 1996).

Com o seqüenciamento do genoma da *Xf/CVC*, determinou-se a existência de ORFs putativamente codificadoras de fitotoxinas semelhantes à hemolisina, pertencentes à família das toxinas RTX (repetições em toxina); a policetídeos; à uma fitotoxina protéica presente em *Pseudomonas fluorescens* e à biosíntese de precursores de receptores de colicina V, importante antibiótico peptídeo (Simpson *et al.*, 2000; Keen *et al.*, 2000; Bhattacharyya *et al.*, 2002). As três primeiras classes de toxinas são fatores de virulência freqüentes em bactérias patogênicas gram-negativas animais e comprometem o correto funcionamento de células e organelas vegetais (Keen *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2001bc; Camargo, 2002), enquanto que a última delas sugere um mecanismo de defesa da *Xf* contra toxinas sintetizadas por outros microorganismos endofíticos do xilema (Machado *et al.*, 2001bc). Outras substâncias fitotóxicas devem ser expressas pela *Xf*, haja vista que estudo proteômico da bactéria acusou a presença de diferentes proteínas tóxicas na superfície celular da *Xf* (Smolka *et al.*, 2003).

No patossistema *Xylella*-citros, estudo de anormalidades histológicas de tecidos foliares sintomáticos de CVC suporta a hipótese de que fitotoxinas agem sobre esses tecidos da planta (Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999).

Contudo, avaliação fisiológica de plantas com CVC ainda não é conclusiva sobre a participação de fitotoxinas na patogenicidade da *Xf*. Em trabalho pioneiro no patossistema *Xylella*-citros, Machado *et al.* (1994a) detectaram folhas de plantas afetadas pela doença com déficit hídrico associado à redução da taxa fotossintética, condutividade estomática, transpiração e potencial hídrico e mecanismo de abertura e fechamento estomático funcional, descaracterizando a participação de fitotoxinas bacterianas no mecanismo de patogenicidade da doença, no tocante à execução de atividades fotossintéticas (Machado *et al.*, 1994a).

Por sua vez, detectou-se insensibilidade estomática de folhas quanto ao déficit de pressão de vapor (DPV) no ar atmosférico em laranjeiras com CVC, relacionada ao efeito depressivo nas etapas fotoquímica e bioquímica da fotossíntese, resultando em menor eficiência de carboxilação nas folhas doentes, sugerindo que além de disfunção xilemática decorrente de obstrução física, fitotoxinas atuam como um mecanismo de patogenicidade da *Xf/CVC*, agindo sobre os estômatos de plantas doentes (Haberman, 1999). Recentemente, o fluxo de seiva por unidade de área foliar de laranjeiras

infectadas por *Xf* foi determinado, pelo método de balanço de calor, como sendo somente de 38% daquele total em plantas saudáveis, com resistência foliar à difusão de vapor de 35 a 97% maior nas plantas infectadas, tanto em folhas sintomáticas ou não (Dal Bosco, 2001). Face à constatação da ocorrência de fechamento estomático e redução da transpiração nessas plantas, pode-se invocar a ação de algum composto sintetizado pela *Xf* ou pela planta infectada (Dal Bosco, 2001).

Trabalho recente com discos extraídos de folhas maduras de laranja 'Pêra' com CVC, em que se suprimiu artificialmente a fotorrespiração, obteve-se a eliminação do efeito estomático, sugerindo que menor *A* de plantas doentes possa ser produzido, além da queda de *gs*, por danos nas reações bioquímicas do processo fotossintético, via fitotoxina ou consequência indireta de respostas da planta à infecção pelo fitopatógeno (Ribeiro, 2002). Resultados semelhantes são provocados por outros patógenos bacterianos, por intermédio de metabólitos tóxicos da bactéria sobre os cloroplastos (Goldman *et al.*, 1986).

Com relação à hipótese do mecanismo fitormonal de patogenicidade da *Xf*, embora essa classe de substâncias seja atóxica quando sintetizada pela planta, eventual desequilíbrio hormonal induzido pelo patógeno é considerado fator de virulência, na medida que pode resultar em sintomas como nanismo, superbrotamento e murchas (Hayward, 1997), como acontece em diferentes hospedeiros da *Xf*.

Desbalanço fitormonal, principalmente de ácido giberélico (AG) e ácido abscísico (ABA), foi aventado para justificar os sintomas característicos das doenças DPP e DPV. Dentre outras atividades biológicas que modulam, o AG é conhecido pela sua ação no crescimento da planta e o ABA é relacionado ao mecanismo de fechamento estomático, no tocante à abertura dos canais de íons e bombeamento de prótons nas células-guarda (Taiz & Zeiger, 1991). Sabe-se que as plantas respondem à seca e a muitos outros estresses, pelo acúmulo de ABA. Aplicações de ABA mimetizam o efeito de estresse hídrico em plantas e auxiliam a planta a sobreviver melhor ao estresse de água (Quarrie, 1984).

A aplicação de AG em pessegueiros com nanismo redimiu parcialmente os sintomas, restabelecendo a absorção normal de íons pela raiz e estimulando novo crescimento vegetativo, sem, contudo, afetar a concentração de *Xf* nas plantas (French &

Stassi, 1978). O uso de paclobutrazol, inibidor da síntese de AG, causa sintomas similares à DPP, tais como abundância de florescimento, aumento do teor de clorofila e redução de crescimento (Erez, 1984).

Por sua vez, folhas de videira com DPV apresentam maiores concentrações de ABA, possivelmente sintetizada em decorrência do estresse hídrico induzido pela obstrução física do sistema xilemático pela *Xf* (Goodwin *et al.*, 1988).

A participação do desequilíbrio de ABA no mecanismo de patogenicidade no patossistema *Xylella*-citros foi avaliada. Sabe-se que a redução do ψ_a determina a concentração de ABA nas células-guarda, induzindo o fechamento estomático (Goodwin *et al.*, 1988). Contudo, não se evidenciou relação direta entre g_s e concentração de ABA em folhas de plantas doentes com severa redução na abertura estomática, já que folhas doentes e sadias apresentaram os mesmos teores desse fitormônio (Gomes, 2001).

Ação sinérgica entre diferentes mecanismos de patogenicidade da *Xf* pode potencializar o efeito do estresse de água. Em se tratando da CVC, sugere-se que a *Xf* que coloniza plantas suscetíveis compete por íons Zn com a planta (Gravena *et al.*, 1997), o que acarretaria em menor síntese de ácido indol acético (AIA) e, conseqüentemente, redução de entre-nós, folhas e frutos em plantas com CVC (Queiroz-Voltan & Paradela Filho, 1999). Aplicações foliares de AIA inibem a colonização da *Xf* e o desenvolvimento de sintomas foliares de DPV em variedades moderadamente resistentes de videira. Contudo, sintomas da DPV não foram redimidos com a aplicação desse fitormônio em variedades de videiras suscetíveis à *Xf*/DPV (Hopkins, 1985).

Independentemente do(s) mecanismo(s) de patogenicidade que se opera, considera-se a *Xf* como um patógeno ocasional ou oportunista (Hopkins, 1989). Sua patogenicidade nas plantas hospedeiras é agravada em virtude de outros estresses a que a planta é submetida, tais como outros déficits hídricos, doenças e super frutificação (Purcell & Hopkins, 1996).

5.3. Construção de mapas genéticos em citros

Há na literatura uma sequência-consenso de etapas a serem vencidas em trabalhos que visam à identificação de marcadores ligados a gene(s) que conferem resistência/tolerância a fatores de estresse (a)bióticos: (i) os materiais genéticos a serem cruzados devem ter sido, no mínimo, submetidos a *screening* para a resistência/tolerância ao fator limitante em questão; (ii) deve se proceder a estudos da herança da resistência/tolerância ao fator (a)biótico avaliado e (iii) posteriormente, identifica-se marcadores genéticos estatisticamente associados a esses genes (Liu, 1998; Grattapaglia & Sederoff, 1994).

A execução das duas últimas etapas em programas de melhoramentos de citros se dá, geralmente, com a análise da segregação em progênies de irmãos completos, constituídas de híbridos F₁ e aquelas obtidas por retrocruzamento. Assim, o método mais comum para mapear genes de plantas, que envolve o cruzamento de duas linhas puras para produzir progênies F₁, que é posteriormente cruzada sob diferentes meios para produzir descendência segregante (Hansen *et al.*, 1999), não é rotina no melhoramento de citros, tendo em vista o demorado intervalo entre as gerações e o efeito de depressão por endogamia. Populações segregantes constituídas de híbridos F₁, resultantes do cruzamento de indivíduos de espécies heterozigóticas, assemelham-se a populações F₂ ou de RC obtidas a partir de cruzamentos de linhagens homozigóticas fenotipicamente divergentes quanto à característica sob estudo em culturas anuais (Ferreira & Grattapaglia, 1996). A identificação de marcadores ligados a genes que conferem resistência/tolerância em citros, herdados mono ou poligenicamente vem sendo obtida por meio de análises de populações segregantes com fenótipos contrastantes (*bulked segregant analysis*) (Michelmore *et al.*, 1991) e através da construção de mapas genéticos (Paterson *et al.*, 1988).

As espécies cítricas apresentam características adequadas à construção de mapas genéticos de ligação, tais como relativa facilidade de síntese de híbridos interespecíficos à intergenéricos em citros, sua condição diplóide e reduzido número cromossômico ($n = 9$) (Soost & Cameron, 1975) e pequeno tamanho do genoma ($2C = 5,8 \times 10^8$ pb ou 0,60-0,62 pg DNA por núcleo) (Guerra, 1984). Contudo, existem barreiras biológicas, tais

como ciclo reprodutivo longo, depressão por endogamia, heterozigosidade elevada e embrionia nucelar (Cameron & Frost, 1968; Soost & Cameron, 1975; Grosser & Gmitter, 1990; Moreira & Pio, 1991; Davis & Albrigo, 1994) que, por sua vez, dificultam a síntese de populações segregantes e, por consequência, tornam difíceis e/ou extremamente demorado estudos sobre a herança de características agronômicas e geração de mapas genéticos em citros. Culturas autógamas anuais permitem a obtenção de gerações avançadas em curto espaço de tempo, ao passo que a obtenção de uma simples geração F_2 em espécies de elevada heterozigosidade, alógamas e de ciclo reprodutivo longo como citros, constitui um desafio, não tendo sido desenvolvida, até o momento, nenhuma linhagem de autofecundação em citros (Roose *et al.*, 1998). A simples geração de populações experimentais em citros já é difícil de se obter (Jarrell *et al.*, 1992). Citricultores recorrem, invariavelmente, a mutantes naturais para diversificar a cultura. Para as laranjeiras doces, por exemplo, quase 50% das variedades comerciais disponíveis são comprovadamente originadas de mutações de gemas ou de plântulas, não envolvendo qualquer atividades de hibridação controlada (Hodgson, 1969).

O fato de os citros serem espécies alógamas de elevada heterozigosidade (Davis & Albrigo, 1994), faz com que o mapeamento em citros seja conduzido em populações derivadas dos parentais heterozigóticos (Jarrell *et al.*, 1992). Para contornar o problema do alto nível de heterozigosidade oriunda de cruzamentos F_1 de plantas de espécies alógamas, que impede a obtenção de linhagens puras, uma metodologia teórica foi desenvolvida para a estimativa de frequências de recombinação a partir de populações obtidas pelo cruzamento de parentais heterozigóticos (Ritter *et al.*, 1990; Ridout *et al.*, 1998). São obtidos, então, dois mapas: um para cada parental. Com o advento de técnicas moleculares modernas, melhoramento de espécies perenes foi alavancado. Exemplo disso foi a descrição da estratégia de mapeamento “pseudo-testcross” (Grattapaglia & Sederoff, 1994), que permite a rápida geração de mapas genéticos de espécies perenes, como as de citros. O princípio dessa estratégia é inferir a condição homo ou heterozigótica de um determinado locus genético por meio da segregação de marcadores genéticos moleculares desses loci em uma progênie de híbridos F_1 , dada a dificuldade de se obter gerações segregantes avançadas (F_2 , F_3 ,...). Em se tratando de marcadores moleculares dominantes, locus em heterozigose é detectado quando a

proporção mendeliana de 1 marcador presente : 1 marcador ausente é observada entre a população de híbridos, i.e., um dos parentais está em homozigose recessiva (com duas formas alélicas não detectadas, os chamados ‘alelos nulos’) e o outro parental é heterozigótico para um marcador dominante. Por sua vez, locus heterozigoto de marcador codominante segrega na proporção de 1 : 2: 1 quando ambos os parentais são heterozigóticos para o locus. Conseqüentemente, geram-se mapas de ligação de cada parental com base em marcadores com segregação 1:1 e 3:1 (Grattapaglia & Sederoff, 1994). Em resumo, a geração F₁ obtida do cruzamento entre duas plantas heterozigotas lembra uma população F₂ ou de retrocruzamento obtida em programas de melhoramento de culturas anuais (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Raros são os caracteres morfo-agronômicos importantes que apresentam herança monogênica em citros (Davis & Albrigo, 1994) e, invariavelmente, seu melhoramento é um processo longo que requer grande investimento em tempo e espaço para avaliação de progêies (De Simone *et al.*, 1998). Assim, a principal contribuição que o mapeamento genético pode trazer ao melhoramento de citros é a identificação e a localização de QTLs/QRLs de grandes efeitos individuais, úteis, sob um esquema de seleção assistida por marcador, na seleção juvenil de genótipos superiores, quanto à resistência a fitopatógenos e/ou à performance elevada de produtividade, por intermédio apenas de sua genotipagem molecular (Roose *et al.*, 1992), o que é, obviamente, de grande interesse em melhoramento de citros.

Aspectos gerais da construção de mapas genéticos de ligação em espécies alógamas

A análise de ligação com vistas à geração de mapas genéticos envolve (i) avaliação do padrão de segregação das marcas individuais, (ii) a detecção de desequilíbrio de ligação entre pares de marcadores, (iii) a mensuração da distância entre as marcas e (iv) o ordenamento das marca em grupos lineares de ligação (Coelho & Silva, 2002).

Mapas genéticos, construídos a partir de marcadores moleculares, são elaborados via análise de segregação, co-segregação e recombinação de marcadores nas células gaméticas resultantes da meiose (Lynch & Walsh, 1997), à semelhança das análises clássicas de mapeamento, qual seja, (i) marcadores localizados em diferentes

cromossomos devem segregar independentemente e marcadores dispostos no mesmo cromossomo co-segregam juntos e (ii) quanto maior a distância entre dois genes, maior taxa de *crossing-over* e maior frequência de fenótipos recombinantes é possível detectar. Por meio da frequência relativa de eventos de recombinação entre os marcadores, mapas genéticos são capazes de informar a posição espacial relativa entre os genes e/ou a sequência de DNA conhecida (lócus marcadores), não se requerendo para a sua construção o conhecimento prévio sobre a base bioquímica ou molecular dos genes (Farah, 1997). Marcadores que se encontram a 1 cM (centiMorgan) de distância ao longo do cromossomo apresentam uma frequência recombinacional de um por cento (Paterson *et al.*, 1988) e, em geral, distanciam-se aproximadamente 1 Mb (Farah, 1997).

Problemas relacionados à auto-incompatibilidade e à depressão endogâmica restringem esforços na obtenção de gerações de autofecundação, retrocruzamento, F₂ e de linhagens puras recombinantes (RILs) e duplo-haplóides fenotipicamente divergentes em espécies alógamas (Carneiro, 2001). Desse modo, a alternativa racional para geração de populações segregantes de espécies alógamas perenes é a execução de cruzamentos controlados entre indivíduos com heterozigosidade elevada, típicas nessas espécies, o que resulta progênie análogas à população F₂ ou de RC (Ritter *et al.*, 1990; Silva, 2001).

Nesse delineamento genético, explora-se a informação contida nos lócus segregantes para se detectar o desequilíbrio de ligação, permitindo análises de ligação para a construção de mapas genéticos (Coelho & Silva, 2002; Liu, 1998). Desequilíbrio de ligação é a associação não-randômica de alelos de diferentes lócus em uma população, que se traduz em desvios das frequências alélicas observadas em relação às esperadas, sob segregação independente de lócus diferentes, indicando a existência de uma associação física entre esses dois lócus, situados em regiões próximas ao longo de determinado cromossomo, o que é a base para o mapeamento de ligação clássico (Tanksley, 1993; Liu, 1998; Coelho, 2000; Silva, 2001). Desequilíbrio de ligação pode ser causado, por exemplo, por ação da seleção e deriva genética. Contudo, em gerações segregantes primárias, decorrentes de cruzamentos controlados (populações F₂, F₃ ou RC) a causa predominante é a ligação física dos lócus (Tanksley *et al.*, 1993). À

semelhança dos tradicionais delineamentos genéticos de espécies autógamas, distorções mendelianas são freqüentes (Liu, 1998).

Previamente aos cálculos de distância genética, os pares de marcadores moleculares têm suas freqüências avaliadas, com vistas a detectar a sua ligação física em um mesmo cromossomo (desequilíbrio de ligação), o que é feito geralmente pelo teste de aderência de qui-quadrado e pelo método de máxima verossimilhança (Bearzoti, 2000). A constatação da ausência de proporções mendelianas atesta que dois loci são herdados juntos (Silva, 2001; Liu, 1998).

Métodos de estimativas da freqüência de gametas recombinantes entre pares de loci de espécies alógamas são idênticos aqueles comumente adotados em procedimento padrão de mapeamento de espécies autógamas, tais como o método da máxima verossimilhança, método dos momentos e dos quadrados mínimos (Liu, 1998).

Relação entre as distâncias genéticas e a freqüência de gametas recombinantes para dois loci quaisquer são obtidas por funções de mapeamento (Liu, 1998; Lych & Walsh, 1998). Em estudos de mapeamento genético vegetal, as principais funções de mapeamento são as de Haldane (1919) e Kosambi (1944) (Staub *et al.*, 1996). A diferença básica entre essas duas funções de mapeamento é que a primeira pressupõe a ausência de interferência entre eventos de *crossing-overs*, ao passo que a segunda leva em consideração a interferência entre permutas, o que é importante para loci próximos entre si (Lych & Walsh, 1998).

Definidas a distância genética entre pares de loci, tem-se início a construção dos grupos de ligação, que podem ser definidos como agrupamento estatístico de marcadores moleculares que segregam em um mesmo cromossomo. Grupos de ligação são estabelecidos dentro de determinados níveis de estringência estatística. Geralmente é adotado valor LOD score entre 4 a 6, haja vista que valores menores e maiores que esse intervalo resultam, invariavelmente, ligações espúrias entre marcadores e fragmentação de grupos de ligação, respectivamente (Grattapaglia & Sederoff, 1994).

Finalmente, a melhor ordem dos marcadores genéticos dentro de cada grupo de ligação em um mapa é determinada, empregando-se as metodologias de (i) anelamento simulado (Kirkpatrick *et al.*, 1983); (ii) delineação rápida em cadeia (Doerge, 1996); (iii) ramos e conexões (Thompson, 1987) ou (iv) seriação (Buetow & Chakravarti, 1987),

empregando-se diferentes tipos de programas como Gmendel (Liu & Knapp, 1990); JoinMap (Van Ooijen & Voorrips, 2001); Linkage-1 (Durham *et al.*, 1992); Mapmanager QT (Manly & Elliott, 1993), MAPRF (Zimnoch-Guzowska *et al.*, 2000); PGR1 (Remington *et al.*, 1999) e Qgene (Nelson, 1997).

Aspectos gerais do mapeamento de QTLs e QRLs

Os caracteres que apresentam variação contínua são denominados de caracteres métricos ou quantitativos, haja vista a necessidade da mensuração/contagem dos mesmos. Caracteres quantitativos resultam da segregação simultânea dos genes que afetam a característica, bem como de variações de causa não-genética (Falconer & Mackay, 1996). O advento dos marcadores moleculares permitiu um saldo qualitativo, em relação à análise biométrica (média, variância e covariância) de um pool de genes responsáveis pela característica (Fisher, 1918), uma vez que se caracteriza a arquitetura de características quantitativas, ou seja, o número, posição, tipo de ação e interação gênicas e magnitude do efeito da contribuição individual de cada gene ou região genômica (QRL/QRL) ao fenótipo (Falconer & Mackay, 1996; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

QTL e QRL são termos cunhados para designar uma região cromossômica, definida pela ligação a um ou mais loci marcadores, podendo englobar um, dois ou mais genes, de efeito significativo na herança de uma determinada característica fenotípica quantitativa (Falconer & Mackay, 1996; Camargo, 2000). O procedimento de detecção, de localização e de estimação dos efeitos de QTLs é denominado de mapeamento de QTLs (Tanksley, 1993; Silva, 2001). A determinação da constituição mono, oligo ou poligênica de um QTL é considerada um dos maiores desafios da genética quantitativa (Tanksley, 1993).

Marcadores morfológicos foram os primeiros a serem empregados na identificação de QTLs. Gene relativo à pigmentação de semente, característica monogênica discreta, encontra-se associado ao efeito de um locus individual do caráter quantitativo tamanho de sementes em feijão, o que foi interpretado como sendo decorrente da ligação entre um gene único, controlando cor de semente a um ou mais dos poligenes que controlam tamanho da semente no feijoeiro (Sax, 1923).

Posteriormente, outras ligações entre efeitos de características quantitativas e genes de efeito fenotípico maior foram relatadas (Rasmusson, 1933; Everson & Schaller, 1955). Com o advento de marcadores isoenzimáticos, cujo fenótipo é facilmente reconhecível e não-deletério e que pode identificar locus marcadores distribuídos ao longo de todo o genoma, eventual detecção e mapeamento de todos os poligenes (QTLs) responsáveis por uma determinada característica quantitativa foi aventada, o que poderia resultar na seleção indireta da característica baseada no efeito fenotípico do locus marcador vizinho (Thoday, 1961).

O primeiro emprego de marcadores moleculares(RFLP) no mapeamento de QTLs foi relacionado a caracteres anatômicos e organolépticos em tomate (Paterson *et al.* 1988).

Para se mapear um QRL ou um QTL é necessário, inicialmente, que (i) o cruzamento resulte variabilidade genética suficiente para a característica estudada, (ii) as progênies sejam seguramente avaliadas para os caracteres quantitativos de interesse e (iii) as progênies sejam molecularmente genotipadas com marcadores seletivamente neutros e regularmente distribuídos pelo genoma. Por meio de testes estatísticos múltiplos de ligação para cada posição ou intervalo x ao longo do genoma, é feita uma varredura de QTLs que, por ventura, se localizem próximos a esses locus marcadores, quando a estatística empregada evidencia um desvio significativo a partir do qual se esperaria sob produto de acaso (Lander & Kruglyak, 1995; Silva, 2001). Independentemente das estratégias de mapeamento a serem adotadas, que serão, em conjunto, apresentadas posteriormente, trabalhos de mapeamento genético atestam significância a um determinado QRL/QTL por meio das seguintes ferramentas de análises estatísticas equivalentes: LOD score, p value e z -score (Lander & Kruglyak, 1995). Todas essas ferramentas de análises estatísticas dependem da distribuição dos valores da característica quantitativa (Doerge & Rebaï, 1996). Há metodologias estatísticas que não requerem distribuição teórica de dados, tais como testes de permutação randômica dos valores observados, como o empregado para se determinar a exata distribuição nula de LOD (Churchill & Doerge, 1994).

À semelhança da construção de mapas genéticos, a detecção de ligação genética entre marcadores genéticos e QRLs/QTLs depende da existência de desequilíbrio de

ligação, no caso, desvios entre as proporções esperadas pela segregação independente de alelos dos loci marcador e as dos QRL/QTL sob análise (Tanksley, 1993; Coelho, 2000). A magnitude dos efeitos quantitativos associados ao marcador, decorrentes do desequilíbrio gamético, é estatisticamente averiguada. Há diferentes procedimentos para determinar se há um QRL/QTL ligado a um locus marcador, todos baseados na partição da população em diferentes classes genotípicas com base nos genótipos do locus marcador. Se diferença significativa é atestada entre as médias do fenótipo quantitativo das classes genotípicas do marcador, pode-se presumir com segurança a detecção de um QTL ou QRL (Silva, 2001; Tanksley, 1993). O procedimento é repetido para todos os loci marcadores, dispersos por todo o genoma para se detectar tantos QRLs/QTLs quanto possível (Tanksley, 1993).

QRLs/QTLs podem ser detectados adotando-se avaliação com um, dois ou mais loci marcadores (Lynch & Walsh, 1998), empregando-se diferentes tipos de programas como Linkage 1 (Suiter *et al.*, 1983); Gmendel (Liu & Knapp, 1990); Mapmanager QT (Manly & Elliott, 1993); CRI-MAP (Devey *et al.*, 1996); Qgene (Nelson, 1997); QTLCartographer (Basten *et al.*, 2000) e JoinMap (Van Ooijen & Voorrips, 2001).

Na análise pontual de marcadores (APM), a distribuição dos valores médios e de variância do caráter é examinada comparando-se os grupos de genótipos de cada locus marcador como classe de variáveis. Desse modo, a hipótese de nenhuma diferença entre os dois genótipos parentais é testada (Satagopan, 1996). Uma diferença estatisticamente significativa reflete que, no mínimo, um locus segregante, agindo na expressão da característica biométrica é geneticamente ligado ao marcador (Prioul *et al.*, 1997). Essa abordagem é a mais simples para detecção de QTL, não se requerendo um completo mapa de ligação com marcadores moleculares (Tanksley, 1993). Esse tipo de análise é, geralmente, uma boa opção quando o objetivo é simplesmente a detecção de QRLs/QTLs ligados à marca, o que permite uma boa abordagem inicial do assunto, desde que não se esteja interessado em localizar a posição exata do QRL/QTL no cromossomo (Sabadin & Garcia, 2001). Contudo, as principais desvantagens desses procedimentos é que (i) falsos QRLs/QTLs positivos podem ser identificados se o nível de significância for baixo e que (ii) a exata localização do QRL/QTL não pode ser estimada. Adicionalmente, a magnitude dos efeitos do gene são sub-estimados quando o

locus estiver muito longe do locus marcador, não podendo se distinguir um QRL/QTL de grande efeito, localizado distante do locus marcador de um QRL/QTL de pequeno efeito, situado mais próximo da marca, devido à recombinação entre o locus marcador e o QRL/QTL (Tanksley, 1993; Satagopan *et al.*, 1996; Prioul *et al.*, 1997; Kearsey & Farquhar, 1998; Liu, 1998). Contudo, até mesmo a posição e os efeitos do QRL/QTL podem ser obtidos, com segurança, via APM, desde que um grande número de marcadores moleculares segregantes seja empregado, cobrindo o cromossomo em intervalos menores do que 15 cM. Dessa maneira, qualquer QRL/QTL de efeito potencial estará, em tese, ligado no mínimo a um locus marcador (Tanksley, 1993) e, assim, a abordagem APM se equipara a abordagens baseadas em mapeamento por intervalo (Stuber *et al.*, 1992). A detecção de QRL/QTL, empregando um único marcador, é feita através de diferentes formas de análise estatística, incluindo análise de variância, regressão linear simples, teste *t* (Churchill & Doerge, 1994; Sabadin & Garcia, 2001) e correlação padrão de Spearman (Emebiri, 1997).

Para esse tipo de análise, também foi sugerido o método de máxima verossimilhança ('maximum likelihood estimation') (Weller, 1986), que permite, além de detectar o QRL/QTL, estimar a sua posição. Conforme salientado por Silva (2001) essa estatística, baseada em *odds ratio* (razão de chances), independe da distribuição dos dados, i.e., não requer distribuição teórica e sua interpretação é intuitiva e relativa a cada amostra, baseada em gráficos LOD score (LOD, para "log odds"). LOD score é um logaritmo na base dez de uma razão, onde o numerador corresponde às chances de que os dados quantitativos provenham de um QRL/QTL ligado ao locus marcador (hipótese alternativa); já o denominador corresponde às chances da inexistência de um QRL/QTL estar ligado aquele marcador (hipótese nula). Assim LOD score igual a 3, por exemplo, sinaliza que a hipótese da existência de QRL/QTL ligado ao locus marcador é 1000 (10^3) vezes mais provável que a hipótese da ausência de QTL.

O problema da não distinção da magnitude do efeito do QRL/QTL, pelos métodos de APM, foi inicialmente resolvido com a abordagem de mapeamento de QRLs/QTLs flanqueados por dois locus marcadores, denominada mapeamento por intervalo simples (MIS, *simple interval mapping*) (Prioul *et al.*, 1997). O método MIS foi primeiramente demonstrado com a identificação de um QTL em um mapa de ligação,

referente a um *backcross* interespecífico de tomate (Paterson *et al.*, 1988). Nessa estratégia, que é uma extensão do modelo de mapeamento de LOD score para marcas simples proposto por Weller (1986), cada par de marcas adjacentes é avaliado quanto à presença de QRLs/QTLs. Com isso, é possível compensar a recombinação entre os marcadores e o QTL, aumentando a probabilidade da detecção estatística do QRL/QTL e também provendo uma estimativa não tendenciosa do efeito do QRL/QTL sobre o caráter (Tanksley, 1993). Se o LOD score excede um limiar pré-determinado, a presença do QTL é inferida (Paterson *et al.*, 1988). Por exemplo, no mapeamento por intervalo de genomas com 60 marcadores e 1200 cM de comprimento, foi definido que LOD score maior que 2,4 é suficiente para se evitar a detecção de QTLs fantasmas, com 95% de confiabilidade (Lander & Botstein, 1989). Por utilizar a informação de marcadores genéticos flanqueadores, a metodologia MIS faz inferência sobre regiões de todos os cromossomos, estimando-se a posição e os efeitos dos QTL para cada intervalo dos grupos de ligação (Lander & Botstein, 1989; Silva, 2001), evitando-se sobreposição de efeitos fenotípicos decorrentes da recombinação, como ocorre com a estratégia APM (Paterson *et al.*, 1988). Comparando-se as estratégias APM e MIS, supondo QTL/QRL distantes, por exemplo, a 10 cM de uma marca ou equidistante de duas marcas, respectivamente, o QTL/QRL será mal classificado em aproximadamente 10% das vezes na abordagem APM, já que o *crossing-over* é proporcional à distância do QRL/QTL ao locus marcador. Por sua vez, para a abordagem MIS, que é baseada em dois locus marcadores ligados, a taxa de má classificação é reduzida para aproximadamente 1%, já que somente nos casos em que ocorrer duplo *crossing-over* entre o QRL/QTL e os locus marcadores 1 e 2, identificar-se-á um falso QRL/QTL em um determinado indivíduo (Tanksley, 1993). O máximo benefício da abordagem MIS sobre a APM se dá quando os marcadores ligados estão, em média, distanciados a 20 cM. Sob essa distância, tem-se muitos eventos de *crossing-over* entre os locus marcadores e o QTL/QRL, cujo efeito é anulado pela análise por intervalo (Tanksley, 1993). Quando locus marcadores estão muito distanciados (e.g. > 35 cM), a abordagem MIS é ineficiente em detectar QTL nos intervalos entre os mesmos (Tanksley, 1993).

Uma estratégia alternativa de mapeamento por intervalo, empregando análise de regressão múltipla foi desenvolvida (Haley & Knott, 1992). Essa estratégia produz

resultados tão acurados e precisos quanto à abordagem MIS, além de ser computacionalmente simplificada (Kearsey & Farquhar, 1998).

Contudo, à semelhança de análise de QRL/QTL por marcas simples, essa estratégia de mapeamento também não discrimina quando dois ou mais QRLs/QTLs estão ligados ao intervalo de um grupo de ligação sob análise e/ou identificação de QRLs/QTLs ‘fantasmas’, que são regiões genômicas erroneamente identificadas como portadoras de QRLs/QTLs QTLs (Silva, 2001).

Na primeira metade da década de 90, foi proposta a estratégia denominada mapeamento por intervalo composto (MIC, *composite interval mapping*) (Jansen & Stam, 1994; Zeng, 1994), que combina as técnicas de MIS e de modelo de regressão múltipla (Edwards *et al.*, 1987), com vistas a excluir as influências de QRLs/QTLs adjacentes sobre o intervalo do grupo de ligação que está sendo mapeado (Silva, 2001). Modelos de regressão linear multivariada (Grattapaglia *et al.*, 1996) e quadrática (Edwards *et al.*, 1987) vêm sendo também empregadas em estratégias MIC.

Dada a estrutura de correlação entre múltiplos caracteres quantitativos e o ambiente, o modelo de MIC foi estendido, posteriormente, para análises simultânea de QRLs/QTLs de múltiplos caracteres e/ou ambientes, com vistas a estudos de pleiotropia e interações genótipo-ambiente (Jansen, 1993; Jiang & Zeng, 1995). Com isso, a variação residual devido a outro QRL/QTL pode ser identificada e removida do erro, após um *screening* inicial para identificar QRL/QTL, o que aumenta a herdabilidade de um dado QRL/QTL, tornando a detecção de QRLs/QTLs mais provável (Jansen, 1993; Jansen & Stam, 1994).

Recentemente foi descrita a técnica de mapeamento por intervalo múltiplo (MIM, *multiple interval mapping*) (Kao *et al.*, 1999), em que diferentes intervalos de mapa são empregados concomitantemente como co-fatores para o mapeamento de QRLs/QTLs. A técnica MIM permite estimar possíveis efeitos epistáticos entre QRLs/QTLs, além de aumentar o poder da detecção de QRLs/QTLs (Silva, 2001).

Além dos métodos descritos acima, que têm em comum o fato de necessitar da prévia geração de polimorfismo de DNA e da avaliação fenotípica de toda a população-mapa, QRLs/QTLs de grande efeito podem ser mais rapidamente mapeados pela estratégia do “bulked segregant analysis” (BSA). A técnica se baseia na detecção de

polimorfismo de marcadores arbitrários entre *bulks* de DNA de híbridos cuja performance corresponde às extremidades de um fenótipo normalmente distribuído, potencializando, assim, a ligação de marcadores com QRLs/QTLs (Michelmore *et al.*, 1991), o que reduz sensivelmente os gastos de genotipagem prévia com marcadores moleculares de toda a população segregante. Essa estratégia resulta em um rápido ponto de partida para análise de QRLs/QTLs, não requerendo, para isso, a constituição de NILs (*near isogenic lines*), que diferem apenas o dado locus que se quer mapear. Em virtude disso, o BSA é fortemente indicado como uma estratégia de mapeamento para espécies alógamas, como citros, cuja obtenção de NILs é praticamente impossível, e, conseqüentemente, dependem da divergência genética entre os parentais (Michelmore *et al.*, 1991).

Tanto as estratégias baseadas em mapeamento genético prévio, ou não, como é o caso de BSA, podem ter seus poderes de detecção de QTLs/QRLs reduzidos quando se avaliam caracteres quantitativos de baixa herdabilidade e herança complexa, face à grande influência do ambiente (Young, 1996). Ferreira & Grattapaglia (1996) consideram a ação de fatores ambientais na expressão final do fenótipo biométrico como o maior problema na identificação de QRLs/QTLs, uma vez que leva à inconstância de seus efeitos. Desse modo, a redução do efeito da variação ambiental na característica em estudo, por meio de réplicas de cada indivíduo, obtidas com linhas RILs e DH (Kearsey & Farquhar, 1998) e também por propagação vegetativa, como em citros, promovem uma melhor estimativa do número de QRLs/QTLs responsáveis pela característica (Tanksley, 1993). A posição e a magnitude dos efeitos de um QRL/QTL, tamanho do genoma, delineamento experimental empregado, frequência de recombinação entre o marcador e o QRL/QTL tipo de interações entre genes, tipo e tamanho da população segregante e o grau de saturação de mapas genéticos também influenciam a capacidade de detecção de QRLs/QTLs (Lander & Botstein, 1989; Tanksley, 1993; Ferreira & Grattapaglia, 1996).

A análise de locus individual quase sempre subestima o número de QRLs/QTLs responsáveis por uma característica quantitativa, uma vez que capta QRLs/QTLs de grandes efeitos fenotípicos, que são estatisticamente identificados acima do limiar de detecção, a depender do tamanho da população segregante (Tanksley, 1993). Para que

lócus de pequeno efeito ou QRL/QTL de grande efeito constituído de dois ou mais QRLs/QTLs de efeito menor, estreitamente ligados (< 20 cM), que controlam uma determinada característica quantitativa, alcancem significância estatística e sejam reconhecidos, é sugerida a construção de mapas genéticos a partir de população-mapa relativamente grande (> 500 indivíduos) (Tanksley, 1993).

Finalmente, a proporção da variação fenotípica acumulada do caráter quantitativo atribuída à combinação de todos os QRLs/QTLs detectados pode ser estimada pelo coeficiente de determinação (r^2), que traduz a magnitude do efeito dos QRLs/QTLs detectados sobre a característica (Edwards *et al.*, 1987; Tanksley, 1993). QTLs/QRLs com efeitos significativamente maiores têm sido identificados para a maioria dos caracteres estudados. Contudo, a maioria dos QRLs/QTLs relatados apresenta pequeno efeito, responsáveis por menos de 10% da variância fenotípica (Tanksley, 1993). Se, por exemplo, n QTLs detectados respondem parcialmente pela variância genética total, é presumível supor que QRLs/QTLs adicionais, provavelmente de pequeno efeito, sejam responsáveis pelo percentual de variância remanescente (Tanksley, 1993).

Construção de mapas genéticos em citros

Até o momento foram reportados 28 trabalhos de mapeamento genético em citros. Quatorze deles referem-se à descrição da construção de mapas genéticos sem, contudo, estudar a ligação de marcas genéticas com lócus ou a QRL/QTL, controlando características agronômicas de interesse (Quadros 1A a 1C).

A grande maioria dos mapas genéticos de citros é gerada a partir de populações segregantes obtidas de cruzamentos simples ($A \times B$). Exceção se faz para aquelas populações geradas por cruzamentos triplos ($A \times B \times C$) (Durham *et al.*, 1992; Luro *et al.*, 1994; Tozlu *et al.* 1999ab; Deng *et al.*, 1997), sob configuração $A \times B \times C \times D$ (Ling *et al.*, 2000) ou decorrentes de F2 intergenérica ($A \times B \times C \times B$) (Jarrell *et al.*, 1992). Análise genética ‘pseudo-testcross’ na elaboração de mapas genéticos de citros vem sendo rotineiramente empregada (De Simone *et al.*, 1998; Cristofani *et al.*, 1999; Webber, 1999 e Oliveira, 2001). O tamanho das populações-mapa empregadas para identificação de lócus ou QRLs/QTLs em citros é amplamente variável, registrando desde 33 indivíduos, no mapa genético para número de sementes (García *et al.*, 2000) até 110 híbridos, no mapa para resistência ao Ctv (Mestre *et al.*, 1997).

Distintos tipos de marcadores moleculares, baseados em polimorfismo de DNA ou não, têm sido usados com sucesso no mapeamento genético de citros.

O primeiro trabalho de mapeamento descrito para citros data de 1985, com a identificação de apenas dois grupos de ligação, compostos de cinco marcadores isoenzimáticos (Torres *et al.*, 1985). Com o advento de marcadores RFLP (*restriction fragment lenght polymorphism*), no início dos anos 90, a quantidade de marcadores incluídos nos mapas de citros aumentou significativamente e o número de grupos de ligação identificados se aproximou ao número cromossômico da espécie (Liou, 1990; Jarrell *et al.*, 1992; Durham *et al.*, 1992).

Quadro 1A. Relação de mapas genéticos de ligação em citros (período 1985 a 1994).

Referência	Torres <i>et al.</i> (1985)	Liou (1990)	Jarrell <i>et al.</i> (1992)	Durham <i>et al.</i> (1992)	Luro <i>et al.</i> (1994)	Cai <i>et al.</i> (1994)
População(ões) segregante(s)	<i>C. grandis</i> x <i>C.jambhiri</i> <i>C. grandis</i> x <i>P.trifoliata</i>	<i>C.reticulata</i> X <i>C.paradisi</i>	(<i>C. paradisi</i> x <i>P.trifoliata</i>) X (<i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i>)	<i>P. trifoliata</i> X Híb. 17-40 (<i>C.</i> <i>grandis</i> x <i>P.</i> <i>trifoliata</i>) Híb. LB 1-21 (<i>C.reticulata</i> x <i>C.</i> <i>Paradisi</i>) X (<i>C.paradisi</i>)	<i>C. grandis</i> X (<i>C. reshni</i> x <i>P.Trifoliata</i>)	à mesma de Durham <i>et</i> <i>al.</i> (1992)
Tamanho da população-mapa	395	65	60	130	52	60
Tipo de marcador(es) molecular(es)	isoenzima	Isoenzima e RFLP	isoenzimas e RFLP	isoenzimas e RFLP	isoenzima, RFLP e RAPD	RAPD
Quantidade de marcadores	5	42	46	69	95	109
Número de grupos de ligação (GLs)	2	8	10	11	12	9
% média de marcadores com distorção de segregação	45	26,5	19,5	33	21,75	40
% média de marcadores não ligados a GLs	86,5	4,76	17,4	20,3	12	29,3

A adoção de marcadores baseados em amplificação de polimorfismo de DNA ao acaso (*random amplified polymorphism DNA* ou RAPD) adotada, pela primeira vez, por

Luro *et al.* (1994) trouxe um novo salto relativo à quantidade de marcadores moleculares gerados e, sobretudo, abreviou e reduziu custos na construção de mapas genéticos (Luro *et al.*, 1994, 1996; Cai *et al.*, 1994; Prado 1997; Roose *et al.* 2000; Oliveira, 2001).

Posteriormente, novos marcadores baseados em amplificação do DNA foram empregados, à medida que eram descritos para outras espécies, como os marcadores microsatélite ou SSR (*simple sequence repeat*) (Kijas *et al.*, 1997), AFLP (*amplified fragment lenght polymorphism*) (De Simone *et al.*, 1998) e ISSR (*inter-simple sequence repeat*) (Fang & Roose, 1999).

Quadro 1B. Relação de mapas genéticos de ligação em citros (período 1996 a 1998)

Referência	Luro <i>et al.</i> (1996)	Kijas <i>et al.</i> (1997)	Prado (1997)	De Simone <i>et al.</i> (1998)
População(ões) segregante(s)	a mesma de Luro <i>et al.</i> (1994)	a mesma de Jarrell <i>et al.</i> (1992)	<i>C. grandis</i> x (<i>C. aurantifolia</i>)	<i>C. latipes</i> x <i>C. aurantium</i>
Tamanho da população-mapa	52	57	60	50
Tipo de marcador(es) molecular(es)	RAPD, RFLP e isoenzima	SSR	RAPD	AFLP, RAPD e RFLP
Quantidade de marcadores	95	7	125	339
Número de grupos de ligação (GLs)	12	---	12 (lima doce) e 7 (toranja)	12 (<i>C. latipes</i>) e 20 (<i>C. aurantium</i>)
% média de marcadores com distorção de segregação	22	22,2	20,71	12,05
% média de marcadores não ligados a GLs	---	50	30% (toranja)	12,3

Trabalhos de mapeamento genético de citros que identificam lócus ou QRLs/QTLs relacionados a características morfo-fisiológicas, à resistência a fatores de estresse abiótico e biótico, encontram-se listados, respectivamente, nos Quadros 2, 3 e 4.

Foram geradas importantes populações segregantes para estudos de mapeamento genético de características morfo-fisiológicas de citros (Quadro 2). Foram identificados, dentre outras características, 1 QTL para juvenilidade (Roose *et al.*, 1992); 1 QTL para pH da fruta (Fang *et al.*, 1997); 6 QTLs relacionados ao mecanismo apomítico por

embrionia nucelar (García *et al.*, 1999) e 34 QTLs putativos vinculados à característica número de sementes (García *et al.*, 2000).

Quadro 1C. Relação de mapas genéticos de ligação em citros (período 1999 a 2001).

Referência	Fang & Roose (1999)	Roose <i>et al.</i> (2000)	Sankar & Moore (2001)	Oliveira (2001)
População(ões) segregante(s)	à mesma de Jarrell <i>et al.</i> (1992)	à mesma de Jarrell <i>et al.</i> (1992)	à mesma de Durham <i>et al.</i> (1992)	<i>C. sinensis</i> x <i>C. reticulata</i>
Tamanho da população-mapa	87	57	60	94
Tipo de marcador(es) molecular(es)	ISSR	RFLP, RAPD e SSR	ISSR	RAPD
Quantidade de marcadores	223	153	75	168
Número de grupos de ligação (GLs)	---	14	9	12 para cada parental
% média de marcadores com distorção de segregação	22,9	17,1	13	32,2
% média de marcadores não ligados a GLs	---	10	11,7	4,52

No Quadro 3, abaixo, encontram-se relacionados os trabalhos referentes a mapeamento genético de citros e identificação de QTLs a fatores de estresse abiótico. Tolerância ao frio (Durham, 1990; Weber, 1999) e estresse à salinidade do solo (Tozlu *et al.*, 1999ab) predominam nesses estudos, realizados principalmente por grupos de pesquisa norte-americanos. Quanto à tolerância ao frio, números próximos de QTLs foram detectados, 6 por Webber (1999) e 7 por Durham (1990). Tolerância ao estresse por salinidade foi estudada quanto ao crescimento e produção de matéria seca, sendo identificados, ao total, 70 QTLs (Tozlu *et al.*, 1999b) e quanto ao acúmulo de Na⁺ e Cl⁻, sendo identificado outros 73 QTLs (Tozlu *et al.*, 1999b).

Quadro 2 . Relação de mapas genéticos de ligação e identificação de lócus ou QTLs relacionados a características morfo-fisiológicas de citros.

Referência	Roose <i>et al.</i> (1992)	Cheng & Roose (1995)	Fang <i>et al.</i> (1997)	García et al (1999)	García <i>et al.</i> (2000)
Característica(s)	Queda das folhas; tempo de dormência; juvenilidade e circunf. tronco	controle do ananismo de porta-enxerto	pH da fruta e conteúdo de ácido cítrico	mecanismo apomítico da embrionia nucelar	número de sementes
Herança	desconhecida	monogênica	Monogênica recessiva	desconhecida	desconhecida
População(ões) segregante(s)	a mesma de Jarrell <i>et al.</i> (1992)	Autofecundação 'Flying Dragon' (<i>P. trifoliata</i>)	cinco populações <i>C. maxima</i>	<i>C. volkameriana</i> x <i>P. trifoliata</i>	à mesma de García <i>et al.</i> (1999)
Tam. população mapa	60	41	108	50	33
Tipo de marcador molecular	isoenzima e RFLP	RAPD	RAPD	RFLP, RAPD, SSR e CAP	isoenzima, RFLP, RAPD e SSR
Aval. fenotípica	---	BSA	BSA	BSA	---
Quantidade de marcadores	46	---	360	69	---
Número de grupos de ligação	---	---	---	5 (Pt); 9 (Cv); 4 (Pt/Cv)	---
Nº marcadores ligados ao gene de interesse (se BSA)	---	3	3	---	---
Número de QTLs identificados	2 QTLs – queda das folhas; 3 - dormência; 1 - juvenilidade e 2 para circunferência do tronco	---	---	6	34
Variação fenotípica explicada pelo(s) QTL(s)	40% para leaf drop (%); 50,3% para dormência e 41,5% para circunferência do trunk	---	---	44	---

Quadro 3. Relação de mapas genéticos de ligação e identificação de lócus ou QTLs relacionados à resistência a fatores de estresse abiótico de citros.

Referência	Durhan (1990)	Tozlu <i>et al.</i> (1999a)	Tozlu <i>et al.</i> (1999b)	Webber (1999)
Característica(s)	Tolerância ao frio	estresse a salinidade (crescimento e produção de matéria seca)	estresse a salinidade (acúmulo de Na ⁺ e Cl ⁻)	tolerância ao frio
Herança	---	---	---	---
População(ões) segregante(s)	<i>C. grandis</i> x <i>P.</i> <i>trifoliata</i>	Durham <i>et al.</i> (1992)	<i>C. grandis</i> x (<i>C. grandis</i> x <i>P. trifoliata</i>)	<i>C. grandis</i> x <i>P. trifoliata</i>
Tamanho da população mapa	65	47	48	61
Tipo de marcador molecular	Isoenzima e RFLP	RFLP e RAPD	RFLP e RAPD	RAPD e SCAR
Quantidade de marcadores	56	---	---	284
Número de grupos de ligação	11	---	---	9 para cada parental
Número de QTLs	7	70 PQTLs	73 PQTLs	6

Com relação à resistência de citros a fitopatógenos, estudos de mapeamento genético de lócus de resistência monogênica ao vírus da tristeza de citros (Ctv) são predominantes (Gmitter *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1997; Mestre *et al.*, 1997; Cristofani *et al.*, 1999) (Quadro 4). Utilizando a estirpe de Ctv descrita no Brasil, Cristofani *et al.* (1999) determinaram o lócus de resistência a esse vírus no grupo de ligação I de *P. trifoliata*.

Quadro 4. Relação de mapas genéticos de ligação e identificação de lócus ou QRLs relacionados à resistência a fitopatógenos de citros.

Referência	Gmitter Jr <i>et al.</i> (1996)	Deng <i>et al.</i> (1997)	Mestre <i>et al.</i> (1997)	Cristofani <i>et al.</i> (1999)	Ling <i>et al.</i> (2000)	Siviero (2001)
Característica(s)	resistência à Ctv	resistência à Ctv	resistência à Ctv	resistência à Ctv	resistência ao nematóide <i>Tylenchulus</i> <i>semipenetrans</i>	Resistência à <i>Phytophthora</i> <i>parasitica</i>
Herança	monogênica	monogênica	monogênica	monogênica	desconhecida	---
População(ões) segregante(s)	seis diferentes progênes	<i>C. grandis</i> x híb 17-40 (<i>C. grandis</i> x <i>P. trifoliata</i>)	Polinização aberta de <i>P.</i> <i>trifoliata</i> <i>C. medica</i> x <i>P. trifoliata</i>	<i>C. sunki</i> x <i>P. trifoliata</i>	(<i>C. reticulata</i>) x (<i>C. sinensis</i>) x (<i>C. paradisi</i> x <i>P. trifoliata</i>)	a mesma de Cristofani <i>et al.</i> (1999)
Tamanho da população mapa	59	65	110	80	62	98
Tipo de marcador molecular	RAPD	RAPD e SCAR	RAPD e RFLP	RAPD	RAPD, SCAR e RGC	RAPD
Aval. fenotípica	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	---
Quantidade de marcadores	8	7	7	125	---	125
Número de grupos de ligação	---	---	---	10 (Cs) e 8 (Pt)	---	10 (Cs) e 8 (Pt)
Nº marcadores ligados ao gene de interesse (se BSA)	8	---	5	2	11	---
Número de QRLs					1	4
Variação fenotípica explicada pelo(s) QTL(s)	---	---	---	---	53,6	14 a 60

Recentemente, determinaram-se QRLs para dois fitopatógenos de citros: *Tylenchulus semipenetrans*, nematóide que provoca doenças de raiz em citros (Ling *et al.*, 2000) e a *Phytophthora parasítica*, fungo responsável pela gomose de citros (Siviero, 2001).

A resistência ao nematóide *T. semipenetrans* foi herdada do parental *P. trifoliata* como único lócus gênico dominante, responsável por 53,6% da variação fenotípica do

caráter. Contudo, supõe-se a existência de outros locos de resistência a esse fitopatógeno, haja vista a distribuição fenotípica contínua do caráter e ao fato de híbridos moderadamente suscetíveis possuírem marcadores ligados a locos de resistência (Ling *et al.*, 2000).

O primeiro trabalho de mapeamento genético de citros de resistência a fitopatógeno em que se identificou, inequivocamente, herança quantitativa foi o de resistência à gomose (Siviero, 2001). Foram identificados, ao total, quatro QRLs; três deles oriundos do parental resistente *P. trifoliata* e um QRL do parental suscetível *C. sunki*. Esses QRLs localizam-se, respectivamente, nos GLs I, II e IV do mapa de *P. trifoliata* e no GL II de *C. sunki*, descritos por Cristofani *et al.* (1999).

Foi relatado por Deng *et al.* (1997) que um marcador genético, tipo SCAR, intimamente ligado ao gene de resistência a Ctv foi mapeado a 10,8 cM do gene de resistência ao *T. semipenetrans*, podendo se tratar de uma ‘resistance-gene rich region’ (Hammond-Kosack & Jones, 1997), faixa específica do genoma de *P. trifoliata* que carrega diferentes genes de resistência a fitopatógenos (Ling *et al.*, 2000). Evidências experimentais suportam a hipótese de que o GL I de *P. trifoliata* do mapa descrito por Cristofani *et al.* (1999) possa também apresentar uma região rica em genes de resistência, face à associação estatística de determinados marcadores desse GL a QRLs de citros à gomose (Siviero, 2001).

Por fim, a estratégia de clonagem baseada em mapa já vem sendo adotada para genes de resistência a fitopatógenos de citros. O primeiro gene de resistência de citros a ser contemplado com esse tipo de abordagem fina de mapeamento foi o gene de resistência ao Ctv, a partir de *P. trifoliata*. Foram construídos mapas genéticos de ligação de alta-resolução para a região do locus Ctv, usando população de retrocruzamento constituída de 678 indivíduos. Determinou-se que o locus Ctv localiza-se dentro de uma região genômica de aproximadamente 180 kb do genoma de *P. trifoliata* e existem cópias de seqüências NBS-LRR distribuídas em torno do locus Ctv (Deng *et al.*, 2001).

Em outro estudo, mapa de ligação consensual de alta resolução do locus Ctv foi obtido a partir de 554 híbridos de 10 populações derivadas de *P. trifoliata*. Foram identificados dois marcadores RFLPs a 0,5 e 0,8 cM do locus da Ctv, respectivamente.

Pesquisas de homologia de sequência sinalizam alta similaridade entre esses dois marcadores e genes de resistência a doenças de plantas, indicando que um cluster de genes de resistência possa existir na região do locus Ctv em *P. trifoliata* (Fang *et al.*, 1998).

5.4. Genes de resistência de plantas a fitopatógenos

As plantas possuem mecanismos de defesa natural contra as doenças. A via de resistência de plantas a fitopatógenos consiste da existência de genes de defesa, que são arranjados em dois grandes grupos de genes: o primeiro, relacionado a eventos de reconhecimento e interação com moléculas elicitoras do patógeno (genes de resistência ou genes R) e o segundo, que representa a grande maioria dos casos, é associado à resistência geral de plantas a fitopatógenos aos processos de defesa-resposta (genes DR) (Faris *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001).

Genes R são genes da planta que controlam resistência raça-específica a um determinado fitopatógeno. Os produtos dos genes R reconhecem a presença do fitopatógeno contendo um gene dominante de avirulência correspondente (Avr) (Figueira, 2000), de acordo com o conceito gene-a-gene de Flor (1956).

Por sua vez, genes DR são oligo ou poligênicos, de natureza quantitativa, dispostos em clusters no genoma de plantas (Hammond-Kosack & Jones, 1997) envolvidos na biossíntese de compostos de defesa, tais como fitoalexinas, ou responsáveis pela síntese de produtos que são diretamente implicados na defesa da planta (Wastie, 1991), que não requerem aparente combinação de genes R/*avr* (Kombrink & Somssich, 1995). Conseqüentemente, uma variação quantitativa da resistência ao fitopatógeno é comumente observada (Rava & Sartorato, 1994; Figueira, 2000), variando desde o mais imperceptível nível de resistência (leve decréscimo da população do patógeno) a um intenso nível de resistência (reduzido crescimento populacional do fitopatógeno) (Vale *et al.*, 2001). Expressão de alguns genes DR se dá a partir da ação dos genes R, regulada por uma ou mais vias de transdução de sinal (Bowles, 1990). Em citros, Deng *et al.* (1997) supõem que o gene de resistência *Ctv* pode estar ligado ao locus de efeito majoritário da resistência quantitativa ao nematóide de citros (*Tylenchulus semipenetrans* Cobb).

Admite-se que a resistência de plantas, governada por genes DR, dá-se em duas etapas: (i) ‘reconhecimento’ do patógeno e (ii) transdução de sinal e ativação de genes. O ‘reconhecimento’ de um determinado fitopatógeno deve ocorrer por intermédio de

‘elicitores’, moléculas sinalizadoras de baixo peso molecular, derivadas da parede celular, tais como glucanos, heptaglucanos e pequenos ácidos e peptídeos, que se ligam a receptores, possivelmente dispostos na fração do plasmalema de células hospedeiras (Smith, 1996). Essas moléculas sinalizadoras desencadeiam a ativação gênica de diferentes reações de defesa a patógenos, incluindo a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e de fitoalexinas (Smith, 1996).

Presumi-se que genes DR, responsáveis pela resistência quantitativa, agem de modo raça-inespecífico, já que não há interação entre planta-patógeno, i.e., “resistência horizontal” e “patogenicidade horizontal”, o que dotaria as plantas de resistência parcial e durável a diferentes fitopatógenos. Evidências experimentais suportaram a hipótese de que genes DR de pequeno efeito podem sofrer interações raça/estirpe x variedade/cultivar, à semelhança do que ocorre para os genes R (Parlevliet & Zadoks, 1977).

Por sua vez, os genes R, responsáveis pela resistência qualitativa, atuam raça-especificamente, por meio da interação compatível entre planta-patógeno, i.e., “resistência vertical” e “patogenicidade vertical”, conferindo às plantas uma resistência total, não-durável, a uma ou a poucas raças fisiológicas do patógeno, geralmente do tipo hipersensibilidade (morte celular programada na área sob ataque de um patógeno específico) (Vanderplank, 1963; Vanderplanck, 1968; Rava & Sartorato, 1994; Figueira, 2000). Desse modo, têm-se, então, interações incompatíveis (hospedeiros resistentes e fitopatógenos avirulentos) e compatíveis (hospedeiros suscetíveis e fitopatógenos virulentos) (Gabriel & Rolfe, 1990).

O mecanismo de atuação dos genes R é explicado pelo modelo de interação ‘gene-a-gene’ (Flor, 1956, 1971). Genes R clonados revelaram que o modelo ‘gene-a-gene’ procede ao nível molecular (van den Ackerveken *et al.*, 1992). Contudo, ao que tudo indica, o produto protéico desses genes não atua como receptor do produto do gene *avr* do fitopatógeno (Kooman-Gersman *et al.*, 1998). Alguns genes R, por sua vez, são constitutivamente expressos (Faris *et al.*, 1999; Bowles, 1990).

Genes de defesa e co-localização com QRLs

Há exemplos de co-localização entre QRLs e genes R ou DR relatados em diferentes patossistemas (Ferreira *et al.*, 1995; Giese *et al.*, 1993; Leonards-Schippers *et al.*, 1994). Em feijoeiro, todos os QRLs detectados próximos a genes R ou a genes análogos de resistência (RGA) são raça-específicos a *Colletotrichum lindemuthianum*, enquanto outros QRLs, eficientes contra ambas raças desse fungo, foram localizados próximos do gene de defesa Hrgp36 (Geffroy *et al.*, 2000).

Em trigo, foi relatada a detecção de sete classes de genes DR, que em seu conjunto, codificam para lipoxigenase, prolina e/ou proteínas ricas em glicina, para proteínas relacionadas à patogenicidade (PR *proteins*), para regulação de canais de íons, para resposta de hipersensibilidade (HR) e para via metabólica de flavonóide (Li *et al.*, 1999). Esses genes DR encontram-se estritamente associados a QRLs de trigo a diferentes fitopatógenos, previamente identificados (Faris *et al.*, 1999). Esses resultados sugerem que alguns genes DR (dismutase, oxalato oxidase, peroxidase, quitinase, superóxido e taumatina) sejam responsáveis pelos efeitos de alguns QRLs, ou seja, constituem mecanismo de defesa raça-inespecífico, uma vez que se localizam estritamente ligados a QRL de pequeno efeito (Faris *et al.*, 1999).

Contudo, outras evidências experimentais suportam a hipótese de que genes R e DR, pelo menos em batata, não são unidades genéticas independentes, sendo detectada a sobreposição de fenótipos de resistência conferidos por ambos tipos de genes (Umaerus & Umaerus, 1994; Gees & Hohl, 1988), inclusive com a detecção de QRLs localizados no mesmo segmento cromossômico, onde se dispõe o gene R1 previamente mapeado (Leonards-Schippers *et al.*, 1994).

A presença de genes de resistência qualitativa e quantitativa em uma mesma região genômica permite interpretar que ambos os tipos de resistência possam ser controlados por QRLs representados por versões alélicas de genes de resistência qualitativa com fenótipos intermediários (Meksem *et al.*, 1995; Geffroy *et al.*, 2000). Desse modo, resistência quantitativa pode também se ajustar com relação à clássica teoria gene-a-gene (Roupe van der Voort *et al.*, 2000). Exemplo disso é o gene de resistência *Xa4* de arroz, que age como um QRL contra uma estirpe virulenta de

Xanthomonas oryzae pv *oryzae* (Li *et al.*, 1999). Esse gene R provoca uma resposta HR específica sobre o reconhecimento do produto do gene de avirulência dessa bactéria e tem seu efeito reduzido quando um determinado alelo mutante do gene de avirulência é encontrado (Li *et al.*, 1999). Outros exemplos de características quantitativas em que fenótipos mutantes são julgados como o resultado de alelos extremos de um QRL, corroboram essa hipótese (Beavis *et al.*, 1991; Robertson, 1989; Boukhatem *et al.*, 2002). Assim, resistência durável pode resultar da combinação de genes de resistência quantitativa e qualitativa (Boukhatem *et al.*, 2002).

Contudo, a hipótese mais conservadora sobre o tema sugere que QRLs contenham locos estritamente ligados, apresentando alelos favoráveis para resistência qualitativa e quantitativa em uma mesma região cromossômica (Meksem *et al.*, 1995).

Natureza poligênica de resistência quantitativa a fitopatógenos

A noção de que genes de resistência quantitativa sejam múltiplos vem se tornando inconsistente à medida que novos mapas de QRLs, de diferentes patossistemas, são descritos (Roupe van der Voort *et al.*, 2000). Embora haja alguns exemplos em que a resistência quantitativa é explicada por mais de cinco QRLs (Geiger & Heun, 1989; Bubeck *et al.*, 1993; Leonards-Schippers *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994; Qi *et al.*, 1998), é mais freqüente a detecção de apenas dois a cinco QRLs (sumarizado por Young *et al.*, 1996) relativos à resistência quantitativa a um determinado fitopatógeno. Nesses casos, resistência quantitativa é poligênica no sentido de que poucos genes têm grandes efeitos fenotípicos (Roupe van der Voort *et al.*, 2000).

Mecanismos de resistência não hospedeira

Além dos mecanismos de resistência a doenças, representados pelos grupos de genes R e DR, certos fitopatógenos podem não acarretar malefícios em determinadas plantas em decorrência da “resistência não hospedeira” (Niks, 1988), relacionada à inabilidade do fitopatógeno de (i) aderir-se à superfície hospedeira, (ii) sobreviver na ausência de determinados metabólitos no hospedeiro, (iii) sintetizar enzimas e toxinas e (iv) suprimir ou tolerar as defesas da planta (Moraes, 1998).

5.5. A geração de marcadores moleculares AFLP

A técnica de geração de polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) associa a especificidade e confiabilidade do reconhecimento do sítio de restrição da técnica do RFLP com a praticidade e o poder da técnica de amplificação exponencial de DNA por PCR. O emprego de marcadores AFLP permite um ‘screening’ de extensas regiões do genoma com acentuada especificidade e elevada taxa multiplex (Vos *et al.*, 1995).

A técnica AFLP é, atualmente, considerada a mais eficiente entre as tecnologias de marcadores disponíveis (Powel *et al.*, 1996; Pejic *et al.*, 1998; Barcaccia *et al.*, 1999). A geração de AFLPs não requer nenhum investimento *a priori* em termos de análise de sequência nucleotídica, caracterização de sondas de DNA ou síntese de *primers* específicos, requerendo apenas um conjunto genérico e limitado de *primers* e pequenas quantidades de DNA (Vos *et al.*, 1995).

A capacidade de avaliar molecularmente um grande número de locos polimórficos, a maior rapidez na obtenção de dados, a relativa simplicidade e alta relação custo-benefício da técnica tornaram amplo o emprego da técnica AFLP em estudos de genética animal (Herbergs *et al.*, 1999; Knorr *et al.*, 1999) e micológica (Julian *et al.*, 1999).

Em plantas, os estudos com AFLP incluem (i) diversidade genética e nível de polimorfismo (Lerceteau & Szmidt, 1999; Alonso-Blanco *et al.*, 1998; Mackill *et al.*, 1996; Paran *et al.*, 1998), (ii) fingerprinting de DNA (Zhu *et al.*, 1999), identificação sexual (Reamon-Büttner & Jung, 2000), (iii) filogenia molecular (Kardolus *et al.*, 1998), (iv) estudos de conservação da diversidade natural e caracterização de *pools* de melhoramento (Maughan *et al.*, 1996; Paul *et al.*, 1997; Ajmone Marsan *et al.*, 1998), identificação de cultivares (Ellis *et al.*, 1997b; Milbourne *et al.*, 1997), (v) construção de mapas genéticos (Saliba-Colombani *et al.*, 2000; De Simone *et al.*, 1998; Alonso-Blanco *et al.*, 1998; Becker *et al.*, 1995; Qi *et al.*, 1998; Van Eck *et al.*, 1995), (vi) mapeamento de genes de resistência a fatores bióticos (Kaloshian *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 1998) e a abióticos (Ellis *et al.*, 1997a; Sripongpangkul *et al.*, 2000), (vii) mapeamento de alta-resolução de regiões genômicas que conferem resistência a

fitopatógenos (Thomas *et al.*, 1995; Vuylsteke *et al.*, 1999; Bert *et al.*, 1999) e (viii) clonagem baseada em mapa de genes de resistência a patógenos (Meksem *et al.*, 1995; Brigneti *et al.*, 1997; Simons *et al.*, 1997).

Principais aspectos da técnica

A técnica envolve as seguintes etapas: (i) digestão de DNA genômico total com duas enzimas de restrição: uma endonuclease de corte raro (restringe sítios de seis pares de bases; geralmente a *EcoRI*) e outra de corte freqüente (corta seqüências de quatro pares de bases, usualmente a *MseI*), gerando fragmentos de diferentes tamanhos; (ii) ligação de adaptadores, pequenos oligonucleotídeos de DNA de seqüência conhecida, às seqüências do sítio de restrição, por meio da ação de ligases; (iii) execução da primeira PCR ('pré-amplificação'), com a extensão de *primers* complementares à parte do adaptador e parte do sítio de restrição contendo um nucleotídeo a mais, adicionados ao volume de reação, o que resulta na amplificação seletiva de somente 25% do conjunto de fragmentos gerados pela restrição enzimática; (iv) execução da segunda PCR ('amplificação'), empregando pequena amostra da primeira amplificação, sobre a qual são adicionados *primers* constituídos dos mesmos nucleotídeos do *primer* da primeira PCR contendo, adicionalmente, mais uma ou duas bases que resultam na amplificação específica de determinados segmentos de DNA ao acaso no genoma; (v) preparo e carregamento do gel e (vi) análise da imagem do gel.

A *MseI* (sítios de restrição TTAA) é a enzima de corte freqüente preferencialmente adotada na geração de AFLPs na maioria das espécies eucarióticas, por duas razões: primeiro, genomas eucarióticos são ricos em AT e, segundo, o seu emprego resulta em grande quantidade de fragmentos de tamanho médio ideal para amplificação via PCR e separação em géis de poliacrilamida (Vos *et al.*, 1995).

Os oligos adaptadores são constituídos de uma seqüência central (*core*), localizada a partir da extremidade 5' e de uma seqüência endonuclease-específica (extremidade coesiva), localizada a partir da extremidade 3'. Os *primers* AFLP, por sua vez, são constituídos dessas mesmas duas regiões, além de possuírem uma extensão seletiva na posição 3' que possui 1 ou 3 nucleotídeos, quando são empregados na fase de

‘pré-amplificação’ ou de ‘amplificação’, respectivamente. Todos os *primers* têm G5’ para prevenir a formação de bandas duplas (Vos *et al.*, 1995).

Primers com um nucleotídeo na primeira pré-amplificação visa a impedir a amplificação de todos os fragmentos de restrição gerados, o que tornaria impraticável a resolução em géis dessa gama de amplicons AFLPs. Por sua vez, a adoção de *primers* com dois ou três nucleotídeos complementares na fase de amplificação está na dependência do grau de polimorfismo da espécie ou da população. O acréscimo de cada nucleotídeo seletivo ao *primer* para a fase de amplificação de AFLPs reduz em 4 vezes o número de loci acessados (Vos *et al.*, 1995). Assim, por exemplo, a adição de dois *nucleotídeos* em cada um dos *primers*, acarreta uma redução de 256 vezes o número de fragmentos pré-selecionados a serem amplificados.

Capacidade multiplex da técnica AFLP

A grande capacidade multiplex da técnica AFLP resulta da capacidade de utilização de diferentes combinações de enzimas de restrição e de nucleotídeos extras na extremidade 3' dos adaptadores.

Comparação realizada entre os níveis de polimorfismo gerados por AFLP, RAPD e RFLP em diferentes espécies vegetais atestou que a técnica AFLP é a mais eficaz e rápida, por permitir a análise simultânea de um grande número de bandas por gel (Saliba-Colombani, 2000). Contudo, a capacidade da técnica em identificar alelos de um dado locus é restrita (Vos *et al.*, 1995).

Visualização de marcadores AFLPs

Amplicons AFLPs são distinguidos por marcação radioativa (radioisótopos ^{32}P e, principalmente, ^{33}P) (Ballvora *et al.*, 1995) ou fluorescente (*dyes* fluorófilos) (Paran *et al.*, 1998; Hartl *et al.*, 1998) do *primer* homólogo ao adaptador do sítio de restrição da endonuclease de corte raro (*EcoRI*). Detecção quimioluminescente, como marcação de sonda AFLP com Cy5 (Roman *et al.*, 1999), brometo de etídeo (Suazo and Hall, 1999) e por coloração com nitrato de prata (Chalhoub *et al.*, 1997); vem sendo também empregada para a visualização dos fragmentos. As principais vantagens e desvantagens das metodologias de detecção de amplicons são apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1. Características dos métodos de visualização de fragmentos AFLP.

Técnica	Aspectos positivos	Aspectos negativos
Radio-atividade	maior número de bandas	requer uso de isótopo radioativo (^{32}P ou ^{33}P)
Fluorescente	não requer radioisótopos; leitura e notação automatizadas dos fragmentos e maior precisão	requer pesado investimento inicial (aquisição de seqüenciadores automáticos) e elevado custo de <i>primers</i> fluorescentes
Químio-luminescente	não requer radioatividade ou seqüenciador	requer transferência e hibridização de DNA, menor precisão
Nitrato de Prata	não requer radioatividade, seqüenciador ou transferência/hibridização de DNA. Fácil clonagem de marcadores AFLP	geração de padrões AFLPs dupla-banda, baixa sensibilidade para pequenos fragmentos
Brometo de Etídeo	não requer substâncias, procedimentos ou máquinas típicas das outras técnicas	resolução inferior a obtida pelas outras técnicas

Como consequência da marcação radioativa ou fluorescente de *primers* homólogos ao adaptador da *EcoRI*, fragmentos de restrição *MseI/MseI* ($\cong 90\%$ do total de fragmentos de restrição) não são visualizados (Vos *et al.*, 1995). A detecção de *amplicons* AFLPs por brometo de etídeo restringe-se, na prática somente a confirmação ou não do funcionamento da PCR. A técnica de visualização fluorescente de AFLPs (fAFLP) apresenta clara separação de *amplicons*, uma vez que a distância de migração de cada fragmento não é limitada pelo tamanho do gel (Huang & Sun, 1999).

O tamanho dos fragmentos AFLPs detectado é diversificado, podendo ser médio (fragmento *MseI-EcoRI*) ou grande (fragmento *EcoRI-EcoRI*), sendo os fragmentos *MseI-EcoRI* duas vezes mais freqüentes (Vos *et al.*, 1995).

Detecção de AFLPs por fluorescência

Métodos baseados em fAFLP, semi-automatizados, foram desenvolvidos, empregando-se, por exemplo, o seqüenciador ALFexpress e ABI PrismTM. A síntese de *dyes* fluorófilos, dotados de emissões de comprimento de onda distinguíveis entre si, permite fracionar diferentes amostras de reações AFLPs em uma mesma pista de gel,

simultaneamente (Schwarz *et al.*, 2000). O sistema de detecção multifluorófilo do ABI Prism™ DNA sequencer, por exemplo, permite a análise simultânea de amostras de três reações AFLPs, marcadas com diferentes *dyes* fluorófilos. Instrumentos de detecção de fluorescência, como seqüenciadores automáticos, permitem, ainda, a introdução de padrões internos na reação, que resulta em acurada definição do tamanho dos fragmentos amplificados (Arnold *et al.*, 1999).

A técnica fAFLP vem sendo empregada em estudos de diversidade genética (Hartl & Seefelder, 1998) e mapeamento genético (Remington *et al.*, 1999) de plantas. A principal desvantagem do uso de marcadores fAFLP é a dificuldade operacional de se clonar esses fragmentos e convertê-los em marcadores STS ou SCAR, em virtude do emprego de seqüenciadores automáticos de DNA, quando comparados, por exemplo, com marcadores AFLPs visualizados por nitrato de prata (Cho *et al.*, 1996) ou por autoradiografia (Meksem *et al.*, 1995).

Geração de marcadores AFLPs e comparação com as técnicas RAPD e RFLP

A geração de marcadores RAPDs requer baixas temperaturas na fase de anelamento da PCR com vistas a permitir que os *primers* anelem a múltiplos loci no DNA, o que gera uma competição por amplificação durante a PCR, redundando na típica baixa reprodutibilidade do RAPD (Halldén *et al.*, 1996).

A técnica AFLP, por sua vez, diferentemente da técnica RAPD, apresenta, *primers* mais longos, resultando maior temperatura estrigente de anelamento, o que torna a hibridação mais específica e estável, resultando padrões de bandejamento de alta reprodutibilidade (Vos *et al.*, 1995; Suazo & Hall, 1999).

Além disso, os *primers* de AFLPs são concebidos para se anelarem especificamente aos adaptadores que, por sua vez, apresentam especificidade ao sítio de restrição, o que, no conjunto, conferem elevadas confiabilidade e reprodutibilidade à técnica AFLP (Vos *et al.*, 1995). A geração de marcadores AFLPs, para sete combinações de pares de *primers*, foi investigada pela análise repetida de todas as etapas, desde o isolamento de DNA ao *scoring* dos dados, atestando-se uma reprodutibilidade geral de 97,6% para um total de 5088 fragmentos gerados (Hansen *et*

al., 1999). Elevado grau de reprodutibilidade da geração de marcadores AFLPs entre diferentes laboratórios também foi confirmada (Jones *et al.*, 1997).

A técnica AFLP identifica alto número de loci polimórficos por experimento. Em média, são gerados dez vezes mais marcadores informativos se comparado com número gerado via RAPD (Cervera *et al.*, 1996) é mais eficiente, ainda, quando comparada com a técnica RFLP (Meksem *et al.*, 1995).

Natureza dominante dos marcadores AFLPs

Os *amplicons* de AFLPs são marcadores tipicamente dominantes, à semelhança dos de RAPD, apresentando baixo conteúdo de informação genética por locus, em relação a marcadores codominantes. Loci AFLPs heterozigóticos não podem ser distinguidos daqueles homozigóticos dominantes em indivíduos diplóides (Ferreira & Gratapaglia, 1996), embora haja equipamentos ópticos e softwares de análise de imagem digitalizada, que permite a distinção visual entre alelos homo ou heterozigóticos quanto à intensidade de amplificação do AFLP (Quarrie *et al.*, 1997; Castiglioni *et al.*, 1999; Vuylsteke *et al.*, 1999).

Aspectos negativos da técnica AFLP

A geração de marcadores AFLP requer DNA de alta qualidade, preferencialmente extraído por protocolo que não inclua SDS (agente degradador de enzimas de restrição), embora o padrão de bandas AFLP obtido seja insensível a variações na concentração inicial de DNA *template*. A restrição incompleta do DNA resulta em problemas no *fingerprinting* de AFLP, pois somente os poucos fragmentos de restrição gerados serão amplificados pela PCR (Vos *et al.*, 1995).

5.6. Detecção e quantificação de bactérias fitopatogênicas por meio de PCR quantitativo em tempo real

O histórico do diagnóstico de agentes causais de bacterioses tem início com técnicas (i) fisiológicas, por meio da constatação da síntese e/ou oxidação de determinadas substâncias; (ii) microbiológicas, via isolamento da bactéria e (iii) fitopatológicas, através de testes de patogenicidade. Essas técnicas, em conjunto, são reconhecidamente enfadonhas e de limitada resolução taxonômica ao nível de gênero. Posteriormente, técnicas imunodiagnósticas (Schaad, 1979) e de *dot-blot* de DNA (Irwin, 1987) abriram a possibilidade de diagnóstico molecular de bactérias fitopatogênicas. Contudo, essas metodologias apresentam problemas relativos ao grau de especificidade do anti-soro (Trigalet *et al.*, 1978) e ao elevado custo com sondas de DNA. Com o advento da técnica da PCR (Saiki *et al.*, 1985), surge um marco divisório no diagnóstico molecular de fitobactérias. Isso se deve à elevada confiabilidade, especificidade, sensibilidade e simplicidade da técnica, quando comparada com os métodos de diagnóstico que lhe antecederam (Henson & French, 1993).

As primeiras bactérias fitopatogênicas diagnosticadas por PCR foram patovares de *Pseudomonas syringae*, responsáveis pelo crestamento bacteriano em ervilha (Rasmussen & Wulff, 1990) e ferrugem do halo de sementes de feijão (Prosen *et al.*, 1991). A PCR é empregada no diagnóstico de bactérias em muitas doenças de plantas (Schaad *et al.*, 2001), incluindo espécies de reduzida concentração populacional em materiais propagativos assintomáticos, tais como *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, responsável pela podridão mole, em tubérculos de batata (van der Wolf *et al.*, 1996) e *Xf/CVC*, em borbulhas contaminadas de citros (Coletta Filho *et al.*, 2000).

Contudo, a técnica da PCR, que se resume à amplificação exponencial *in vitro* de determinada sequência-alvo de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1996) é estritamente qualitativa (ausência ou presença), sendo incapaz de precisar a quantidade da sequência-alvo na amostra (Higuchi *et al.*, 1993).

Em função disso, variantes da técnica que exploram a geração de *amplicons* foram desenvolvidas. Uma delas, denominada PCR “semi-quantitativo”, caracteriza-se pela mensuração do *amplicon* gerado durante cada ciclo da PCR (Orlando *et al.*, 1998).

Há técnicas mais elaboradas, como o PCR “competitivo”, em que se quantifica a sequência-alvo por meio da amplificação simultânea de um DNA competidor. Esse oligo é adicionado à reação em quantidades conhecidas e a mensuração da sequência-alvo é determinada a partir da taxa de polimerização desses dois *amplicons* (Raeymaekers, 1993). Exemplos do emprego dessa técnica são os diagnósticos da *Xcc*, responsável pelo cancro cítrico (Cubero *et al.*, 2001) e da *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, causadora da podridão do tubérculo em batata (Hyman *et al.*, 2000).

No entanto, essas primeiras abordagens de quantificação de produtos da PCR apresentaram imprecisões na mensuração da sequência-alvo, advindas da (i) quantificação de *amplicons* na fase final da PCR e (ii) da necessidade da remoção de alíquota do volume da PCR para carregamento em gel de eletroforese (Zimmerman & Mannhalter, 1996).

Esses inconvenientes foram superados com a descrição de técnicas de PCR quantitativo em tempo-real (RTQ-PCR) (Heid *et al.*, 1996; Tyagi & Kramer, 1996). Esses autores consolidaram os trabalhos pioneiros de Higuchi *et al.* (1992, 1993) que estimaram a quantidade de sequências-alvo presente na reação via monitoramento da emissão de fluorescência combinada à geração de *amplicons* durante os ciclos da fase exponencial da PCR. As técnicas de RTQ-PCR não requerem, portanto, procedimentos eletroforéticos pós-PCR, que resultam em erros de leitura e contaminação de amostras. As estratégias RTQ-PCR baseadas na síntese de sondas fluorogênicas do tipo TaqMan® (Heid *et al.*, 1996) e de *molecular beacons* (Tyagi & Kramer, 1996) já foram citadas, cada qual, por mais de 1200 e 400 publicações científicas, respectivamente (<http://www.webofscience.com>). Essas metodologias vêm sendo empregadas na quantificação bacteriológica de alimentos (Nogva & Lillehaug, 1999; Hein *et al.*, 2001), ambiental (Becker *et al.*, 2000; Grüntzig *et al.*, 2001), humana (Oberst *et al.*, 1998; Lyons *et al.*, 2000) e veterinária (Creelan & McCullough, 2000; Pusterla *et al.*, 2000).

Resumidamente, uma RTQ-PCR é uma PCR convencional sobre a qual é estabelecida alguma estratégia para que o *amplicon* gerado seja quantificado por fluorescência. O grande diferencial da RTQ-PCR é a incorporação à PCR de uma sonda oligonucleotídica contendo duas substâncias fluorófilas (*dyes* doador e *quencher*), uma em cada extremidade da sonda. Essas substâncias fluorófilas exploraram o efeito

“quencher”, regida pelo princípio FRET, i.e., uma vez a sonda intacta seja luminosamente excitada, ocorre transferência de energia do fluorófilo de alta energia (*dye* doador) para o de baixa energia (*dye quencher*), seguida de emissão de luz fluorescente, o que acontece no sistema TaqMan ou de calor (*collisional quenching*), como ocorre em *molecular beacon* (Didenko, 2001).

Principais estratégias químicas de RTQ-QPCR

1) Sondas TaqMan®

Sonda TaqMan® é, atualmente, a técnica RTQ-PCR mais empregada (Heid *et al.*, 1996). A sonda é um oligo de DNA com 25-30 nt, não-extensível, devido à presença do grupo fosfato 3' e marcada fluorescentemente com dois *dyes* fluorófilos. São eles, o FAM e o TET, na posição 5', como *dye* doador, com Abs_{máx.} a 518 e 538 nm, respectivamente, e o TAMRA, na posição 3', como *dye* quencher.

Na ausência da sequência-alvo de DNA na RTQ-PCR, a sonda TaqMan® permanece intacta no volume de reação. Uma vez excitado luminosamente, o *dye* doador emite energia fluorescente que é transferida para a *dye* quencher, em virtude da proximidade entre os *dyes*. Ocorre, assim, o efeito quencher, resultando na emissão de fluorescência de comprimento de onda correspondente ao *dye* quencher (Didenko, 2001).

Na presença da sequência-alvo de DNA, a sonda TaqMan® hibridiza especificamente, durante a fase de pareamento, em uma região interna da sequência-alvo de DNA, geralmente com 75-150 nt, entre os sítios de pareamento dos *primers forward* e *reverse* (Heid *et al.*, 1996). A hibridização da sonda ocorre antes do pareamento dos *primers*, já que apresenta temperatura de melting 10°C maior que a desses oligos (Heid *et al.*, 1996).

A anulação do efeito quencher entre os *dyes* fluorófilos é obtida por meio da hidrólise da sonda hibridizada à sequência-alvo, através da atividade exonucleolítica 5' → 3' da Taq DNA polimerase, que remove esse obstáculo físico à replicação, permitindo a extensão do *primer upstream* até o final da sequência-alvo de DNA (Heid *et al.*, 1996). Excitação luminosa do *dye* doador, agora fisicamente separado do *dye* quencher e livre em suspensão, resulta na emissão de energia fluorescente pelo *dye*

doador. Já as moléculas de *dye* quencher, diminuem a intensidade de fluorescência emitida.

Durante os ciclos da RTQ-PCR, ocorre crescimento exponencial da geração de *amplicons* e de hidrólise de sondas, o que é monitorado, em tempo-real, pelo aumento da quantidade de fluorescência emitida pelo *dye* doador (Heid *et al.*, 1996).

2) Sondas *molecular beacon*

Molecular beacon é uma sonda fluorogênica em forma de grampo de cabelo constituída de duas regiões: (i) região do *loop* da sonda; sequência ss-DNA interna da sonda, onde se encontra a sequência nucleotídica complementar à sequência-alvo de DNA e a (ii) região auto-complementar da sonda; sequência ds-DNA externa da sonda, que se segue à região do *loop*, constituída geralmente de 5-6 nt, rica em conteúdo GC e palindrômica, o que favorece o auto-pareamento (Tyagi & Kramer, 1996). Nas extremidades 5' e 3' da sonda são adicionados os *dyes* doador (FAM) e o quencher (DABCYL), respectivamente.

Na ausência de sequência-alvo, a *molecular beacon* permanece intacta na reação. Quando submetida à irradiação luminosa ocorre o efeito quencher entre os *dyes*, acarretando a não emissão de fluorescência do *dye* doador e conseqüente emissão de calor pelo *dye* quencher (Tyagi & Kramer, 1996).

Havendo a presença de sequência-alvo, ocorre a hibridização da sequência nucleotídica da região do *loop* da *molecular beacon* em uma região interna de sua sequência-alvo, antes do pareamento dos *primers*.

A anulação do efeito quencher entre os *dyes* fluorófilos não resulta da hidrólise da *molecular beacon*, como ocorre no sistema TaqMan®, mas da abertura da região auto-complementar da sonda, em decorrência da complementação da sequência interna do *loop* à sua sequência-alvo de DNA. Desse modo, ocorre o afastamento físico entre os *dyes* doador e quencher. Quando o volume de reação é irradiado, ocorre a emissão de fluorescência de comprimento de onda correspondente ao *dye* doador (Tyagi & Kramer, 1996).

Diferentemente do sistema RTQ-PCR TaqMan®, onde o monitoramento da emissão de fluorescência ocorre durante a fase de extensão, RTQ-PCR *molecular beacon* se dá durante a fase de pareamento de cada ciclo. Ao término de cada fase de

pareamento, as sondas moleculares beacon retornam intactas à sua forma nativa, pareando-se à sequência-alvo de DNA a cada novo ciclo da RTQ-PCR (Tyagi & Kramer, 1996).

Variações dos sistemas RTQ-PCR baseados em *molecular beacon* e TaqMan® vêm sendo descritas. Aumento do grau de sensibilidade e confiabilidade e diminuição de problemas relativos ao *background* de fluorescência vêm sendo alcançados em novas estratégias que reúnem características de ambos os sistemas, como é o caso de *molecular beacon* hidrolisável (Kong *et al.*, 2002), ou que incorporam a sonda a um dos *primers* da reação, tal como com os *primers* Scorpions[™] (Whitcombe *et al.*, 1999), o que reduz a duração de ciclagem da RTQ-PCR.

Construção de oligos para RTQ-PCR

À semelhança do diagnóstico de bactérias por PCR, o ensaio RTQ-PCR requer que parte da sequência nucleotídica específica da bactéria seja conhecida para a construção dos *primers* e da sonda fluorogênica. Essas sequências podem ser inicialmente obtidas a partir da (i) detecção de polimorfismo de DNA entre estirpes de bactérias, como descrito para a estirpe de *Xf/CVC* (Pooler & Hartung, 1995a; Ferreira *et al.*, 2000); (ii) emprego de sequência plasmidial patógeno-específica, como é o caso da *Erwinia amylovora* (Bereswill *et al.* 1992); (iii) hibridização subtrativa, técnica que enriquece de sequências específicas de DNA, como em *Pseudomonas solanacearum* (Seal *et al.*, 1992) e (iv) por sequenciamento de ITS (*internal transcribed spacer*), regiões genômicas curtas entre os genes rDNA 16S e 23S, cuja sequência geralmente é específica de um patovar, como é o caso de *Xanthomonas spp.* em cereais (Toth *et al.*, 2001).

Após obtenção de sequência nucleotídica de DNA específica de uma determinada bactéria, é necessário validar a sua especificidade ao genoma do microorganismo em que ela foi detectada, atestando-se ausência de homologia com sequências de patovares da mesma espécie ou de outras espécies, depositadas em banco de dados, como o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e o EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>), antes de dar início à construção de oligos para ensaios com RTQ-PCR.

Existem diferentes *softwares* que auxiliam na construção de oligos para RTQ-PCR (Bustin, 2002). O 'Primer Express' (Applied Biosystems) é, possivelmente, o mais empregado. A relação básica de softwares inclui o JaMBW e o Primer3 para a construção de *primers* e de sondas, respectivamente. Oligos fluorogênicos que requeiram conformação espacial, como é o caso de *molecular beacon* e *primers* ScorpionTm, podem ser construídos via *software* DNA mfold (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna>). Os principais fatores para os quais se devem atentar durante a construção de sondas incluem o número total de nucleotídeos, percentagem ou conteúdo G/C, composição ideal de nucleotídeos nas extremidades 5' e 3' e faixa de temperatura de *melting* para a hibridização (Bustin, 2002).

Cinética da RTQ-PCR e o cycle threshold (C_T)

Como ocorre na cinética da PCR, o perfil da RTQ-PCR apresenta três fases distintas: (i) *background* ou inicial, (ii) *log* ou crescimento exponencial e (iii) platô ou final. A interface entre as duas primeiras fases, denominada *cycle threshold* (C_T) (Higuchi *et al.*, 1993), ocorre em um determinado ciclo da RTQ-PCR, em que a intensidade de fluorescência emitida pelo *dye* doador, decorrente da geração de *amplicons*, é calculada como sendo, geralmente, 10 vezes o desvio-padrão acima do *background* médio de fluorescência emitida pelo *dye* doador durante o 3º ao 15º ciclo da RTQ-PCR (Walker, 2002).

O valor C_T de uma RTQ-PCR determina o exato momento em que a geração de *amplicons* passa a ser polimerizada exponencialmente e é inversamente proporcional à quantidade de sequência-alvo presente no início da reação. Portanto, considerando-se um ensaio RTQ-PCR constituído das amostras A e B, tendo a primeira a metade da concentração de sequência-alvo de DNA que a segunda, o C_T-amostra A será maior que o C_T-amostra B em uma unidade. Contudo, se as duas amostras possuem a mesma concentração de sequência-alvo, ambas devem aumentar significativamente a intensidade do sinal de fluorescência ao mesmo tempo, em relação ao *background* de fluorescência da fase inicial da RTQ-PCR, ou seja, devem apresentar valores C_{Ts} idênticos ou muito próximos entre si.

Método de quantificação de seqüências-alvo de DNA via RTQ-PCR

A concentração inicial da seqüência-alvo de DNA pode ser inferida por meio de quantificação absoluta. Nesse procedimento, o número de moléculas de seqüência-alvo na amostra é estimado interpolando-se o valor C_T obtido com a equação da regressão linear resultante da curva-padrão de valores médios de C_T , obtida pela relação inversa de dependência entre as concentrações crescentes de um padrão de referência da seqüência-alvo (eixo x) e o sinal de fluorescência da geração de *amplicons* (eixo y) (Ginzinger, 2002). A curva-padrão é construída por intermédio de diluições seriais, geralmente decimais. Contém, usualmente, 10^4 ou 10^5 cópias da seqüência-alvo de DNA entre as duas concentrações extremas, sendo que cada concentração é representada em duplicata ou triplicata (www.biosci.ohio-state.edu/~pmgf).

Padrões de referência com seqüência-alvo de DNA são geralmente obtidos de (i) *amplicons* gerados via PCR, (ii) plasmídeos contendo a inserção da seqüência-alvo ou (iii) da própria célula ou microrganismo, desde que se saiba o número de cópias da seqüência-alvo em seu genoma (Ginzinger, 2002). A concentração da solução inicial pode ser determinada por fluorômetro ou espectrofotômetro (Abs-260nm). Durante a sua montagem, a dispensa de volumes de padrões de referência contendo DNA na placa de reação requer técnica e instrumentação especiais para se evitar eventos de contaminação entre as reações (Ginzinger, 2002).

Ginzinger (2002) sugere denominar quantificação absoluta por ‘arbitrária’ ou de ‘curva-padrão’, já que não há como precisar com exatidão, independentemente do método de determinação de concentração de DNA empregado, o número de cópias da seqüência-alvo presente no padrão de referência. Tem-se, quando muito, uma estimativa muito razoável do número de cópias de DNA presentes. Uma vez que a concentração do número de cópias da seqüência-alvo empregada na construção da curva-padrão não é determinada a rigor, a quantidade do número de cópias da seqüência-alvo na amostra não é absoluta (Ginzinger, 2002).

Deteccão e quantificação de bactérias fitopatogênicas via RTQ-PCR

Desde a mensuração do primeiro fitopatógeno via RTQ-PCR em 1996 (Schoen *et al.*, 1996), há crescente interesse fitopatológico pela técnica, considerando o aumento do

número de publicações de ensaios RTQ-PCR de agentes causais de doenças causadas por bactérias, vírus, fungos e nematóides (Schaad *et al.*, 2002). Até o momento, seis sistemas RTQ-PCR foram descritos para fitobactérias saprófitas e/ou patogênicas: *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* (“podridão do anel” em batata), (Schaad *et al.*, 1999; van Beckhoven *et al.*, 2002); *Erwinia herbicola* (Belgrader *et al.*, 1999); *Ralstonia solanacearum* biovar 2A (“podridão marrom” da batata) (Weller *et al.*, 2000); *Agrobacterium radiobacter* biovar 1 (“tapete de raiz” em pepino e tomate) (Weller & Stead, 2002) e *Xf*/DPV (Schaad *et al.*, 2002).

6. CAPÍTULOS

Capítulo 1

Identification of sexual and nucellar *Citrus* seedlings through single and duplex PCR of simple sequence repeat locus.

Autoria: OLIVEIRA, A. C.; GARCIA, A. N.; NOVELLI, V. M.; CRISTOFANI, M. & MACHADO, M. A.

Periódico: *Proc. Intl. Society Citriculture* (USA) vol. I, pp. 138-141 (2000).

Identification of Sexual and Nucellar Citrus Seedlings through Single and Duplex PCR of Simple Sequence Repeat Loci

Antonio Carlos de Oliveira

Depto de Genética e Evolução, UNICAMP, C.P. 6109 C.E.P. 13081-970 Campinas, Brazil

Valdenice Moreira Novelli

Depto Ciências Biológicas, UEFS, C.P. 252; C.E.P. 44031-460 Feira de Santana, Brazil

Aristides Novac Garcia, Mariângela Cristofani, and Marcos Antônio Machado

Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, C.P. 04 C.E.P. 13490-000 Cordeirópolis, Brazil

Additional index words. apomixis, DNA, genotyping, microsatellite, 'Murcott' tangor, 'Pera' sweet orange, screening

Abstract. The expansion of genetic variability in citrus through controlled crosses is difficult due to apomixis and polyembryony, which require differentiation of zygotic seedlings from nucellar ones. In this study, we have used the genotyping of single sequence repeat (SSR) markers in the zygotic and nucellar seedling identification derived from the cross between 'Murcott' tangor [*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osb.] and 'Pera' sweet orange [*C. sinensis* (L.) Osb.]. Of fourteen primers developed from 'Pera' and analyzed, four (CCSM-4, -6, -12, and -19) amplified polymorphic SSR alleles among the parents; these were used to differentiate zygotic and nucellar seedlings through individual (single locus) and duplex (two loci) PCR reactions. Simultaneous amplifications of two SSR loci were obtained only from the combining of CCSM-4/-6 primers, resulting in the identification of 68 hybrids. The generation of SSR markers presents a highly reproducible technique that is more cost-effective in the screening of zygotic seedlings with duplex PCR.

The expansion of the genetic variability in citrus through controlled crosses is difficult due to apomixis and polyembryony (Davies and Albrigo, 1994). Such characteristics are found commonly in the majority of citrus cultivars (Frost and Soost, 1968); this leads to the necessity of zygotic and nucellar seedling differentiation, with the purpose of establishing segregating populations.

The differentiation of hybrid plants in citrus has been carried out by morphological traits (Davies and Albrigo, 1994), oil gland distribution (Pieringer and Edwards, 1967), and isoenzymatic profiles (Anderson et al., 1991; Soost et al., 1980). Nevertheless, these types of markers are not all reliable, resulting in the discarding of hybrids and their consequent non-incorporation into the segregating populations, which is undesirable in hybrids where fruit set and hybridization are low (Davies and Albrigo, 1994).

The advent of techniques for analysis of DNA polymorphism based on PCR has allowed wide use of the molecular markers. One category of molecular marker is the microsatellite [Single Sequence Repeats (SSR)] (Litt and Luty, 1989), which consists of di- to tetra-nucleotide length sequences, sequentially repeated and flanked by single sequences (Tautz and Renz, 1984). SSRs are valuable as genetic markers for being codominant and easily assessed by PCR (Kijas et al., 1995). This molecular marker technique has been recently used in the screening of citrus hybrids (Ruiz et al., 2000).

The objective of this study was to describe the use of SSR markers both in single locus and duplex PCR in the identification of zygotic and nucellar seedlings from the crosses between 'Murcott' tangor and 'Pera' sweet orange.

Materials and Methods

Controlled pollination and seed germination. The controlled pollination took place in July 1997 between 'Murcott' tangor [*C. sinensis* (L.) Osb. x *C. reticulata* Blanco] and 'Pera' sweet orange (pollen source) [*C. sinensis* (L.) Osb.], using trees in the Mother Plant Bank of the Centro de Citricultura Sylvio Moreira-Inst. Agron. de Campinas, Cordeirópolis, SP, Brazil. The fruits were harvested 330 d after pollination, the seeds extracted, and germinated in seedbeds.

DNA isolation. Total DNA was extracted based on modifications in the extraction CTAB-Sarcosyl (Murray and Thompson, 1980) methodology, as described by Machado et al. (1996).

PCR analyses and electrophoresis. PCR were carried out in a 25- μ L volume with 100 mM Tris-HCl pH 8.3; 500 mM KCl; 25 mM MgCl₂; 0.01% gelatin; 200 mM dNTPs; 8 pmol of primers; 50 ng of DNA and 1.5 U *Taq* DNA polymerase. Reactions were subjected to 32 cycles of 1 min at 94 °C; 30 s at 55 °C, and 1 min at 72 °C, preceded by initial denaturation of 5 min at 94 °C and succeeded by one final extension of

Table 1. Dinucleotidic composition, listing of primers and number/size of SSR loci alleles.

Locus	Repetitive Unit	Primer	Nº of alleles	Variation of size of alleles (bp)
CCSM-6	(GA) ₂₁	ATCTGTGTGAGGACTGAA CCTCTATTAATGTGCCTG	4	207-255
CCSM-19	(GA) ₂₄	GGACACTGTGACCGCTAA AGCTACCAAGACACACC	2	251-268
CCSM-4	(CT) ₁₇	TTCTCCTCATCTTCGACTCC CCGATCTTACGACGTATCAA	2	86-113
CCSM-12	(CT) ₂₂	GATTGAATCTTCTGTAGCTC ATCATCATCTAGTGTCACTG	3	286-312

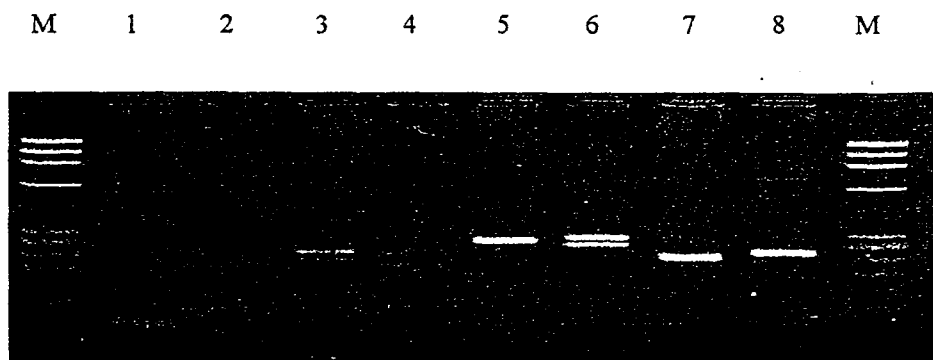


Fig. 1. Alleles of loci CCSM-4 (samples 1: 86 bp and 2: 113 bp); CCSM-6 (samples 3: 255 bp/233 bp and 4: 250 bp/207 bp); CCSM-12 (samples 5: 299 bp and 6: 312 bp/286 bp), and CCSM-19 (samples 7: 225 bp and 8: 268 bp) obtained by PCR. Odd samples ('Murcott' tangor DNA) and even samples ('Pera' orange DNA). M = 0X174, digested with HaeIII.

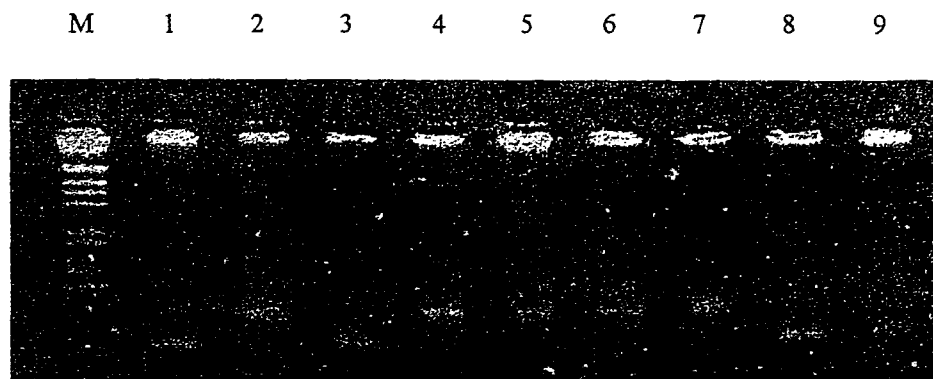


Fig. 2. Alleles of loci CCSM-4 obtained by PCR in 'Murcott' tangor (sample 1), 'Pera' orange (sample 2), and nucellar (samples 3, 8, and 9) and hybrid (samples 4, 5, 6, and 7) seedlings acquired from this cross. M = DNA ladder 1 Kb.

4 min at 72 °C, as described by Kijas et al. (1995).

Initially, tests of amplification of SSR polymorphic loci between the 'Murcott' and 'Pera' genomes were carried out through the use of 14 SSR primers designed from 'Pera' orange DNA (Cristofani et al., 1998). Those primers that amplified SSR polymorphic loci were later tested in duplex PCR. Eight microliter of amplification products were loaded in agarose gels 3.5% (wt/vol) with ethidium bromide (0.5 ng/mL). The electrophoresis time was 90 min at 100 V.

Analysis of DNA polymorphism. The average number of nucleotides in amplicons was estimated by using the GEL software (Schaffer and Sederoff, 1989). The analysis for zygotic and nucellar seedling identification was carried out by a comparison from the patterns of the SSR markers obtained from those seedlings with the ones produced by parents.

Results and Discussion

Test of primers. Of all 14 SSR primers analyzed only the CCSM-4, -6, -12, and -19 primers amplified polymorphic SSR loci between 'Murcott' tangor and 'Pera' sweet orange (Table 1). Primers designed from 'Pera' orange DNA have also amplified SSR loci in 'Murcott' tangor, which may be attributed to the conservation of complementary sequences to these primers in the DNA of this cultivar as found among *Citrus*, *Poncirus*, and *Severinia* (Kijas et al., 1995) and/or by exhibiting chromosomal constitution common to the one found in the sweet orange, taking into account it is a hybrid of mandarin and orange (Hodgson, 1968).

Establishment of SSR allele size. The amplicons' size in bp were

determined by the allelic profiles of different loci exhibited in three gels (Fig. 1). For the loci CCSM-6, both parents are heteroallelic, while the loci CCSM-4 and CCSM-19 were apparently homoallelic both in 'Murcott' tangor and in 'Pera' sweet orange. The locus CCSM-12 presented only one allele (299 bp) in 'Murcott' tangor and two (312 and 286 bp) in 'Pera' sweet orange. SSR monomorphic alleles in citrus have already been detected for locus TAA1 loci, in different species and genera (Kijas et al., 1995), and loci CAC15 and CAC39 in a segregating progeny of intergeneric hybrids (Kijas et al., 1997).

Single genotyping of SSR locus. This analysis was carried out through the assembling of PCR made up of a single primer. The amplified SSR loci in 'Murcott' tangor, 'Pera' sweet orange, zygotic and nucellar seedlings through the CCSM-4, -6, and -19 primers are shown in Figs. 2-4, respectively. This methodology allowed clear distinction of 16 hybrids among the 57 seedlings analyzed.

Duplex genotyping of SSR loci. Duplex PCR is a variation of PCR where alleles of two loci are amplified simultaneously in the same reaction (Henegariu et al., 1997), and it was employed in this study through the assembling of PCR made up of all combinations among the CCSM-4, -6, and -19 primers, since these primers were not designed a priori to be compatible with duplex PCR systems.

The quality of amplification and genotyping ability of polymorphic loci were obtained only from the combination of CCSM-4/-6 primers (Fig. 5). Co-amplified DNA fragments related to loci CCSM-4 and CCSM-6 were easily separable in gel at 3.5%. Multiplex PCR products differing in size from 30 to 40 bp were also suitably separated by Henegariu et al. (1997) in agarose gels at 3%. The combination of primers may not be compatible to the development of duplex PCR if the

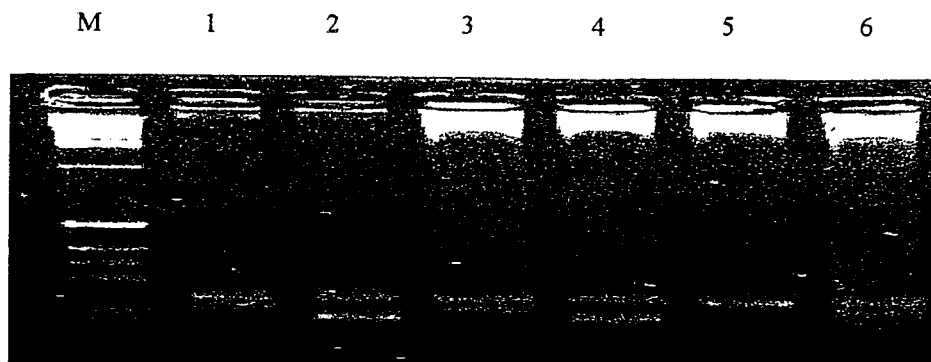


Fig. 3. Alleles of loci CCSM-6 obtained by PCR in 'Murcott' tangor (sample 1), 'Pera' orange (sample 2 and nucellar (samples 3 and 6), and hybrid (samples 4 and 5) seedlings acquired from this cross. M = DNA ladder 1 Kb.

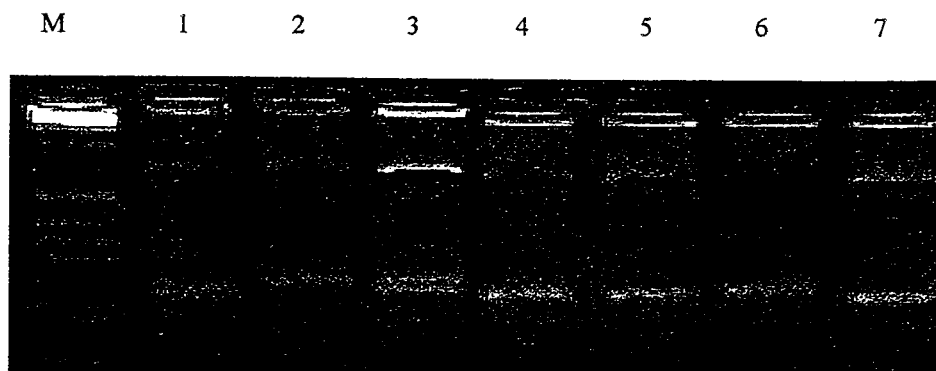


Fig. 4. Alleles of loci CCSM-19 obtained by PCR in 'Murcott' tangor DNA (sample 1); 'Pera' orange (sample 2) and nucellar (samples 4, 5, and 7), and hybrid (samples 3 and 6) seedlings acquired from this cross. M = DNA ladder 1 Kb.

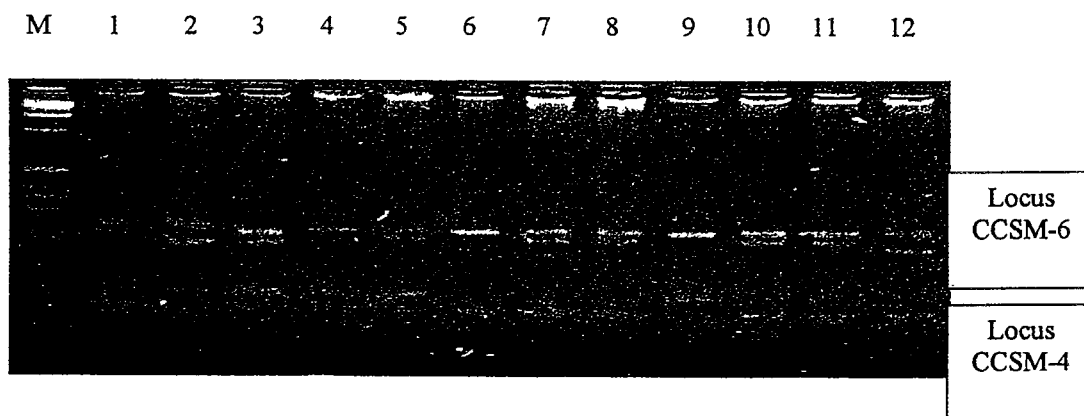


Fig. 5. SSR allele patterns obtained by PCR from CCSM-4 and -6 loci. 'Murcott' tangor (sample 1); 'Pera' orange (sample 2) and nucellar (samples 7, 8, 10, and 11), and hybrid (samples 3, 4, 5, 6, 9, and 12) seedlings acquired from this cross. M = DNA ladder 1 Kb.

amplification of SSR results in PCR products of similar sizes. In the cases of lack of amplification, the probable cause is annealing among primers or because of the amplification of alleles from only one of the SSR loci, due to the competition of the most effective primer (Bercovich et al., 1999).

The greatest efficiency of duplex PCR in the identification of hybrids is shown in Fig. 5, in which hybrids were identified through genotyping loci CCSM-4 (sample 5) or CCSM-6 (samples 6 and 12). Simultaneous genetic analysis of both loci allowed the identification of 52 additional hybrids, making the process of zygotic seedling identification more cost-effective because two loci were genotyped through a single PCR.

In all, 68 hybrid seedlings were identified in this study. The segregating population established is being used in studies about the inheritance of resistance to citrus variegated chlorosis disease (CVC), and for linkage map construction for identification of resistant genes.

Literature Cited

- Anderson, C.M., W.S. Castle, and G.A. Moore. 1991. Isozymic identification of zygotic seedlings in Swingle citrumelo *Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata* nursery and field populations. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116:322-326.
- Bercovich, D., Z. Regev, T. Ratz, A. Luder, Y. Plutsky, and Y. Gruenbaum. 1999. Quantitative ratio of primer pair and annealing temperature affecting PCR products in duplex amplification. *Biotechniques* 27:762-770.
- Cristofani, M., R.V. Brondani, V.M. Novelli, and M.A. Machado. 1998. Desenvolvimento de marcadores microsatélites para análise genética em citros. *Genet. Mol. Biol.* 21:222. (Abstr.)
- Davies, F.S. and L.G. Albrigo. 1994. Citrus. CAB Intl., Wallingford, U.K.
- Frost, H.B. and R.K. Soost. 1968. Seed reproduction: p. 290-324. In: W. Reuther, L.D. Batchelor, and H.J. Webber (eds.). Development of gametes and embryos. The Citrus Ind. Vol. 2. Univ. Calif. Press, Berkeley.
- Henegariu, O., N.A. Heerema, S.R. Dlouhy, G.H. Vance, and P.H. Vogt. 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 23:504-511.
- Hodgson, R.W. 1968. Horticultural varieties of citrus, p. 431-591. In: W. Reuther, L.D. Batchelor, and H.J. Webber (eds.). The Citrus Ind. Vol. 1. Univ. Calif. Press, Berkeley.
- Kijas, J.M.H., J.C.S. Fowler, and M.R. Thomas. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species. *Genome* 38:349-355.
- Kijas, J.M.H., M.R. Thomas, J.C.S. Fowler, and M.L. Roose. 1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of *Citrus*. *Theor. Appl. Genet.* 94:701-706.
- Litt, M. and L.A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle action gene. *Amer. J. Hum. Genet.* 44:398-401.
- Machado, M.A., H.D. Colleta Filho, M.L.P.N. Targon, and J. Pompeu, Jr. 1996. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. *Euphytica* 92:321-326.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321-4325.
- Pieringer, A.P. and G.J. Edwards. 1967. Identification of nucellar and zygotic citrus seedlings by infrared spectroscopy. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 86:226-234.
- Ruiz, C., M.P. Breto, and M.J. Asins. 2000. A quick methodology to identify seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica* 112:89-94.
- Schaffer, H.E. and R.R. Sederoff. 1989. Improved estimation of DNA fragment lengths from agarose gels. *Anal. Biochem.* 115:113-122.
- Soost, R.K., T.E. Williams, and A.M. Torres. 1980. Identification of nucellar and zygotic seedlings of citrus with leaf isozymes. *HortScience* 15:728-729.
- Tautz, D. and M. Renz. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 12:4127-4138.

Capítulo 2

Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers.

Autoria: OLIVEIRA, A. C.; GARCIA, A. N.; CRISTOFANI, M. & MACHADO, M. A.

Periódico: *Euphytica* (The Netherlands) 128(3):397-403 (2002).



Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers

Antonio Carlos de Oliveira, Aristides Novac Garcia, Mariângela Cristofani & Marcos Antônio Machado*

Citriculture Center 'Sylvio Moreira' of Agronomic Institute, C.P. 04 C.E.P. 13490-970 Cordeirópolis, São Paulo, Brazil; (*author for correspondence)

Received 13 April 2001; accepted 10 May 2002

Key words: apomixis, breeding, citrus, hybrid, microsatellite, seedling selection

Summary

Citrus breeding programs normally face several biological obstacles such as apomixis and polyembryony that result in a cumbersome identification of hybrid seedlings. The main purpose of this work is to describe the combined use of visual selection based on the leaf apex morphology and SSR analysis to differentiate hybrid from nucellar seedlings derived from the cross between the 'Murcott' tangor [*Citrus reticulata* Blanco × *Citrus sinensis* (L.) Osb.] and 'Pêra' sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osb.]. A new morphological variable named leaf apex morphometric index is also described as the quantitative basis of the visual selection. The efficiency of visual selection of hybrids was tested under two growth conditions, seedlings germinated in seedbeds and in plastic tubes. Putative hybrid seedlings were also confirmed through the analysis of simple sequence repeats (SSR). The visual selection of hybrid seedlings resulted in an increase of 87.2% ($p < 0.01$) and 202.2% ($p < 0.001$) in the number of correctly identified hybrids when compared to the method of random picking of seedlings in seedbeds and plastic tubes, respectively. The results indicate that the combination of visual selection and SSR analysis for the identification of hybrids derived from the cross of polyembryonic citrus cultivars will improve the accuracy of the selection, save time, and reduce the costs involved in the use of molecular markers alone in citrus breeding programs.

Abbreviations: LAL = leaf apex length; LAMI = leaf apex morphometric index; LAW = leaf apex width; TLL = total leaf length

Introduction

The development of segregating populations is the initial condition for the establishment of successful breeding programs. In citrus, this vital step is limited by the fact that most citrus cultivars exhibit apomixis and polyembryony (Frost & Soost, 1968). These characteristics are considered undesirable in citrus breeding programs since the correct identification of hybrids is hindered by these conditions. Even though monoembryonic citrus cultivars are available as female parents for crossings (Donadio, 1979), they are rare among sweet orange cultivars (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) (Domingues, 1998), which have the greatest economic importance among *Citrus* species.

The identification of citrus hybrids is normally performed through morphological markers. Hybrids derived from polyembryonic cultivars are easily identified when the genotypes, used as male parents, present a dominant character. For example, the trilobate leaf trait, a monogenic dominant character that differentiates most *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cultivars, is a classic feature used as morphological marker of hybrids between this species and other *Citrus* species (Cooper et al., 1962).

However, the identification of hybrids resulting from the cross between polyembryonic citrus genotypes becomes extremely difficult when neither parents has a convenient dominant character. In this case,

different procedures have been developed, including colorimetric (Furr & Reece, 1946), spectroscopic (Pieringer & Edwards, 1967), morphologic (Teich & Spiegel-Roy, 1972; Hearn, 1977), chromatographic (Tatum et al., 1974), and isoenzymatic (Torres et al., 1978; Anderson et al., 1991) methods. However, none of these methods offer absolute certainty about the nature of the selected seedlings. Therefore, their use frequently results in the exclusion of hybrid seedlings from segregating populations, which is considered highly undesirable in breeding programs.

The use of DNA polymorphisms for the identification of hybrid seedlings is important in citrus breeding programs because it speeds up the screening of progenies. Among DNA-based methods, random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis is one of the most widely used for differentiating hybrids in citrus breeding programs (Bastianel et al., 1998). Recently, Ruiz et al. (2000) described the use of simple sequence repeat (SSR) markers as an alternate method to distinguish hybrid from nucellar citrus seedlings. However, these DNA-based methods are frequently expensive and time consuming especially when dealing with crosses involving polyembryonic genotypes and the associated large numbers of nucellar seedlings (Moore & Castle, 1988). Therefore, an alternative approach to optimize the screening for hybrids obtained from these types of cross could be the implementation of an initial selection of putative hybrids based on morphological features, followed by their confirmation through molecular markers.

This article describes the identification of hybrid seedlings from crosses involving polyembryonic cultivars through the combined use of visual selection and SSR analysis. The quantitative basis of the visual selection is also discussed.

Material and methods

Controlled pollination

The cultivars 'Murcott' tangor and 'Pêra' sweet orange were used as female and male parents, respectively. These parental plants were obtained from the Mother Plant Bank at the Citriculture Center 'Sylvio Moreira' of Agronomic Institute, Cordeirópolis, SP, Brazil. Controlled pollinations were conducted in July of 1997 as described by Cameron & Frost (1968).

Seed germination

Seeds were sown between May and June of 1998 by two different methods:

1. *Seedbed.* The seedbed was arranged in rows located 5 cm apart and containing 60 seeds per row. The soil mixture used for the seedbeds contained sand, soil, and organic matter in a 1:2:1 proportion.
2. *plastic tube.* Plastic tubes with 50 mL capacity were placed into a 96-slot-box. They were filled with Plantmax[®] substrate and 2 seeds were planted per tube. The tubes were maintained under greenhouse conditions.

Determination of LAMI

The assessment of leaf morphology in 'Murcott', 'Pêra', hybrid, and nucellar seedlings germinated in seedbeds was performed on the first four leaves of the apical region with a leaf blade greater or equal to 40 mm in length. A total of 30 plants of each class were sampled.

For each harvested leaf, the LAMI was calculated as the ratio between the leaf apex length (LAL) and the leaf apex width (LAW). The LAL was determined by obtaining the total leaf length (TLL) and dividing it by 3 (each leaf was divided into 3 parts). The LAW was defined as the width of the leaf region at the base of the apex, where the LAL was determined. In order to validate the visual selection, seedlings were classified into hybrids or nucellar seedlings using SSR markers before the determination of LAMI.

The mean values of LAMI for the four genotypic classes ('Murcott', 'Pêra', hybrid, and nucellar seedlings) were evaluated based on standard deviation and coefficient of variance, and compared by the *t* test (Zar, 1999).

Distribution of frequencies of hybrid and nucellar seedlings in relation to the magnitude of LAMI

The distribution of frequencies of hybrid and nucellar seedlings was constructed based on the LAMI values of 99 seedlings, according to Zar (1999). The null hypothesis of an expected 1:1 ratio between nucellar and hybrid seedlings was evaluated using the χ^2 test of goodness of fit (Zar, 1999).

Efficiency of the visual selection of hybrids

In order to determine the efficiency of the visual selection of hybrids based on morphological features

of the leaf apex, seedlings germinated in seedbeds and plastic tubes were sampled using, respectively, three selection criteria (absence of selection, visual selection of hybrid, and visual selection of nucellar seedlings) and two criteria of selection (absence of selection and visual selection of hybrids). In both cases, hybrid and nucellar seedlings that were visually selected were genotyped using SSR *loci* analysis.

The proportion of hybrid and nucellar plants in citrus seedlings were analyzed through the $2 \times 2 \chi^2$ table, which determines whether there is an association or not between two variables (Zar, 1999), i.e., the use or not of the visual selection and the quantity of hybrid and nucellar seedlings selected. The correction of Yates was used when the value observed for the contingency classes was lower than five (Zar, 1999). The $2 \times 2 \chi^2$ table has been used in citrus for the evaluation of the ratio of hybrid and nucellar seedling in relation to its location in seeds (Ribeiro et al., 1999). The $2 \times 2 \chi^2$ table was calculated using the software package STATISTICA 5.0.

Genotyping through SSR *loci* analysis

Hybrid and nucellar seedlings were correctly identified by SSR *locus* polymorphism. Briefly, genomic DNA was extracted from fresh leaves according to the CTAB-Sarcosyl protocol (Murray & Thompson, 1980) modified by Machado et al. (1996). The PCR amplification reactions were conducted in volumes of 25 μ l with 1/10 volume of 10X buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.3; 500 mM KCl; 25 mM MgCl₂; 0.01% gelatin); 200 mM of each dATP, dCTP, dGTP and dTTP nucleotides (GIBCO BRL/Life Technologies); 50 ng of DNA; 1.5 units of *Taq* polymerase (GIBCO BRL/Life Technologies), and 8 μ moles of the CCSM-4 (forward: 5'TTCTCCTCATCTTCGACTCC3' and reverse: 5'CCGATCTTACGACGTATCAA3') and CCSM-6 (forward: 5'ATCTGTGTGAGGACTGAA3' and reverse: 5'CCTCTATTAATGTGCCTG3') primers, as described by Cristofani et al. (1998), and synthesized by OPERON Technologies. The amplifications were performed under duplex PCR conditions in a thermocycler (MJ Research Thermocycler) programmed with a first denaturation at 94 °C for 5 min followed by 32 cycles of 1 min at 94 °C; 30 sec at 55 °C, and 1 min at 72 °C, with a final extension at 72 °C for 4 min (Kijas et al., 1995). Aliquots of 10 μ l of the amplification reaction were analyzed by electrophoresis in 3.5% agarose gels and TAE buffer (0.04 M Tris Acetate; 1 mM EDTA) containing 0.5

Table 1. Mean values for the LAMI obtained from 120 leaves sampled from 30 plants of 'Murcott' tangor, 'Pêra' sweet orange, and hybrid and nucellar seedlings resulting from crossing between those cultivars

Genotype	LAMI ¹	S _x ²	CV (%) ³
'Murcott'	0.761	± 0.01	11.47
'Pêra'	0.868	± 0.01	15.34
Hybrid	0.816	± 0.02	14.61
Nucellar	0.768	± 0.01	8.39

Observation ¹ = *t* test detected significant difference ($p < 0.001$) in all comparisons among the means, excepted among the ones of LAMI from 'Murcott' and 'nucellar' ($p > 0.05$).

² = standard deviation of sample means; ³ = coefficient of variation.

ng/ml of ethidium bromide. The 1 Kb DNA ladder was used as size marker (GIBCO-BRL/Life Technologies). The samples were separated for 90 min at 5 V/cm. To identify hybrid and nucellar seedlings, DNA polymorphisms were analyzed by comparing the SSR markers produced by these seedlings with those generated by the parents.

Results

Initial visual analysis of the apex region from leaves of parents, hybrid, and nucellar seedlings indicated that leaves of 'Pêra' and hybrids exhibited sharp-pointed apices, while those in 'Murcott' and nucellar seedlings were round-shaped. This morphological feature was quantified using the LAMI (Table 1). The observed LAMI values indicate that this morphometric feature exhibits an intermediate level in hybrid seedlings (LAMI = 0.816) that is significantly different from those LAMIs of parental and nucellar seedlings, indicating that this trait may be transferred immediately to the hybrid seedlings. No significant differences ($p > 0.05$) were observed between LAMI values of 'Murcott' tangor and nucellar seedlings (LAMI = 0.761 and 0.768, respectively) since their leaves have the same genotype. In addition, for all LAMI measurements, the coefficients of variation were relatively low, validating the hypothesis that the environmental heterogeneity has a low effect on the leaf shape (Teich & Spiegel-Roy, 1972).

After confirming that the average LAMI of zygotic and nucellar seedlings was different, we decided to evaluate the distribution of frequencies of hybrid and nucellar seedlings within defined intervals of LAMI. The lower limit was defined based on the average

Table 2. Distribution of frequencies (f_i), percentage (%) and χ^2 test of goodness of fit in reference to the 99 hybrid and nucellar seedlings in each interval of LAMI

LAMI interval	Hybrid seedling ¹		Nucellar seedling ¹		Total of seedlings	χ^2 Test ² p
	f_i	%	f_i	%		
0.75 < LAMI $\leq$ 0.80	7	26.7	19	73.3	26	0.02*
0.80 < LAMI $\leq$ 0.85	16	47	18	53	34	0.73 ^{ns}
0.85 < LAMI $\leq$ 0.90	16	84.2	3	15.8	19	0.002**
0.90 < LAMI $\leq$ 0.95	6	75	2	25	8	0.16 ^{ns}
0.95 < LAMI $\leq$ 1.00	3	60	2	40	5	0.65 ^{ns}
1.00 < LAMI $\leq$ 1.15	4	57.1	3	42.9	7	0.70 ^{ns}
Total of seedlings	52		47		99	

Observation: ¹ identified by the SSR locus analysis and ² χ^2 test of goodness of fit assuming equal proportion between hybrid and nucellar seedlings for each LAMI interval, where: ns = non-significant at $p > 0.05$; * = significant at $p < 0.05$ and ** = significant at $p < 0.01$.

value of LAMI for nucellar seedlings. On the other hand, the upper limit was defined as a result of the highest value of LAMI observed. The frequency of hybrid and nucellar seedlings within each interval of LAMI was tested by the χ^2 test of goodness of fit (Table 2). Significant differences were observed only for the intervals 0.75 < LAMI $\leq$ 0.80 and 0.85 < LAMI $\leq$ 0.90, which had the largest quantity of nucellar ($p < 0.05$) and hybrid ($p < 0.01$) seedlings, respectively. In the last interval, 5-fold more hybrid than nucellar seedlings was detected.

Putative hybrid and nucellar seedlings were visually selected from seedbeds and plastic tubes, and confirmed through SSR analysis. The proportion of hybrid and nucellar seedlings was evaluated through a $2 \times 2 \chi^2$ table (Table 3).

Significant differences were obtained between the proportion of hybrids and nucellar seedlings visually selected in seedbeds ($p < 0.01$) and plastic tubes ($p < 0.001$), with increased success rates of 87.2% and 202.2%, respectively. Therefore, this indicates that the visual selection of hybrids, in both sowing methods, identified a larger number of hybrid seedlings, thus, decreasing the number of samples to be genotyped by SSR locus analysis.

The genotypes of the seedlings resulting from the cross between 'Murcott' and 'Pêra' were identified through the genetic analyses of the CCSM-4 and CCSM-6 loci by duplex PCR reaction (Figure 1).

Both parents are heteroallelic for the CCSM-6 locus. The size of the four alleles varied from 207 to 255 bp, according to electrophoretic analysis. Size determination was performed in triplicate, and the average size of each fragment was calculated (data not

shown). Since the maximum size difference between alleles was just 48 bp and some hybrids have alleles of the CCSM-6 locus of almost identical size (Figure 1, lines 4, 6, 9, 13, 14, 15, and 16), only one band was detected in the gel. The CCSM-4 locus, detected in 'Pêra' sweet orange, is apparently homoallelic. However, the segregation of the alleles observed in the progeny indicated that the CCSM-4 locus is heteroallelic, i.e., identifying hybrids with a null allele for this locus (Figure 1, lines 6, 12, and 13). In addition, the detection of the allele of CCSM-4 locus in 'Murcott' tangor, showed hybrids with band of low intensity (Figure 1, lines 3, 5, and 9). This result can be interpreted as being due to the competition of the most effective primer, resulting in the preferential amplification of one of the alleles that is generally detected in duplex PCR (Bercovich et al., 1999).

Discussion

Many studies that applied leaf morphology traits to help how differentiate hybrid from nucellar citrus seedlings have been reported in the literature. Teich & Spiegel-Roy (1972) described an index using the ratio between the total leaf length and its width to identify hybrids derived from the cross between the 'King' mandarin and oranges, tangelos, and tangerines. Donadio (1979) used the width of the leaf petiole as a morphological marker to differentiate hybrids resulting from the cross between Satsuma mandarin and 'Natal' sweet orange, 'Rio' and 'Cravo' tangerines, or 'Murcott' tangor. More recently, Ballvé et al. (1997) reported the use of a morphological marker based on the width of the leaf petiole wing for the identification

Table 3. $2 \times 2 \chi^2$ table between the frequency of hybrid and nucellar seedlings identified through the use or not of visual selection of seedlings germinated in seedbed and in plastic tubes

Sowing method	Visual selection type	Nº hybrid seedlings ^a	Nº nucellar seedlings ^a	Total
Seedbed	hybrid (a) ^{1,2}	62	56	118
	nucellar (b) ³	3	12	15
	Absence of selection (c) ⁴	16	41	57
Plastic tube	hybrid (d) ⁵	92	26	118
	Absence of selection (e)	8	23	31

¹ variable I: (a) and variable II: (c) - $p < 0.01$.

² variable I: (a) and variable II: (d) - $p < 0.001$.

³ variable I: (b) and variable II: (c) - $p > 0.05$;

⁴ variable I: (c) and variable II: (e) - $p > 0.05$.

⁵ variable I: (d) and variable II: (e) - $p < 0.001$;

^a genotypes analyzed by SSR loci.

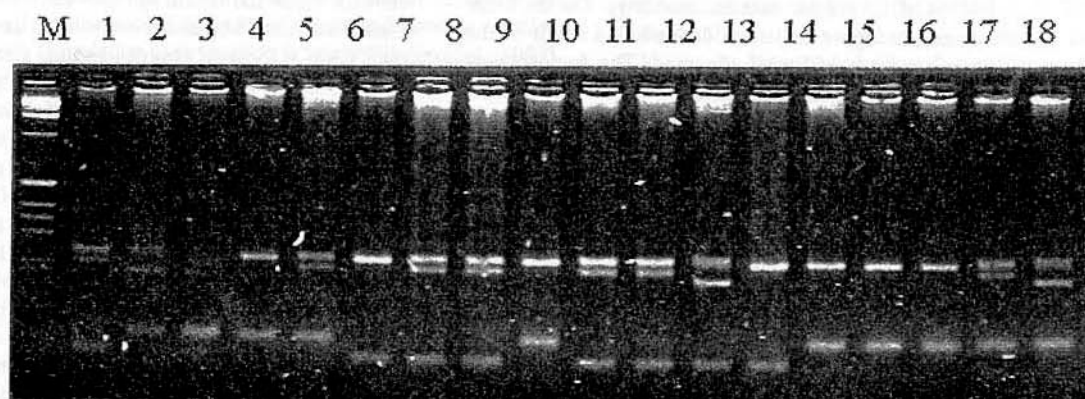


Figure 1. Amplification of the SSR alleles obtained through duplex PCR with the primers CCSM-4/-6 from DNA of 'Murcott' tangor (1), 'Pêra' sweet orange (2) and the nucellar (7, 8, 10, and 11) and hybrid (3 to 6, 9, 12 to 18) seedlings. M = DNA ladder 1 Kb (GIBCO - BRL). Loci CCSM-6: upper and locus CCSM-4: bottom.

of reciprocal hybrids. In this work, the ratio between total leaf length/width was also evaluated as a potential tool to differentiate hybrids from nucellar seedlings; however, no statistical differences were observed (data not shown).

The detection of hybrids within all LAMI intervals allowed us to infer that genes with an additive effect may control the inheritance of the leaf shape. The data obtained in this work confirmed the reports by Teich & Spiegel-Roy (1972) and Ballvé et al. (1997).

Nucellar seedlings were also detected in all LAMI intervals. Therefore, the use of LAMI alone is not enough to identify hybrids without any confirmation using molecular markers. Studies carried out by Lima (1977) using isoenzymatic analysis detected nucel-

lar seedlings that were previously identified as hybrids by the ratio of leaf length/width. In addition, Hearn (1977) attempting to associate leaf markers with chemical methods to identify citrus hybrids was not able to obtain a clear difference for hybrid seedlings.

The efficiency of visual selection of hybrids was higher in plastic tubes than in seedbeds ($p < 0.001$). This might be due to a smaller environmental effect in the expression of the leaf shape in seedlings sown in plastic tubes than in seedbeds. Consequently, the majority of hybrids exhibited a tendency to have intermediate LAMI values when compared to their parents. Those results are in agreement with Lima (1988) and Teófilo Sobrinho (1991), who documented high mor-

phological uniformity among plants grown in plastic tubes during the production of nursery plants.

The LAMI was also used to select nucellar seedlings. The proportion of hybrid and nucellar seedlings from seedbeds, obtained with or without visual selection, showed non-significant differences ($p > 0.05$). This result can be explained by the large number of nucellar seedlings sampled under the absence of visual selection (71.9%) and, consequently, by the increase of only 11.3% in the identification of nucellar seedlings when the visual selection was used (Table 3).

Since seedlings were sampled at different periods of time, their samples were tested to check their homogeneity. The different sampling period did not affect the ratio of hybrid and nucellar seedlings obtained (data not shown). Moreover, the visual selection was verified in both, seedbed and plastic tubes, without measuring leaf size. Therefore, a well-experienced person could identify a large number of hybrids just by visual selection.

Hybrid and nucellar seedlings from an interspecific cross [(*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Var. 'Flying Dragon' and tangor 'Ortanique' (*Citrus reticulata* Blanco $\times$ *C. sinensis* (L.) Osbeck)] and from selfing (*Fortunella crassifolia* Swing) were recently distinguished by SSR markers in *citrus* (Ruiz et al., 2000).

In this work, the use of SSR locus genotyping was associated with the visual selection based on the leaf apex conformation as a new strategy for improving the identification of citrus hybrids derived from crosses of polyembryonic citrus cultivars, saving time and reducing the costs involved in genotyping large numbers of seedlings through molecular marker analyses in citrus breeding programs. This work showed that this approach could be very efficient for selection of hybrids resulting from the cross between 'Murcott' tangor and 'Pêra' sweet orange. The segregating progeny identified in this work are being used to study the inheritance of resistance to citrus variegated chlorosis (CVC) and also for the construction of linkage maps used to locate the genes associated with the resistance.

Acknowledgements

This work was partly supported by research grants CNPq-Rhae (160215/99-4), FAPESP (98/06217-0) and PRONEX.

References

- Anderson, C.M., W.S. Castle & G.A. Moore, 1991. Isozymic identification of zygotic seedlings in Swingle citrumelo *Citrus paradisi* $\times$ *Poncirus trifoliata* nursery and field populations. *J Amer Soc Hort Sci* 116: 322-326.
- Ballvé, R.M.L., H.P. Medina Filho & R. Bordignon, 1997. Identification of reciprocal hybrids in citrus by the broadness of the leaf petiole wing. *Braz J Genet* 20: 697-702.
- Bastianel, M., S.F. Schwarz, H.D. Colleta Filho, L.L. Lin, M.A. Machado & O.C. Koller, 1998. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. *Genet Mol Biol* 21: 123-127.
- Bercovich, D., Z. Regev, T. Ratz, A. Luder, Y. Plutsky, and Y. Gruenbaum, 1999. Quantitative ratio of primer pair and annealing temperature affecting PCR products in duplex amplification. *Biotechniques* 27: 762-770.
- Cameron, J.W. & H.B. Frost, 1968. Genetics, Breeding, and Nucellar Embryony. In: W. Reuther, L.D. Batchelor & H.J. Webber (Eds.), *The Citrus Industry II*, pp. 325-370. California Univ. Press, Berkeley.
- Cooper, W.C., P.C. Reece & J.R. Furr, 1962. Citrus breeding in Florida: past, present and future. *Proc Florida State Hort Soc* 75: 5-13.
- Cristofani, M., R.V. Brondani, V.M. Novelli & M. A. Machado, 1998. Desenvolvimento de marcadores microsatélites para análise genética em citros. *Genet Mol Biol* 21: 222.
- Domingues, E.T., 1998. Caracterização morfológica, agrônômica, isoenzimática e por RAPD de variedades de laranja doce - *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. PhD thesis. ESALQ, Piracicaba, 246 p.
- Donadio, L.C., 1979. Estudo de alguns caracteres morfológicos de progênies obtidas de hibridações de cultivares poliembriônicas de *Citrus*. Tese de Livre Docência. UNESP, Jaboticabal, 76 p.
- Frost, H.B. & R.K. Soost, 1968. Seed Reproduction: Development of Gametes and Embryos. In: W. Reuther, L.D. Batchelor & H.J. Webber (Eds.), *The Citrus Industry II*, pp. 290-324. California Univ. Press, Berkeley.
- Furr, J.R. & P.C. Reece, 1946. Identification of hybrid and nucellar citrus seedlings by a modification of the rootstock color test. *Proc Amer Soc Hort Sci* 48: 141-146.
- Hearn, C.J., 1977. Recognition of zygotic seedlings in certain orange crosses by vegetative characters. *Proc Int Soc Citric* 2: 611-614.
- Kijas, J.M.H., F.C.S. Fowler & M.R. Thomas, 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. *Genome* 38: 349-355.
- Lima, H., 1977. Evaluation of the effectiveness to two techniques used to separate nucellar and zygotic *Citrus* seedlings. *Int Soc Citric*, p. 80.
- Lima, J.E.O., 1988. Novas técnicas de produção de mudas cítricas. *Laranja* 7: 463-468.
- Machado, M.A., H.D. Colleta Filho, M.L.P.N. Targon & J. Pompeu Junior, 1996. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. *Euphytica* 92: 321-326.
- Moore, G.A. & W.S. Castle, 1988. Morphological and isozymic analysis of open-pollinated Citrus rootstock populations. *Heredity* 79: 59-63.
- Murray, M.G. & W.F. Thompson, 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res* 8: 4321-4325.
- Pieringer, A.P. & G.J. Edwards, 1967. Identification of nucellar and zygotic citrus seedlings by infrared spectroscopy. *Proc Am Soc Hort Sci* 86: 226-234.

- Ribeiro, V.G., M. Pasqual, J.D. Ramos, E. Bearzoti & S. D'angelo Neto, 1999. Estádios de desenvolvimento embrinário e localização do embrião zigótico em sementes de citros. *Pesq agrop bras* 34: 1327-1333.
- Ruiz, C., M. Paz Breto & M.J. Asfns, 2000. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica* 112: 89-94.
- Tatum, J.H., R.E. Berry & C.J. Hearn, 1974. Characterization of Citrus cultivars and separation of nucellar and zygotic seedlings by thin layer chromatography. *Proc Florida State Hort Soc* 87: 75-81.
- Teich, A.H. & P. Spiegel-Roy, 1972. Differentiation between nucellar and zygotic citrus seedlings by leaf shape. *Theor Appl Gen* 42: 314-315.
- Teófilo Sobrinho, J., 1991. Propagação dos citros. In: O. Rodriguez, F. Viégas, J. Pompeu Jr. & A. A. Amaro (Eds.), *Citricultura brasileira I*, pp. 181-301. Fundação Cargill, Campinas.
- Torres, A.M., R.K. Soost & U. Diedenhofen, 1978. Leaf isozymes as genetic markers in citrus. *Am J Bot* 65: 869-881.
- Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analyses*. Prentice Hall, New Jersey.

Capítulo 3

***In vitro* rescue of embryos of *Citrus* and identification of hybrids through morphological and molecular markers.**

Autoria: OLIVEIRA, A. C. & MACHADO, M. A.

Periódico: *Proc. Proc. Intl. Society Citriculture* (USA) vol. I, pp. 172-174 (2000).

In Vitro Embryo Rescue of Citrus and Identification of Hybrid Morphometric Features and Molecular Markers

Antonio Carlos de Oliveira

Depto de Genética e Evolução, UNICAMP, C.P. 6109 C.E.P. 13081-970 Campinas, Brazil

Marcos Antônio Machado

Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, C.P. 04 C.E.P. 13490-000 Cordeirópolis, Brazil

Additional index words. apomixis, DNA, germination, microsatellite, 'Murcott' tangor, PCR, 'Pera' sweet orange

Abstract. Apomixis and polyembryony are biological obstacles found in citrus breeding, mainly among polyembryonic cultivars, which require the evaluation of germination methods that improve and/or diversify the identification of hybrids. This study evaluated the effect of the in vitro rescue of embryos (up to 3 mm long) [be this rescue followed or not by visual screening of hybrid seedlings according to the "leaf apex conformation index" (LACI)], on the hybrid and nucellar identification frequencies obtained from crosses between 'Murcott' tangor [*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osb.] x 'Pera' sweet orange [*C. sinensis* (L.) Osb.]. Seedlings germinated in seedbeds constitute the germination-control method. The seedlings were identified as nucellar or zygotic by using simple sequence repeat (SSR) markers.

Differences in zygotic and nucellar seedlings frequencies during random sampling were nonsignificant ($P \leq 0.05$), but under visual screening these difference proved significant ($P \leq 0.001$). Considering the chromosomal segregation pattern of the 'Murcott' tangor, the LACI's additive genetic effect, and the intermediate polyembryony level detected in seeds from this cross, it was found that the hybrids from in vitro germinated small embryos contain a chromosomal constitution more similar to 'Murcott' tangor and, thus, with LACI close to the maternal parent. There was no response to visual screening. The in vitro rescue of small embryos originated from low and intermediate polyembryonic seeds produced in the backcross may be considered for the isolation of hybrids with genotypes closer to the hybrid parent.

Establishing segregating populations between citrus cultivars is highly demanding due to their apomictic and polyembryonic constitution (Davies and Albrigo, 1994). Nucellar polyembryony leads to competition among the embryos for space and nutrients in developing seeds, causing damage to and loss of the zygotic embryo (Frost and Soost, 1968). The importance of evaluating germination methods which increase and/or diversify the identification of hybrids is evident. The strategy of rescuing embryos in vitro is an alternative which assures embryo germination and development of hybrid seedlings in citrus (Ohta and Furusato, 1957).

The hybrid seedling identification rate between 'Murcott' tangor and 'Pera' orange was established (A.C. Oliveira, unpublished data) by germinating seeds in plastic cups and in seedbeds, and randomly sampling or visually screening, then using the morphometric feature "leaf apex conformation index" (LACI). There are no studies on the efficiency of rescuing embryos in vitro from this cross.

The purpose of this study is to evaluate the effect of in vitro rescue of embryos, be this rescue followed or not by visual screening hybrid seedlings, on the hybrid and nucellar identification frequencies obtained from the crossing between 'Murcott' tangor x 'Pera' sweet orange.

Materials and Methods

Controlled pollination. Controlled pollination between 'Murcott' tangor [*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osb.] and 'Pera' sweet orange [*C. sinensis* (L.) Osb.] (male parent) took place in July 1997 using trees of the Mother Plant Bank of the Centro de Citricultura Sylvio Moreira-Inst. Agron. de Campinas, Cordeirópolis, SP, Brazil.

Germination. Fruit were harvested, 330 d after pollination and the seeds extracted, and germinated using one of the following methods:

1) *In vitro germination of embryos.* Twenty embryos were selected

for germination (up to 3-mm length, including the cotyledons), according to studies showing that hybrid embryos usually show the least viability during their development in the seeds (Frost and Soost, 1968). The embryos were superficially disinfected with alcohol (70%) and sodium hypochlorite (15%), placed in an MT medium (Murashige and Tucker, 1969) in the growth chamber under a 16-h photoperiod (35 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), and an average temperature of 27 °C for 30 to 45 d (Ribeiro et al., 1997). Later, the seedlings were transferred to 200-mL cups filled with 1 sand, 2 soil : 1 organic material.

2) *Seedbed.* A seed lot as germinated in a seedbed. The seedbed is a germination-control method that allows comparison of hybrid seedling identification rates obtained by in vitro germination of embryos.

Determination of rate of hybrid seedling identification. The frequency of hybrid and nucellar seedlings was assessed by the following procedures: 1) random sampling of seedlings and 2) visual screening of hybrid seedlings carried out through LACI (leaf apex conformation index, i.e., the ratio between the leaf apex length and width). This is a morphometric feature that identifies hybrids from this cross (A.C. Oliveira, unpublished data).

DNA isolation. Total DNA was extracted based on modifications in the extraction methodology, CTAB-Sarcosyl (Murray and Thompson, 1980) as described by Machado et al. (1996).

Duplex genotyping of SSR loci. Seedlings were genotyped through analysis of SSR (simple sequence repeat) loci by duplex PCR (A.C. Oliveira, unpublished data) using the CCSM-4/-6 primers (Cristofani et al., 1998). In short, SSR amplification reactions were carried out in a 25 μL volume, with 100 mM Tris-HCl pH 8.3; 500 mM KCl; 25 mM MgCl₂; 0.01% gelatin; 200 mM dNTPs; 8 μmol of primers; 50 ng of DNA and 1.5 U of Taq DNA polymerase. Reactions were subjected to 32 cycles of 1 min at 94 °C; 30 s at 55 °C; and 1 min at 72 °C, preceded by initial denaturation of 5 min at 94 °C and followed by 4 min at 72 °C, as described by Kijas et al. (1995). Eight liters of amplification products were loaded onto agarose gels 3.5% (wt/vol) with ethidium bromide (0.5 ng/mL).

Statistical analysis. The frequencies observed between hybrid and nucellar seedlings were evaluated using the 02 contingency test (Zar, 1999).

Results and Discussion

Duplex genotyping of SSR locus. The genetic constitution of seedlings from both germination methods was accurately identified through the genetic analysis of CCSM-4 and -6 SSR loci resultant from duplex PCR (Fig. 1).

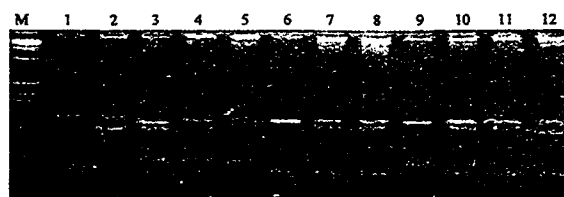


Fig. 1. SSE alleles patterns obtained by PCR from CCSM-4 and -6 loci. 'Murcott' tangor (sample 1); 'Pera' orange (sample 2); and nucellar (samples 7, 8, 10, and 11) and zygotic (samples 3, 4, 5, 6, 9, and 12) seedlings acquired from this cross. M = DNA ladder 1 kb.

Table 1. χ^2 contingency test for the frequency of hybrid and nucellar seedlings developed from in vitro embryo rescue and the germination of seeds in seedbeds, sampled at random and genetically identified through the analysis of SSR loci, by PCR.

Germination method	Hybrid seedlings (no.)	Nucellar seedlings (no.)	Total
Embryo rescue	9	36	45
Seedbed	16	41	57

Means were not significantly different, $P \leq 0.05$.

Table 2. χ^2 contingency test for the frequency of hybrid and nucellar seedlings developed from in vitro embryo rescue and the germination of seeds in seedbeds selected by their foliar appearance and genetically identified through analysis of SSR loci by PCR.

Germination method	Hybrid seedlings (no.)	Nucellar seedlings (no.)	Total
Embryo rescue	0	11	11
Seedbed	62	56	118

Means were significantly different, $P \leq 0.01$.

Frequency of hybrids and nucellars in random sampling. Differences in the frequency of hybrid and nucellar seedlings in random samples from in both germination methods showed no statistic difference ($P \leq 0.05$) (Table 1), i.e., the in vitro rescue of small embryos did not increase the rate of hybrid seedling identification.

Frequency of hybrids and nucellars using visual screening. Under LACI selection, the frequencies observed between hybrids and nucellars detected in both germination methods were statistically significant ($P \leq 0.001$) (Table 2). Hybrids between 'Murcott' tangor and 'Pera' sweet orange, typically identified by LACI, show intermediate traits in their leaf apices in relation to the parents (A.C. Oliveira, unpublished data).

Previously, it was thought that the germination of only small embryos would result in an increase in the frequency of hybrids identified, since they result from polyembryonic cultivars (Recupero and Russo, 1992), and the lack of visual detection of hybrids among the seedlings germinated in vitro. The results may be interpreted as follows:

1) Chromosomal segregation patterns of 'Murcott' tangor. Seedlings used in this work originally came from the backcross between 'Murcott' tangor and 'Pera' sweet orange. 'Murcott' is a tangor (hybrid of mandarin and orange) of unknown origin (Hodgson, 1968). The hybrid nature of 'Murcott' was recently confirmed by similar patterns of deletion and restriction of mitochondrial DNA between 'Murcott' and its maternal ancestor, *C. reticulata* (E.F. Araujo, personal communication).

2) LACI's genetic basis. This morphometric feature has an additive genetic effect, i.e., it is partly transferred to the hybrid seedlings (A.C. Oliveira, unpublished data).

3) Polyembryony level of the seeds and size of zygotic embryos. An intermediate level of polyembryony in seeds of 'Murcott' x 'Pera' was detected (3.4 embryos/seed, detected in a sample of 100 seeds) (A.C. Oliveira, unpublished data), which is in general inversely related to the size of zygotic embryos (Frost and Soost, 1968; Majsuradze, 1951).

Thus, the non-selection of hybrid seedlings by visual screening among the seedlings germinated in vitro may be attributed to the particular size of up to 3 mm long of those embryos rescued, which determines the hybrids obtained with a chromosomal constitution similar to 'Murcott' tangor and, thus, an LACI closer to its parent. This made the visual screening of hybrids impossible (Table 1). On the other hand, visual screening in seedlings from seedbed germination led to an increase of 87.2% in the rate of hybrid seedling identification (Tables 1 and 2). In this case, the embryos showed a considerable variation in size (from small to large). The largest zygotic embryos showed hybrid chromosomal constitution between its parents and, consequently, a parent-like average level of LACI, making them visually identifiable.

Similar results were found by Soares-Filho et al. (1992). These authors found that Rangpur lime (*C. limonia* Osb.) had a mean of two embryos/seed, of which 18.6% of the developed embryos were zygotic and only 5.9% of these measured 2.9 mm less. Cleopatra mandarin (*C. reshni* Hort. ex Tan.) had a mean of 10.1 embryos per seed, of which 5.2% were zygotic and 40.8%, measured 2.9 mm, or less. Carimi et al. (1998) detected an increase in survival rates as well as an increase in the size of zygotic embryos of sour orange (*C. aurantium* L.) rescued in vitro whenever the number of nucellar embryos per seed was low.

To conclude, the in vitro rescue of small embryos originating from seeds of low and intermediate polyembryony resulting from a backcross may be considered for the isolation of hybrids with genotypes close to the hybrid parent. The segregating population established by that methodology is being used in inheritance studies of resistance to citrus variegated chlorosis disease (CVC) and in the construction of linkage maps to identify resistance genes.

Acknowledgments

This paper is part of a PhD thesis to be presented by the first author. This research was supported by PRONEX, FAPESP, and CNPq.

Literature Cited

- Carimi, F., F. Pasquale, and A.M. Puglia. 1998. In vitro rescue of zygotic embryos of sour orange, *Citrus aurantium* L., and their detection based on RFLP analysis. *Plant Breeding* 117:261-266.
- Cristofani, M., R.V. Brondani, V.M. Novelli, and M.A. Machado. 1998. Desenvolvimento de marcadores microsatélites para análise genética em citros. *Genet. Mol. Biol.* 21:222. (Abstr.)
- Davies, F.S. and L.G. Albrigo. 1994. *Citrus*. CAB Intl., Wallingford, U.K.
- Frost, H.B. and R.K. Soost. 1968. Seed reproduction: Development of gametes and embryos, p. 290-324. In: W. Reuther, L.D. Batchelor, and H.J. Webber (eds.). *The Citrus Ind.*, Vol 2. Univ. of Calif. Press, Berkeley.
- Hodgson, R.W. 1968. Horticultural varieties of citrus, p. 431-591. In: W. Reuther, L.D. Batchelor, and H.J. Webber (eds.). *The Citrus Ind.*, Vol I. Univ. of Calif. Press, Berkeley.
- Kijas, J.M.H.; J.C.S. Fowler, and M.R. Thomas. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. *Genome* 38:349-355.
- Machado, M.A., H.D. Colleta Filho, M.L.P.N. Targon, and J. Pompeu, Jr. 1996. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. *Euphytica* 92:321-26.
- Murashige, T. and D.P.H. Tucker. 1969. Growth factor requirements of citrus tissue culture. *Intl. Citrus Symp.* 3:1155-1166.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321-4325.
- Ohta, Y. and K. Furusato. 1957. Embryo culture in *Citrus*. Seiken Zihō, Rpt. Kihara Inst. Biol. Res. 23:49-54.
- Recupero, G.R. and M.P. Russo. 1992. Percents of nucellar embryony in some hybrid populations of *Citrus latipes*. *Proc. Intl. Soc. Citricult.*:130-134.
- Ribeiro, V.G., M. Pasqual, J.D. Ramos, A.F. Oliveira, Jr., and G.R. Carvalho. 1997. Influência do pH e do ágar sobre o cultivo in vitro de embriões de laranja Pêra. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34:1327-1333.
- Soares Filho, W.S., J.E. Vásques Araujo, M.A.P. Cunha, A.P. Cunha Sobrinho, and O.S. Passos. 1992. Degree of polyembryony, size and survival of the zygotic embryo in citrus. *Proc. Intl. Soc. Citricult.*:135-138.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical analyses*. 4th ed. Prentice Hall, N.J.

Capítulo 4

**Adaptation of minipreps-SDS and single-step in the extraction of citrus
DNA for PCR analyses.**

Autoria: OLIVEIRA, A. C.; GARCIA, A. N.; TAKITA, M. A. & MACHADO, M. A.

Periódico: *Proc. Intl. Society Citriculture* (USA) vol. I, pp. 105-107 (2000).

Adaptation of Minipreps-SDS and Single-Step in the Extraction of Citrus DNA for PCR Analyses

Antonio Carlos de Oliveira

Depto de Genética e Evolução, UNICAMP, C.P. 6109 C.E.P. 13081-970 Campinas, Brazil

Aristides Novac Garcia, Marcos Aurélio Takita, and Marcos Antônio Machado

Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, C.P. 04 C.E.P. 13490-000 Cordeirópolis, Brazil

Additional index words. diagnose, genotyping, hybrid, microsatellite, molecular markers, seedling, *Xylella fastidiosa*

Abstract. Molecular markers based on PCR requires DNA extraction methods that are practical and reliable. Fast protocols have been used for DNA extraction from plants, resulting in a DNA that is not as pure as what is obtained with the CTAB method, even though it allows PCR analysis with an equal efficiency. This work describes miniprep adaptations based on the single step, SDS and DNA preparations. The CTAB method was used as the DNA extraction control protocol. The DNA extractions obtained in these preparations were subjected to PCR analysis aiming: 1) to identify hybrids coming from the breeding of 'Orlando' tangelo [*C. paradisi* Macf. x *C. reticulata* Blanco] and 'Pera' sweet orange [*C. sinensis* (L.) Osb.] through SSR (simple sequence repeat) markers; and 2) to diagnose *Xylella fastidiosa* (Wells). The performance obtained by the adapted protocols allow us to recommend the single step protocol is preferred in genotyping analyses and the SDS miniprep for DNA preparations aiming the *X. fastidiosa* diagnosis. The adapted protocols described in this work are advantageous for not requiring the use of harmful chemical compounds like phenol and chloroform and also for the quick processing time of the samples (30 min for the single step and 2 h for the SDS). They may be useful for genotype analyses and diagnosis of citrus pathogen.

Different genetic typing procedures and pathogen diagnosis have been carried out by PCR in citrus. Examples of common genotyping procedures include the identification of hybrids from nucellar seedlings using RAPD (Elisiário et al., 1999), and SSR (Ruiz et al., 2000) markers. PCR has also been used for the diagnosis of *X. fastidiosa*, a bacterium widespread in Brazilian citrus orchards that causes citrus variegated chlorosis (CVC) (Chang et al., 1993). The CTAB protocol (Murray and Thompson, 1980) commonly used for DNA extraction for PCR analysis is expensive, laborious and takes a long time, primarily when the number of samples is large.

Simplification of the procedure for DNA extraction was suggested by Deng et al. (1996) as a methodological approach to reduce the time and costs for PCR analysis. Fast protocols used in plant DNA extraction result in a lower DNA quality than the DNA obtained with the CTAB protocol, even though it allows PCR analysis with an equal efficiency (Wang et al., 1993). However, there are few fast protocols for DNA extraction from citrus, most of them being adapted SDS protocols (Deng et al., 1996; Elisiário et al., 1999). For these reasons, it is essential to develop and/or adapt cheap, more practical, and more reliable methods for DNA extraction from citrus that could be employed in PCR analyses.

The goals for this work were: 1) to adapt miniprep preparations based on single step (Thomson and Henry, 1995) and SDS (Dellaporta et al., 1983) protocols for DNA extraction from citrus; and 2) to evaluate DNA quality in PCR analyses using as models the evaluation of hybrid and nucellar seedlings, and the diagnosis of *X. fastidiosa* in sweet orange trees in the nursery.

Materials and Methods

Plant material. Two kinds of plant tissue were collected:

1) Genotyping of zygotic and nucellar seedlings; leaves were sampled from seedlings obtained by crossing 'Orlando' tangelo (*C. paradisi* Macf. x *C. reticulata* Blanco.) x 'Pera' orange [*C. sinensis* (L.) Osb.].

2) Diagnosis of *X. fastidiosa*; petioles of leaves were collected from nursery trees of 'Pera' sweet orange. The sensitivity of PCR detection was evaluated by serial dilution of the bacteria in the petioles, sampling leaves with CVC severity levels (0%, 3%, and 25%), (Fig. 1) according to the scale described by Amorim et al. (1993).

DNA extraction. Total DNA was extracted through the following methods:

1) Adaptation of a single step protocol. The extraction was carried out in one Eppendorf microtube, using the following steps: maceration of 150 mg of tissue in liquid nitrogen and addition of 250 µL of EB (100 mM Tris-HCl pH 9.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 1 M KCl, 140 mM 2-mercaptoethanol); centrifugation (12,000 g, 30 s); heating (94 °C/10 min); centrifugation (12,000 g, 3 min), and transfer of 2 µL of the aqueous phase for PCR reaction.

2) Adaptation of SDS protocol. This method used the following steps: maceration of 200 mg of tissue in liquid nitrogen and addition of 600 µL of EB (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 500 mM NaCl, 140 mM 2-mercaptoethanol, 40 µL SDS 20%); heating (65 °C/30 min); addition of 200 µL of 5 M potassium acetate; chilling (ice bath for 30 min); centrifugation (10,000 g, 30 min at 4 °C);

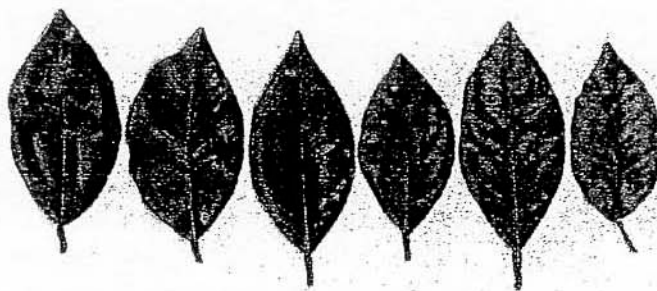


Fig. 1. Leaves displaying different levels of CVC severity Amorim et al. (1993). From left to right: 3%, 6%, 15%, 25%, 35%, and 56% (Photo by W.M.C. Nunes).



Fig. 2. DNA extracted using the single step protocol [1, 2, and 3 = lambda DNA (50, 100, and 150 ng, respectively); 4 to 10 = petioles of leaves from nursery trees of 'Pera' sweet orange; 11 to 17 = leaf of seedlings of 'Orlando' tangelo x 'Pera' orange.

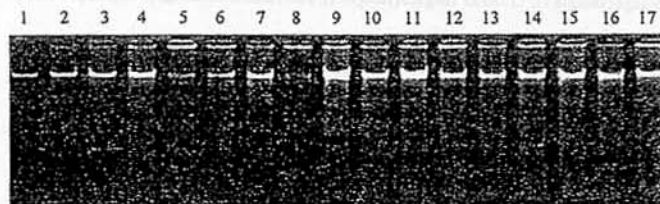


Fig. 3. DNA extracted using the SDS miniprep protocol [1, 2, and 3 = lambda DNA (50, 100, and 150 ng, respectively); 4 to 10 = petioles of leaves from nursery trees of 'Pera' sweet orange; 11 to 17 = leaf of seedlings of 'Orlando' tangelo x 'Pera' orange.

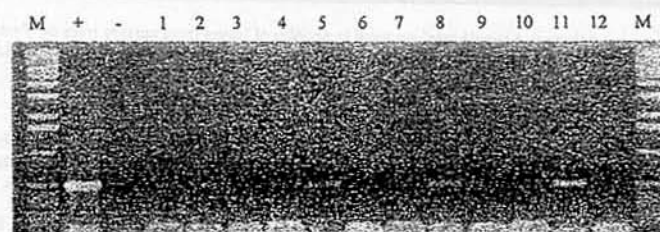


Fig. 4. Effects of maceration of petioles in extraction buffer (EB) or in liquid nitrogen (LN), and of the volume of the aqueous phase containing the DNA (1, 2, or 0.5 μ L) in the detection of *X. fastidiosa* by PCR. (M = 1 kb DNA ladder; + = positive control; - = negative control; 1, 2, and 3 = 3% CVC, EB, 1, 2 and 0.5 μ L; 4, 5 and 6 = 3% CVC, LN, 1, 2, and 0.5 μ L; 7, 8, and 9 = 25% CVC, EB, 1, 2 and 0.5 μ L; 10, 11 and 12 = 25% CVC, LN, 1, 2, and 0.5 μ L, respectively.

transfer of 400 μ L of the supernatant to another microtube and addition of 400 μ L of ice cold-propanol; centrifugation (10,000 g /20 min); wash of the pellet (80% Ethanol); addition of 20 μ L of TE 1/10 Rnase (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0) under heating (65 $^{\circ}$ C/10 min); and dilution by adding 80 μ L of TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0).

3) CTAB extraction. Protocol control method for the DNA extraction based on modifications in the extraction methodology as described by Murray and Thompson (1980) according to Machado et al. (1996).

PCR analyses. Two types of PCR analyses were accomplished:

1) Genotyping of zygotic and nucellar seedlings. PCR was carried out in a 25 μ L volume using the CCSM-11 primer (Cristofani et al., 1998) for detection of SSR. For the samples obtained with the CTAB and SDS methods, the mix reaction was 100 mM Tris-HCl pH 8.3; 500 mM KCl; 25 mM $MgCl_2$; 0.01% gelatin; 200 μ M dNTPs; 8 pmol primers (Forward: TAGAAGCTGTCTTGATGT and Reverse: ATCTAGTGTCACTGAACCAA); 50 ng DNA and 1.5 U *Taq* DNA polymerase. For the single step DNA protocol, the mix used was 10 mM Tris-HCl pH 8.3; 3.5 mM $MgCl_2$; 200 μ M dNTPs; 50 ng primers; 2 U *Taq* DNA polymerase; 2 μ L of template DNA (10-20 ng/ μ L), and glycerol 10%. The reactions were subjected to 32 cycles of 1 min at 94 $^{\circ}$ C, 30 s at 55 $^{\circ}$ C and 1 min at 72 $^{\circ}$ C, preceded by initial denaturation for 5 min at 94 $^{\circ}$ C and succeeded by 4 min at 72 $^{\circ}$ C, as described by Kijas et al. (1995).

2) *X. fastidiosa* diagnosis. PCR was carried out in a total volume of 25 μ L using 20 ng of the CVC-1 and 272-2-int primers (Pooler and Hartung, 1995). The mix constitution of the reaction was identical to the reactions described previously. The reactions were subjected to 30

cycles of 1 min at 94 $^{\circ}$ C, 1 min at 55 $^{\circ}$ C and 2 min at 72 $^{\circ}$ C, followed by 10 min at 72 $^{\circ}$ C as described by Pooler and Hartung (1995).

Electrophoresis. Loaded in agarose gels 0.8%, 1.5%, and 3.5% (wt/vol) were 2, 7, and 8 μ L aliquots were, prepared with 0.5 ng $\cdot$ mL $^{-1}$ ethidium bromide for quantification of DNA and visualization of the amplicon of *X. fastidiosa* (507 bp) and the SSR alleles, respectively.

Results and Discussion

DNA Extraction. The adapted protocols resulted in a fast and efficient DNA extraction. The amount of DNA obtained with these protocols ranged from 0.06 to 0.13 ng $\cdot$ mg $^{-1}$ of tissue for the single step protocol, and between 0.25 to 1.25 ng $\cdot$ mg $^{-1}$ of tissue for the SDS protocol, (Figs. 2 and 3, respectively).

The following methodological adjustments were necessary in the single step protocol originally described by Thomson and Henry (1995):

- 1) maceration of the tissue in of liquid nitrogen (1.5-mL Eppendorf tube, using a drill);
- 2) addition of 140 mM 2-mercaptoethanol to the EB buffer;
- 3) centrifugation before (12000 g /30 s) and after (12000 g /3 min) the heating the samples;
- 4) transfer of 2 μ L of the aqueous phase to the PCR reaction; and
- 5) increase in the amount of *Taq* DNA polymerase (1.5 to 2U) in the reaction.

The effects of the maceration of the petioles in the EB or liquid nitrogen, and the volume of the aqueous phase containing the DNA added to the reaction (0.5, 1 or 2 μ L) in the synthesis of the 507 bp

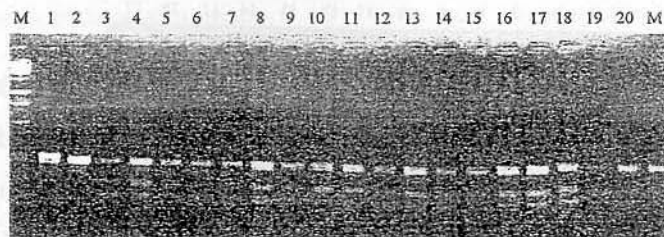


Fig. 5. Amplification pattern of SSR alleles obtained by PCR with the CCSM-11 primer (Forward: TAGAAGCTGTCCTTGTGATGT and Reverse: ATCTAGTGTCACTGAACCAA) in 'Pera' orange (sample 1), 'Orlando' tangelo (sample 2); and nucellar seedlings (samples 3-20) acquired from their hybrids. M = 1kb DNA ladder.

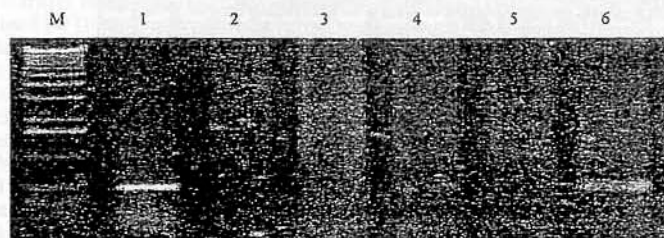


Fig. 6. Detection of *X. fastidiosa* DNA by PCR extracted through a 'single step' protocol in petioles of leaves from nursery trees of 'Pera' sweet orange with or without CVC. M = 1kb DNA ladder; 1 = positive control; 2 = negative control; 3 and 5 = asymptomatic leaves; 4 and 6 = leaves displaying 3% CVC symptoms.

amplicon are shown in (Fig. 4). The maceration of the tissue in liquid nitrogen, and the use of 2 μ L of the aqueous phase to the PCR reaction results in stronger signals.

Two important methodological adjustments were necessary in the SDS protocol originally described by Dellaporta et al. (1983): 1) addition of 140 mM 2-mercaptoethanol to the EB to prevent phenol oxidation; and 2) dilution of the DNA solutions in TE (1:5) for greater reproducibility in PCR analyses (data not shown). Protocols based on SDS show a lower capability of protein and polysaccharide removal (Deng et al., 1996). One possibility is that polysaccharides could be co-isolated in the preparation and, in high concentration, they become inhibitory for *Taq* DNA polymerase (Shiod and Marakami-Muofushi, 1987).

Genotyping of zygotic and nucellar seedlings. Both adapted protocols resulted in DNA of quality that allowed genotyping of hybrid and nucellar seedlings identical to that obtained from DNA extracted by the CTAB protocol. The pattern of SSR alleles starting from extracted DNA by the single step protocol is shown in (Fig. 5).

***X. fastidiosa* diagnosis.** The adapted SDS protocol resulted in DNA of quality that allowed identical sensitivity of detection of *X. fastidiosa* compared with the CTAB protocol. However, the sensitivity for the *X. fastidiosa* diagnosis by PCR starting from extracted DNA by the single step protocol was less (at least 3% of leaf symptoms) than the CTAB and modified SDS protocols (detection of the bacteria even in asymptomatic leaves) (Fig. 6).

These miniprep adaptations for citrus DNA extraction are advantageous in that they do not require the use of toxic compounds like phenol and chloroform, and have a quick sample processing time (30 min for the single step and 2 h for the miniprep). The performance obtained with the adapted protocols allows indicates the single step protocol in genotype analyses is faster than the SDS analysis. The SDS miniprep is preferred for DNA preparations used in *X. fastidiosa* diagnosis because of the identical sensitivity compared to the CTAB method. Since the primer's length is an important factor for the PCR success with impure DNA (Deng et al., 1996), the use of these protocols could be recommended for genotype analyses and pathogen diagnosis by PCR using long primers.

Literature Cited

- Amorim, L., A. Bergamin Filho, D.A. Palazzo, R.B. Bassanezi, C.V. Godoy, and G.A.M. Torres. 1993. Clorose Variegada dos Citros: Uma escala diagramática para avaliação da severidade da doença. Fitopatologia Brasileira 18:174-80.
- Chang, C.J., M. Garnier, L. Zreik, V. Rossetti, and J.M. Bové. 1993. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. Current Microbiol. 27:137-142.
- Cristofani, M., R.V. Brondani, V.M. Novelli, and M.A. Machado. 1998. Desenvolvimento de marcadores microsatélites para análise genética em citros. Genet. Mol. Biol. 21:222 (Abstr.).
- Dellaporta, S.L., J. Woods, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. Plant Mol. Biol. Rpt. 1:19-21.
- Deng, Z., S. Huang, and F.G. Gmitter, Jr. 1996. Simple and quick procedure for preparing *Citrus* genomic DNA for PCR analysis. Proc. Intl. Soc. Citricult.:841-844.
- Elisiário, P.J., E.M. Justo, and J.M. Leitão. 1999. Identification of mandarin hybrids by isozyme and RAPD analysis. Scientia Hort. 81:287-299.
- Kijas, J.M.H., J.C.S. Fowler, and M.R. Thomas. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. Genome. 38:349-355.
- Machado, M.A., H.D. Colleta Filho, M.L.P.N. Targon, and J. Pompeu, Jr. 1996. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. Euphytica. 92:321-326.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321-4325.
- Pooler, M.R. and J.S. Hartung. 1995. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. Current Microbiol. 31:377-381.
- Ruiz, C., M.P. Breto, and M.J. Asins. 2000. A quick methodology to identify seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. Euphytica. 112:89-94.
- Shioda, M. and K. Marakami-Muofushi. 1987. Selective inhibition of DNA polymerase by a polysaccharide purified from slime of *Phisarium polycephalum*. Biochem. and Biophys. Res. Commun. 146:61-66.
- Thomson, D. and R. Henry. 1995. Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. Biotech. 19:392-400.
- Wang, H., M. Qi, and A.J. Cutler. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Res. 21:4153-4154.

Capítulo 5

Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by Real-Time Polymerase Chain Reaction assay.

Autoria: OLIVEIRA, A. C.; VALLIM, M. A.; PIZETTA-SEMIGHINI, C.; ARAÚJO, W. L.; GOLDMAN, G. H. & MACHADO, M. A.

Periódico: *Phytopathology* (USA) 92(10):1048-1054 (2002).

Quantification of *Xylella fastidiosa* from Citrus Trees by Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay

Antonio C. Oliveira, Marcelo A. Vallim,
Camile P. Semighini, Wellington L. Araújo, Gustavo H. Goldman, and Marcos A. Machado

First author: Depto de Genética e Evolução, UNICAMP, C.P. 6109 C.E.P. 13081-970 Campinas, Brazil; second, third, and fifth authors: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, C.E.P. 14040-903 Ribeirão Preto, Brazil; fourth author: Depto de Genética, ESALQ-USP, C.P. 83 C.E.P. 13400-970 Piracicaba, Brazil; and sixth author: Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, C.P. 04 C.E.P. 13490-000 Cordeirópolis, Brazil.
Accepted for publication 12 April 2002.

ABSTRACT

Oliveira, A. C., Vallim, M. A., Semighini, C. P., Araújo, W. L., Goldman, G. H., and Machado, M. A. 2002. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 92:1048-1054.

Xylella fastidiosa is the causal agent of citrus variegated chlorosis (CVC), a destructive disease of sweet orange cultivars in Brazil. Polymerase chain reaction (PCR)-based assays constitute the principal diagnostic method for detection of these bacteria. In this work, we established a real-time quantitative PCR (QPCR) assay to quantify *X. fastidiosa* in naturally and artificially infected citrus. The *X. fastidiosa* cell number detected in the leaves increased according to the age of the leaf, and

bacteria were not detected in the upper midrib section in young leaves, indicating temporal and spatial distribution patterns of bacteria, respectively. In addition, the *X. fastidiosa* cell number quantified in leaves of 'Pera' orange and 'Murcott' tanger reflected the susceptible and resistant status of these citrus cultivars. None of the 12 endophytic citrus bacteria or the four strains of *X. fastidiosa* nonpathogenic to citrus that were tested showed an increase in the fluorescence signal during QPCR. In contrast, all 10 CVC-causing strains exhibited an increase in fluorescence signal, thus indicating the specificity of this QPCR assay. Our QPCR provides a powerful tool for studies of different aspects of the *Xylella*-citrus interactions, and can be incorporated into breeding programs in order to select CVC-resistant plants more quickly.

Xylella fastidiosa is a gram-negative, nonflagellate, xylem-limited bacterial pathogen, measuring 0.1 to 0.3 × 1.5 µm (52). This bacterium belongs to the family *Lysobacteriaceae*, and it was the first plant pathogen to have its genome completely sequenced (48). Pathotypes of *X. fastidiosa* cause a wide range of diseases in many agriculturally important plants, including alfalfa, almond, grapevine, lucerne, peach, and plum, and in several noneconomically important plants (21,52). Chang et al. (7) definitively associated a strain of *X. fastidiosa* with citrus variegated chlorosis (CVC), a destructive disease of all commercial sweet orange cultivars (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). CVC is considered the main problem faced by Brazilian citriculture and most sweet orange cultivars are susceptible to it (27). CVC's symptoms include mottled variegations on older leaves, with chlorotic areas on the upper side and corresponding light-brown lesions on the lower side. The fruits from the affected trees are small, exhibiting early ripening, and, therefore, having no commercial value (10). In Brazil, 34% of the citrus trees are affected by CVC, indicating the alarming spread of the disease in the field (14). *X. fastidiosa* is vectored by at least 11 sucking insects that feed on xylem-sap, such as sharpshooter leafhoppers (*Homoptera*, *Cicadellidae*) (14). Transmission also can occur through grafting in commercial nurseries (10).

The symptoms of plant bacterial diseases are not always reliable for diagnosis because they can vary according to environmental conditions (43). Limiting an outbreak of CVC requires a sensitive diagnostic procedure to prevent the spreading of *X.*

fastidiosa into mother plants and budwoods. Thus, diagnostic methods that allow the early detection of bacteria in symptomless citrus trees were developed, including microscopy analysis (6), serological tests such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), dot immunobinding assay (DIBA), western blotting (7, 20,25,32), immunofluorescence (35), and polymerase chain reaction (PCR)-based assays (4,12,17,34,42). So far, the PCR-based method is considered the quickest and most efficient method of detecting *X. fastidiosa* in symptomless CVC-infected trees (4), and has been used routinely for this purpose. The PCR-based method described by Pooler and Hartung (42) is useful for detecting only CVC-causing strains, and allows the detection of 10 to 100 bacteria per amplification reaction. However, this PCR approach provides only qualitative detection.

Competitive PCR-based quantification of plant pathogenic fungi in infected plants has been reported (36,39,47). Hyman et al. (23) described the first PCR-based quantitative method for a bacterial plant pathogen, which was *Erwinia carotovora* on potato tubers. However, the competitive PCR method is labor intensive and has a high risk of carryover contamination (9). Recent developments in PCR technology have improved the quantification of phytopathogenic bacteria. The 5'-nuclease quantitative PCR assay (18) represents a significant advance for measuring input target nucleic acid templates quantitatively. The principle of this real-time PCR has been described elsewhere (18,28,41). Briefly, this method requires the inclusion in the reaction mix of a dual-labeled fluorescent nonextendable probe that anneals specifically to the target DNA between the forward and reverse primer sites (18). The fluorescent emission from the sample occurs because the reporter fluorophore is released due to the endogenous 5'-3' exonuclease activity of the DNA polymerase. Unlike other quantitative PCR methods, such as competitive PCR, the 5'-nuclease quantitative PCR assay (i) does not require post-PCR sample handling, thus

Corresponding author: M. A. Machado
E-mail address: marcos@centrodecitricultura.br

Publication no. P-2002-0816-02P
© 2002 The American Phytopathological Society

1048 PHYTOPATHOLOGY

preventing potential PCR product carry-over contamination; (ii) is less labor intensive, and (iii) does not have a plateau effect because the assay is not based on an endpoint measurement (18).

A real-time quantitative PCR (QPCR) assay for *X. fastidiosa* using the 5'-nuclease PCR was assessed in assays designed to (i) examine temporal and spatial distributions of the bacterium in xylem vessels of experimentally infected citrus leaves and (ii) evaluate the differential multiplication of *X. fastidiosa* in xylem vessels of leaves from CVC-resistant and -susceptible cultivars of citrus and their hybrids. We were able to quantify *X. fastidiosa* and determine temporal and spatial patterns of translocation and differential accumulation of the bacterium in inoculated citrus cultivars.

MATERIALS AND METHODS

***X. fastidiosa* culture and DNA extraction.** *X. fastidiosa* strain 9a5c, whose complete genome has been sequenced (48), was grown on supplemented periwinkle wilt-agar medium (16) at 28°C and subcultured every 14 days. Bacterial cells were used for the establishment of standard curves and the artificial infection of citrus trees. Dilution plating on buffered charcoal yeast extract (10 10-fold dilutions) as described by Wells et al. (53) was used to estimate the number of viable bacterial cells (CFU).

In order to extract DNA under conditions similar to those encountered in field samples, we mixed a bacterial suspension containing 1.63×10^6 CFU of *X. fastidiosa* with 150 mg of a freeze-ground xylem tissue from leaves of a healthy Pera sweet orange tree, then performed the extraction of DNA on the cell-spiked material as described by Murray and Thompson (38) and modified by Machado et al. (31). The DNA resulting from the extraction process was resuspended in 15 µl of Tris-HCl, 1 mM, pH 7.5, and EDTA, 0.1 mM, pH 8.00, and the concentration was adjusted to 100 ng/µl, so that each microliter contained the amount of DNA found in 1.09×10^5 CFU of *X. fastidiosa*. DNA concentration and purity were assessed by comparison with known DNA standards in an ethidium bromide-stained 1% agarose gel (45) and by spectrophotometry at 260 nm. The mixture of *X. fastidiosa* and citrus genomic DNA was stored at -20°C.

Real-time QPCR primers and probe. The *X. fastidiosa* nucleotide sequence used for the design of the primers and TaqMan probe was first described by Pooler and Hartung (42) (GenBank Accession No. AE003946). The sequence for the forward primer CVC-1 (5'-AGA TGA AAA CAA TCA TGC AAA-3'; 424-404 bp) was obtained from Pooler and Hartung (42), and the reverse primer CCSM-1 (5'-GCG CAT GCC AAG TCC ATA TTT-3'; 306-286 bp) was designed for this work based on the target sequence. The TaqMan probe TAQCVC (5'-(6FAM)AAC CGC AGC AGA AGC CGC TCA TC(TAMRA)p-3'; 335-313 bp) also was designed based on the target sequence and carries a fluorescent reporter dye (6-carboxy-fluorescein, $\lambda_{em} = 518$) added to the 5' end and a fluorescent quencher dye (6-carboxytetramethylrhodamine, $\lambda_{em} = 582$) and a phosphate group (p) added to the 3' end. Both primers and the TAQCVC probe were synthesized by Applied Biosystems (Foster City, CA). The CCSM-1 primer and the probe were designed using the Primer Express software (version 3.1; Applied Biosystems).

Real-time QPCR assay reaction conditions. The amplification was performed in a 25-µl reaction. The reaction mix was slightly modified from that given in the ABI PRISM 7700 User's Manual: 12.5 µl of TaqMan Universal PCR Master Mix, 525 nM of each primer (CVC-1 and CCSM-1), 500 nM TAQCVC probe, and the different DNA concentrations used throughout this work. The master mix contained a passive reference dye, ROX, which is used to standardize the reaction (18). In all experiments, appropriate negative controls containing no template DNA were subjected to the same procedure. Each sample was tested in triplicate. For amplification, the recommended universal thermal cycler pro-

cedure was used: a 50°C hold for 2 min (uracil-N-glycosylase [UNG] digestion, in an effort to prevent PCR product carryover), a 95°C hold for 10 min (activation of AmpliTaq Gold DNA polymerase and denaturation of UNG and the matrix DNA), and then 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C (annealing and polymerization steps were combined). Applied Biosystems supplied all consumables. Amplification and data analysis were carried out in an ABI PRISM 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems). Data were analyzed using the Sequence Detector Software 1.6 software as described by the manufacturer. All reactions were analyzed by agarose gel electrophoresis to confirm that only the expected PCR product was amplified.

Real-time QPCR of *X. fastidiosa* from artificially infected citrus. Eight trees each of 'Pera' sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) and 'Murcott' tangor (*Citrus reticulata* Blanco $\times$ *C. sinensis* (L.) Osbeck) cultivars and one plant of each of the hybrids H-19, H-31, H-55, H-61, H-80, H-129, H-214, and H-243 (belonging to the Germoplasm Active Bank of the Sylvio Moreira Citriculture Center, Agronomic Institute of Campinas, Cordeirópolis, SP, Brazil) were artificially infected with 20 µl of a suspension containing *X. fastidiosa* strain 9a5c at 10^8 cells per ml in PBS (sodium phosphate 100 mM; NaCl 0.85%). Artificial infection was carried out by injecting a droplet of the bacterial suspension into the xylem using a fine needle as described by Hill and Purcell (20). Control plants were inoculated with sterile PBS saline solution. In addition, five 'Pera' sweet orange trees were artificially infected by grafting as described by Medina et al. (33). In summary, the CVC-symptomatic branch of 'Valencia' sweet orange (*C. sinensis* (L.) Osb.) was grafted onto a 'Rangpur' lime rootstock (*C. limonia* L.). The resulting grafted plants were subsequently grafted onto the rootstock (Rangpur lime) of healthy Pera plants. The control plants were grafted only with the CVC-free Rangpur lime.

DNA from xylem tissue used for QPCR assays was extracted from three sections of infected leaves as follows: (i) petioles collected from 'Murcott' tangor, 'Pera' sweet orange, and the eight hybrids, 5 months after the artificial inoculation; (ii) petioles plus the initial two-thirds of the midrib; and (iii) the final one-third of the midrib. Samples ii and iii were collected from leaves of three different ages: 2- and 8-month-old leaves (symptomless samples), and 12-month-old leaves (symptomatic samples), from 'Pera' sweet orange trees infected with *X. fastidiosa* by grafting. Sample number i was obtained from 16 leaves. Samples ii and iii were collected from 16 leaves, previously inoculated with *X. fastidiosa*. Each sample type was ground in liquid nitrogen until a fine powder was obtained. DNA was extracted from 150 mg of the ground samples according to a method modified by Machado et al. (31). The concentration of each DNA sample was adjusted to 100 ng/µl and its purity was determined as described previously (45). Each DNA sample was tested in triplicate in QPCR assays.

The number of *X. fastidiosa* cells in each sample was estimated from a standard curve constructed by plotting the mean C_T values (cycle threshold, calculated as the first cycle PCR at which a statistically significant increase in the reporter fluorescence can first be detected) for each template DNA dilution (y axis) against the $\log_{10}$ of the initial quantity of template DNA (x axis) for each run.

RESULTS

Specificity of *X. fastidiosa* real-time QPCR assay. Pooler and Hartung (42) found a DNA sequence specific for CVC-causing strains of *X. fastidiosa*. An extensive search of the GenBank database indicated that this DNA sequence (GenBank Accession No. AE003946) (i) shared no significant identity with other known nucleotide sequences; (ii) encodes a hypothetical protein, according to the GenBank Accession No. NC_002488-1; and (iii) constitutes a unique genomic region, without repetitions in the genome of the CVC-causing strain 9a5c of *X. fastidiosa* (48). The TAQCVC

probe and CCSM-1 reverse primer were designed based on this region's sequence. There is only a single copy of this DNA sequence in *X. fastidiosa* strain 9a5c; therefore, there should be only one template per cell. Known amounts of *X. fastidiosa* genomic DNA corresponding to *X. fastidiosa* populations from 1.09×10^0 to 1.09×10^5 CFU were used in the construction of standard curves. In this assay, an increase in fluorescent signal above a preset threshold within 40 PCR cycles was considered positive (i.e., $C_T < 40$). The amplification plot (fluorescent emission for each reaction versus the number of PCR cycles) and a standard curve from these data are shown in Figure 1A and B, respectively. With increasing amounts of *X. fastidiosa* genomic DNA the respective C_T values ranged from 21.97 to 39.71 (Fig. 1A). Under the PCR conditions tested, the standard curve obtained was linear over five orders of magnitude, from 10.9 to 109,000 initial copies of template DNA per reaction, with the corresponding linear regression coefficient of $r^2 = 0.967$ [$y = -3.7887x \ln(X. fastidiosa \text{ genomic DNA copy number}) + 41.901$] (Fig. 1B). The PCR-amplification produced a single expected band of 137 bp as confirmed by gel electrophoresis. After 40 rounds of amplification, no PCR products were detected in any of the negative control samples that contained all reagents except the *X. fastidiosa* genomic DNA (data not shown).

The reliability and reproducibility of the real-time QPCR assays also were assessed. According to Locatelli et al. (30), the standard curves for QPCR require high repeatability (when repeated measurements are taken with the same material in a single assay) and reproducibility (repeated measurements are taken in different assays). The *X. fastidiosa* real-time QPCR appeared to be highly reproducible, because the coefficient of variation (CV) ranged from 0.54 to 1.98% in intraassay variability and 0.81 to 2.51% in interassay measurements (Table 1). No statistical difference was found between the intraassay and interassay CV ($P > 0.29$, t test) determined from three standard curves performed on different days and starting from new dilutions of the DNA mixture citrus-*X. fastidiosa*. Standard curves revealed high precision and reproducibility, as indicated by correlation coefficients no lower than $r = 0.993$.

The specificity of the *X. fastidiosa* real-time QPCR assay was tested using genomic DNA from 12 citrus endophytic bacteria, four strains of *X. fastidiosa* responsible for causing disease on other plants, and 9 other CVC-causing strains of *X. fastidiosa* isolated from a wide range of citrus cultivars and from a number of different geographical locations (2,3) (Table 2). Neither the endophytic bacteria nor the strains of *X. fastidiosa* associated with diseases of other plants showed an increase in fluorescence signal

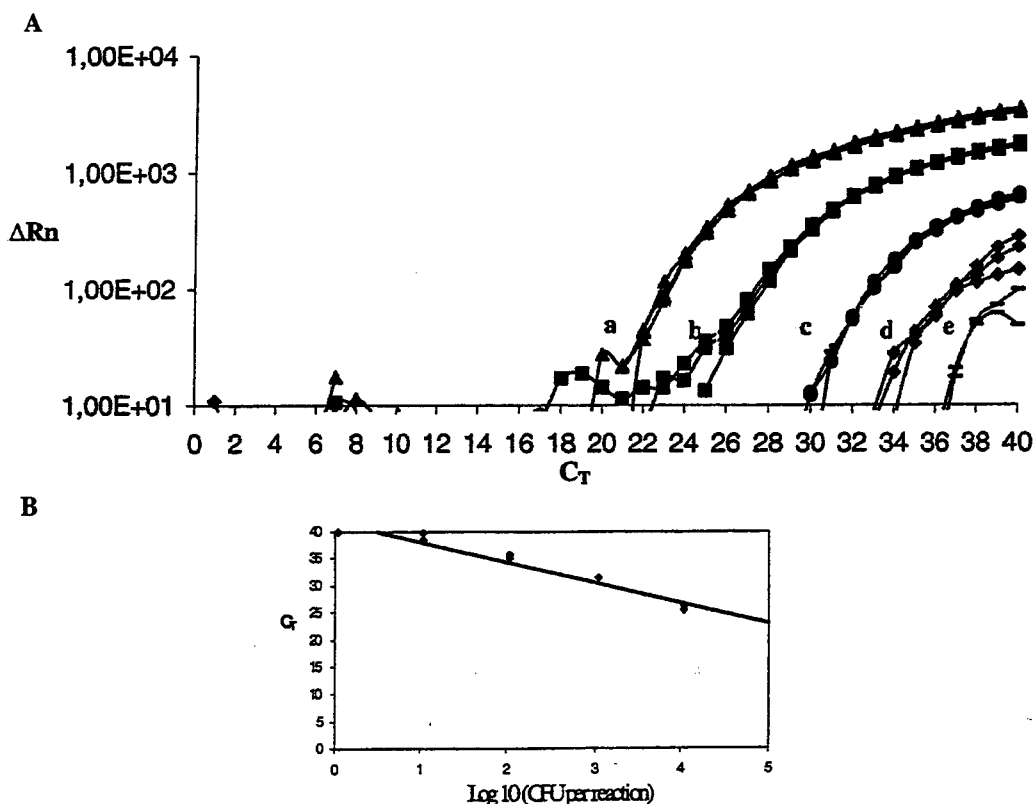


Fig. 1. Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) of CFU of *Xylella fastidiosa* using the CVC-1 and CCSM-1 primers and TAQCVC fluorescence probe. A, Amplification plot of the *X. fastidiosa* standards. Amplification plot of normalized fluorescence intensity change (ΔR_n) versus PCR cycle number. The y axis (ΔR_n) is plotted in log scale. The experiment, done in triplicate, consisted of serial 10-fold dilutions of *X. fastidiosa* genomic DNA, corresponding to 1.09×10^0 to 1.09×10^5 CFU of *X. fastidiosa*, which were used in the construction of standard curves. This is a computerized evaluation of the data obtained using the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. The x axis indicates the PCR cycle, where a, b, c, d, and e are samples with 1.09×10^5 to 1.09×10^1 copies of *X. fastidiosa* genomic DNA, respectively. Fluorescence emission for samples with 1.09×10^0 copies of *X. fastidiosa* genomic DNA was not recorded ($C_T \geq 40$). B, *X. fastidiosa* standard curve. C_T values are plotted against the log number of *X. fastidiosa* cells in samples of 10-fold dilutions of template DNA. The straight line is calculated by linear regression ($y = -3.7887x \ln(\text{number of DNA copies}) + 41.901$). The linear regression coefficient (r^2) is 0.9678. A C_T value is defined as the PCR cycle where the increase in fluorescence first goes above the baseline. Each point on the curve represents the mean value from three separate PCR amplifications for each dilution.

during PCR ($\Delta R_n < 0.2$ after 40 cycles of amplification; data not shown), indicating the lack of target DNA for the CVC-1 and CCSM-1 primer set. In contrast, all CVC-causing strains exhibited the expected 137-bp band.

Detection and quantification of *X. fastidiosa* from artificially infected citrus. We decided to use the 5'-nuclease PCR assay to evaluate the movement of the bacterium into vessels of the xylem and its differential multiplication in leaves of CVC-resistant and -susceptible cultivars of citrus. The number of *X. fastidiosa* cells present in citrus tissue samples was calculated by extrapolating the mean C_T value for the test sample into the standard curve generated with *X. fastidiosa* cells. The number of *X. fastidiosa* cells detected in different xylem regions of 2- and 8-month-old (symptomless), and 12-month-old (symptomatic) leaves of 'Pera' sweet orange are presented in Figure 2. The mean number of *X. fastidiosa* cells detected in the leaf xylem ranged from 0 to 324 *X. fastidiosa* cells per mg of tissue. Bacterial populations increased according to the age of the leaf as described by the linear regression $y = -140.34 \times \ln(X. fastidiosa \text{ genomic DNA copy number}) + 113.73$ ($r^2 = 0.95$), therefore suggesting a temporal accumulation of *X. fastidiosa* in citrus leaf xylem as leaves get older.

X. fastidiosa cells were detected in all samples from petioles plus the initial two-thirds of the midrib regardless of their age. In contrast, cells of *X. fastidiosa* were detected only in samples from the upper section of the midrib from 8- and 12-month-old leaves (Fig. 2). These results indicate a spatial distribution of *X. fasti-*

osa in the xylem of citrus leaves (i.e., movement of the bacterium from the petiole to the upper midrib).

The number of *X. fastidiosa* cells detected in the leaf petioles of 'Murcott' tangor, 'Pera' sweet orange, and the eight hybrids are presented in Figure 3. The number of cells varied from 0 to 487 *X. fastidiosa* cells per mg of tissue. Pera sweet orange, very susceptible to CVC (24), had 109.2 and 487 *X. fastidiosa* cells per mg of tissue when infected by the needle procedure and natural inoculation, respectively. The bacterium was not detected in 'Murcott' tangor, a resistant-citrus cultivar ($C_T \geq 40$) (Fig. 3).

DISCUSSION

CVC is a destructive citrus disease in Brazil (26). This article describes the development of a simple, rapid, and reproducible real-time QPCR-based assay for *X. fastidiosa* detection and its

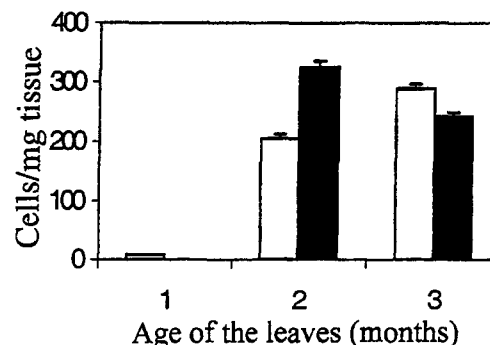


Fig. 2. Temporal-spatial distribution of *Xylella fastidiosa* cells in leaves of 'Pera' sweet orange quantified by real-time quantitative polymerase chain reaction. The x axis indicates the age of the leaves: 1 = 2 months old, 2 = 8 months old, and 3 = 12 months old. Vertical columns in white and black indicate the number of *X. fastidiosa* cells detected in the petioles plus the initial two-thirds of the midrib and in the upper section of the midrib, respectively. Each sample was tested in triplicate. Vertical bars represent standard errors.

TABLE 1. Coefficient of variation (%) of the standard curves for *Xylella fastidiosa* quantification by real-time quantitative polymerase chain reaction^a

Input DNA copy number	Intraassay	Interassay
1.09×10^5	0.54	0.96
1.09×10^4	1.71	1.73
1.09×10^3	0.3	0.81
1.09×10^2	1	2.51
1.09×10^1	1.98	2.09
1.09×10^0	... ^b	... ^b

^a Intraassay and interassay variability were estimated by computing the coefficient of variation (ratio between the standard deviation and the mean of repeated measurements).

^b No fluorescence above threshold was recorded ($C_T \geq 40$).

TABLE 2. Endophytic citrus bacterial strains and other strains of *Xylella fastidiosa* used in this study

Identification	Species or strain	Host	Geographic source	QPCR assay result ^a
PF4/9	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Citrus reticulata</i>	Frutal/SP	-
PR1.5/8	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>C. reticulata</i>	Novais/SP	-
PF1/2	<i>E. cloacae</i>	<i>C. reticulata</i>	Novais/SP	-
CT 03	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Citrange</i>	Cordeirópolis/SP	-
PF1/8	<i>E. cloacae</i>	<i>C. reticulata</i>	Novais/SP	-
ER1.6/4	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	<i>C. sinensis</i>	Novais/SP	-
SR1.6/17	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	<i>C. sinensis</i>	Novais/SP	-
SR5/3	<i>M. fujisawaense</i>	<i>C. sinensis</i>	Colina/SP	-
TS49	<i>P. agglomerans</i>	<i>C. sunki</i>	Cordeirópolis/SP	-
CT04	<i>Alcaligenes</i> sp.	<i>P. trifoliata</i>	Cordeirópolis/SP	-
ER2/3	<i>E. cloacae</i>	<i>C. sinensis</i>	Elisiário/SP	-
LD29	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>C. sinensis</i>	Cordeirópolis/SP	-
11347	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>C. sinensis</i>	Paraná	+
11067	<i>X. fastidiosa</i>	<i>C. sinensis</i>	Paraná	+
11834	<i>X. fastidiosa</i>	<i>C. sinensis</i>	Paraná	+
11380	<i>X. fastidiosa</i>	<i>C. sinensis</i>	Santa Catarina	+
11067	<i>X. fastidiosa</i>	<i>C. sinensis</i>	Londrina/PR	+
11775	<i>X. fastidiosa</i>	<i>C. sinensis</i>	Rio Grande do Sul	+
M2-1	<i>X. fastidiosa</i>	<i>C. sinensis</i>	Matão/SP	+
Ita D	<i>X. fastidiosa</i>	<i>C. sinensis</i>	Itapetininga/SP	+
SL4	<i>X. fastidiosa</i>	<i>C. sinensis</i>	Sete Lagoas/MG	+
8935	<i>X. fastidiosa</i>	Grape	Paraná	-
12319	<i>X. fastidiosa</i>	Periwinkle	Botucatu/SP	-
9746	<i>X. fastidiosa</i>	Plum	Ponta Grossa/PR	-
C13	<i>X. fastidiosa</i>	Coffee	Cordeirópolis/SP	-

^a Absence and presence of signal in the real-time quantitative polymerase chain reaction (QPCR) assay are indicated by - and +, respectively.

successful use for quantification of the bacterial cells in citrus tissues. In phytopathological studies, real-time QPCR has been employed to quantify virus (11,37,44,46), fungi (5,55), and bacteria (51). To our knowledge, this is the first report of a quantitative PCR detection method for xylem-limited bacteria, as well as the first report of quantification of a citrus pathogen using the 5'-nuclease PCR assay. Ubiquitous pathogens such as *X. fastidiosa* are present in healthy plants and often survive in the host tissue without inducing symptoms (19). The increased accuracy of detection and quantification obtained with this QPCR assay should facilitate studies of how these pathogens multiply and move in plant tissue (1).

We were able to quantify *X. fastidiosa* from serial dilutions over 5 log units (1.09×10^1 to 1.09×10^5 CFU) showing a strong linear relationship between the log of the starting CFU number and the C_T value. The lack of amplification products or fluorescent signal in reactions containing genomic DNA of bacteria other than CVC-causing strains of *X. fastidiosa* confirmed the specificity of this QPCR assay.

According to Pooler and Hartung (42), the PCR-based method for diagnosis of CVC-causing *X. fastidiosa* strains allows detection of as few as 10 to 100 bacteria per amplification reaction. The genomic content of a citrus cell is ≈ 0.6 pg/haploid DNA (15) and the real-time QPCR assay can detect 10 copies of *X. fastidiosa* DNA in citrus DNA at 15 ng/ μ l; therefore, the lower limit of detection of this assay is 1 bacterium in 1,250 citrus cells or 2.47 fg of bacterial DNA in 1.5 ng citrus DNA. This level of detection already has been reported for *Campylobacter jejuni* (54) and *Phytophthora infestans* (5).

The quantification of *X. fastidiosa* in the xylem of 'Pera' sweet orange leaves of different ages indicated that the *X. fastidiosa* concentration is closely associated with the progress of the CVC infection. These results agree with a study in which Machado et al. (32) showed a higher concentration of bacteria in old leaves infected with CVC by western blotting. Fry and Milholland (13) and Hopkins (21) observed that the intensity of symptoms of Pierce's disease on grape in response to infection by *X. fastidiosa* is related to the bacterial concentration.

In addition, Nunes (40) observed that, during the summer, sweet orange cultivars had high, severe CVC symptoms on leaves formed the previous spring. Our real-time QPCR supports this observation, indicating that bacterial colonization had possibly occurred initially in the xylem of symptomless young leaves formed during the spring followed by an increase in the population over time

and, consequently, causing the appearance of foliar symptoms during the summer.

The quantification of *X. fastidiosa* throughout the xylem of 'Pera' sweet orange leaves suggested a pattern of spatial distribution of these bacteria. When the leaves were just 2 months old, the bacteria had not reached the upper midrib ($C_T \geq 40$). By the time they were 8 and 12 months old, bacteria were now present in the xylem region (324 and 242 *X. fastidiosa* cells per mg of tissue, respectively). Taking into consideration that the trees used in this work were artificially inoculated through grafting and kept in a sharpshooter-free greenhouse, the colonization of new leaves was caused only by bacteria initially present on those plants. Later on, bacteria moved to petioles, progressively colonizing the midrib until they reached the upper midrib. These results are in agreement with those of Fry and Milholland (13), who observed that the *X. fastidiosa* FC strain first colonized grape leaves closest to the inoculation point. Until now, systemic distribution of CVC-causing strains of *X. fastidiosa* had been determined only through conventional PCR in the roots (29), stems, and branches (8) of citrus plants. The TaqMan quantitative PCR assay also has been used to study the spatial distribution of the fish pathogen *Pseudomonas plecoglossicida* in tissues of fish (49) and for planktonic microbial groups (50).

Quantification of *X. fastidiosa* cells in petioles of 'Pera' sweet orange leaves (109.2 and 487 *X. fastidiosa* cells per mg of tissue) and 'Murcott' tanger (none) determined by our real-time QPCR assay confirmed the susceptible and resistant status of these citrus cultivars (24). Hopkins (22) pointed out that the ability of *X. fastidiosa* strains to move through xylem vessels is indicative of their pathogenicity. Our results are in agreement with previously published data where the multiplication and spread of *X. fastidiosa* occurs faster within the more susceptible cultivars and species of grapevine (20). In the *Xylella*-grapevine pathosystem, there is a close association between the degree of intervessel migration of the bacteria within the petiole and the amount of resistance observed (13).

In summary, the real-time QPCR method described in this report has been used to quantify *X. fastidiosa* in citrus tissues and was found to be straightforward, sensitive, and reproducible. It provides a convenient tool that can be used to study different aspects of CVC development on citrus. The use of resistant or tolerant cultivars is the most effective CVC control method; therefore, research must first identify sources of resistance or tolerance (26). This novel real-time QPCR assay should be very useful in such breeding programs.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by PRONEX, FAPESP (Proc. 98/06217-0 and 98/14360-5), and CNPq. We thank two anonymous referees for their suggestions and comments, and G. Astua-Monge for critical reading of the manuscript.

LITERATURE CITED

- Almeida, R. P. P., Pereira, E. F., Purcell, A. H., and Lopes, J. R. S. 2001. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. *Plant Dis.* 85:382-386.
- Araújo, W. L. 2000. A comunidade bacteriana endofítica de citros e sua interação com *Xylella fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros (CVC). Tese de Doutorado, ESALQ, Piracicaba, Brazil.
- Araújo, W. L., Maccheroni, W., Jr., Aguilar-Vildoso, C. I., Barroso, P. A., Saridakis, H. O., and Azevedo, J. L. 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.* 47:229-236.
- Beretta, M. J. G., Barthe, G. A., Ceccardi, T. L., Lee, R. F., and Derrich, K. S. 1997. A survey for strains of *Xylella fastidiosa* in citrus affected by citrus variegated chlorosis and citrus blight in Brazil. *Plant Dis.* 81:1196-1198.
- Bohm, J., Hahn, A., Schubert, R., Bahnweg, G., Adler, N., Nechwatal, J.,

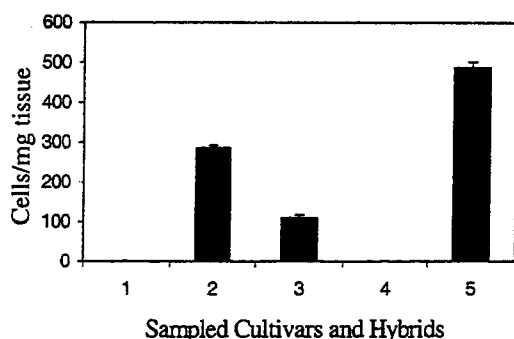


Fig. 3. Number of *Xylella fastidiosa* cells detected in healthy and in naturally or artificially (by using a needle) infected plants of 'Murcott' tanger, 'Pera' sweet orange, and eight hybrids as determined by real-time quantitative polymerase chain reaction. 1 = 'Murcott' (needle inoculation), 2 = hybrids (DNA of the hybrids H-19, H-31, H-55, H-61, H-80, H-129, H-214, and H-243 was bulked) (needle inoculation), 3 = 'Pera' (needle inoculation), 4 = Healthy 'Pera', and 5 = 'Pera' (naturally infected). Each sample was tested in triplicate. Vertical bars represent standard errors.

- Oehlmann, R., and Osswald, W. 1999. Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. *J. Phytopathol.* 147:409-416.
6. Chagas, C. M., Rossetti, V., and Beretta, M. J. G. 1992. Electron microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. *J. Phytopathol.* 134:306-312.
7. Chang, C. J., Garnier, M., Zreik, L., Rossetti, V., and Bové, J. M. 1993. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Curr. Microbiol.* 27:137-142.
8. Coletta Filho, H. D., Carlos, Targom, M. L. P. N., Cristofani, M., Souza, A. A., and Machado, M. A. 2000. Distribution of *Xylella fastidiosa* within sweet orange trees: Influence of age and level of symptom expression of citrus variegated chlorosis. Pages 234-237 in: *Proc. IOCV Conf.* 14, Brazil.
9. Dolken, L., Schuler, F., and Dolken, G. 1998. Quantitative detection of t(14;18)-positive cells by real-time quantitative PCR using fluorogenic probes. *Biotechniques* 25:1058-1064.
10. Donadio, L. C., and Moreira, C. S., eds. 1997. Clorose variegada dos citros. EECB, Bebedouro, Brazil.
11. Eun, A. J. C., Seoh, M. L., and Wong, S. M. 2000. Simultaneous quantitation of two orchid viruses by the TaqMan real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 87:151-160.
12. Ferreira, H., Gonçalves, E. R., Rodrigues Neto, J., and Rosato, Y. B. 2000. Primers specific for *Xylella fastidiosa* based on RAPD differential fragments. *Summa Phytopathol.* 26:15-20.
13. Fry, S. M., and Milholland, R. D. 1990. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. *Phytopathology* 80: 61-65.
14. FUNDECITRUS. 2000. Manual de convivência com a CVC. Fundo Paulista de Defesa da Citricultura, Araraquara, Brazil.
15. Guerra, M. 1984. Cytogenetics of rutaceae. II. Nuclear DNA content. *Caryologia* 37:219-226.
16. Hartung, J. S., Beretta, M. J. G., Briksky, R. H., Spisso, J., and Lee, R. F. 1994. Citrus variegated chlorosis bacterium: Axiom culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* 84:591-597.
17. He, C. X., Ciapina, L. P., Li, W. B., Donadio, L. C., and Lemos, E. G. M. 1996. ERIC-PCR for early detection of bacterium (*Xylella fastidiosa*) of citrus variegated chlorosis. Pages 20-25 in: *Annu. Meet. Int. Soc. Trop. Hortic.* 42, Brazil.
18. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., and Williams, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986-994.
19. Henson, J. M., and French, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:81-109.
20. Hill, B. L., and Purcell, A. H. 1995. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. *Phytopathology* 85:1368-1372.
21. Hopkins, D. L. 1985. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. *Phytopathology* 75:713-717.
22. Hopkins, D. L. 1989. *Xylella fastidiosa*: Xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 22:271-290.
23. Hyman, L. J., Birch, P. R. J., Dellagi, A., Avrova, A. O., and Toth, I. K. 2000. A competitive PCR-based method for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Lett. Appl. Microbiol.* 30:330-335.
24. Laranjeira, F. F., Pompeu, J., Jr., Harakava, R., Figueiredo, J. O., Carvalho, S. A., and Coletta Filho, H. D. 1998. Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo. *Fitopatol. Bras.* 23:147-154.
25. Lee, R. F., Beretta, M. J. G., Derrick, K. S., and Hooker, M. E. 1992. Development of a serological assay for citrus variegated chlorosis: A new disease of citrus in Brazil. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.* 105:32-35.
26. Li, W. B., Donadio, L. C., Beretta, M. J. G., Rossetti, V., and Sempionato, O. R. 1996. Practical methods for resistance evaluations of citrus varieties to citrus variegated chlorosis. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1:276-279.
27. Li, W. B., Zreik, L., Fernandes, N. G., Miranda, V. S., Teixeira, D. C., Ayres, A. J., Garnier, M., and Bové, J. M. 1999. A triply cloned strain of *Xylella fastidiosa* multiplies and induces symptoms of citrus variegated chlorosis in sweet orange. *Curr. Microbiol.* 39:106-108.
28. Lie, Y. S., and Petropoulos, C. J. 1998. Advances in quantitative PCR technology: 5' Nuclease assays. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:43-48.
29. Lima, J. E. O., Coutinho, A., Roberto, S. R., Miranda, V. S., Carlos, E. F., Salva, R., and Massari, C. 1996. New developments on citrus variegated chlorosis research at Fundecitrus, Brazil. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 2:435-439.
30. Locatelli, G., Santoro, F., Veglia, F., Gobbi, A., Lusso, P., and Malnati, M. S. 2000. Real-time quantitative PCR for human herpesvirus 6 DNA. *J. Clin. Microbiol.* 38:4042-4048.
31. Machado, M. A., Coletta Filho, H. D., Targom, M. L. P. N., and Pompeu, J., Jr. 1996. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* tenore) using RAPD markers. *Euphytica* 92:321-326.
32. Machado, M. A., Targom, M. L. P. N., Beretta, M. J. G., Laranjeira, F. F., and Carvalho, S. A. 1997. Detecção de *Xylella fastidiosa* em espécies e variedades de citros sobre-enxertadas em laranja 'pera' com clorose variegada de citros (CVC). *Fitopatol. Bras.* 22:30-33.
33. Medina, C. L., Nunes, W. M. C., Machado, M. A., and Machado, E. C. 1998. Método prático para transmissão de *Xylella fastidiosa* em mudas de citros. (Abstr.) *Fitopatol. Bras.* 23:212.
34. Minsavage, G. V., Thompson, C. M., Hopkins, D. L., Leite, R. M. V. B. C., and Stall, R. E. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84:456-461.
35. Monteiro, P. B., Renaudin, J., Jagoueix-Eveillard, S., Ayres, A. J., Garnier, M., and Bové, J. M. 2001. *Catharanthus roseus*, an experimental host plant for the citrus strain of *Xylella fastidiosa*. *Plant Dis.* 85: 246-251.
36. Moukhammedov, R., Hu, X., Nazar, R. N., and Robb, J. 1994. Use of polymerase chain reaction-amplified ribosomal intergenic sequences for the diagnosis of *Verticillium-tricorpus*. *Phytopathology* 84:256-259.
37. Mumford, R. A., Walsh, K., Barker, I., and Boonham, N. 2000. Detection of potato mop top virus and tobacco rattle virus using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 90:448-453.
38. Murray, M. G., and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321-4325.
39. Nicholson, P., Doohan, F., Rezanoor, H. N., Simpson, D., Smith, P. H., Turner, A., and Weston, G. 1997. Detection and quantification of individual fungal species in Fusarium disease complexes of cereals by polymerase chain reaction (PCR). *Cereal Res. Commun.* 25:477-482.
40. Nunes, W. M. C. 1999. Epidemiologia da clorose variegada dos citros (CVC) avaliada por sintomas e diagnóstico serológico e molecular de *Xylella fastidiosa*. Tese de Doutorado. UNESP, Botucatu, Brazil.
41. Orlando, C., Pinzani, P., and Pazzagli, M. 1998. Developments in quantitative PCR. *Clin. Chem. Lab. Med.* 36:255-269.
42. Pooler, M. R., and Hartung, J. S. 1995. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Curr. Microbiol.* 31:377-381.
43. Rasmussen, O. F., and Reeves, J. C. 1992. DNA probes for detection of plant pathogenic bacteria. *J. Biotechnol.* 25:203-220.
44. Roberts, C. A., Dietzgen, R. G., Heelan, L. A., and Maclean, D. J. 2000. Real-time RT-PCR fluorescent detection of tomato spotted wilt virus. *J. Virol. Methods* 88:1-8.
45. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
46. Schoen, C. D., Knorr, D., and Leone, G. 1996. Detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers by immuno-capture and a fluorogenic 5' nuclease RT-PCR assay. *Phytopathology* 86:993-999.
47. Simon, L., Lévesque, L., and Lalonde, R. C. M. 1992. Rapid quantitation by PCR of endomycorrhizal fungi colonizing roots. *PCR Methods Appl.* 2:76-80.
48. Simpson, A. J. G., Reinach, F. C., Arruda, P. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406:151-157.
49. Sukenda, W. H. 2000. Tissue distribution of *Pseudomonas plecoglossicida* in experimentally infected ayu plecoglossus altivelis studied by real-time quantitative PCR. *Fish Pathol.* 35:223-228.
50. Suzuki, M. T., Taylor, L. T., and Delong, E. F. 2000. Quantitative analysis of small-subunit RNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4605-4614.
51. Weller, S. A., Elphinstone, J. G., Smith, N. C., Boonham, N., and Stead, D. E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2853-2858.
52. Wells, J. M., Raju, B. C., Jung, H. Y., Weisburg, W. G., Mandelco-Paul, L., and Brenner, D. J. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov. gram negative, xylem limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:859-862.
53. Wells, J. M., Raju, B. C., Nyland, G., and Lowe, S. K. 1991. Medium for

- isolation and growth of bacteria associated with plum leaf scald and honey peach diseases. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:357-363.
54. Wilson, D. L., Abner, S. R., Newman, T. C., Mansfield, L. S., and Linz, J. E. 2000. Identification of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* by use of a fluorogenic PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 38:3971-3978.
 55. Zhang, A. W., Hartman, G. L., Curio-Penny, B., Pedersen, W. L., and Becker, K. B. 1999. Molecular detection of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from soybean seeds. *Phytopathology* 89: 796-804.

Capítulo 6

Mapeamento genético de marcadores fAFLPs em uma progênie BC₁ entre variedades cítricas resistente e suscetível à *Xylella fastidiosa* Wells (1987).

Capítulo 6

Mapeamento genético de marcadores fAFLPs em uma progênie BC₁ entre variedades cítricas resistente e suscetível à *Xylella fastidiosa* Wells (1987).

Antonio Carlos de Oliveira^[1] & Marcos Antônio Machado^[2]

^[1] Departamento de Genética e Evolução, UNICAMP, C.P. 6109 C.E.P. 13081-970 Campinas, São Paulo; ^[2] CAPTA Citros ‘Sylvio Moreira’/IAC, C.P. 04 C.E.P. 13490-000 Cordeirópolis, São Paulo.

6.1. Resumo

O presente trabalho descreve a aplicabilidade de marcadores *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), amplificados pelos *primers* *EcoRI* e *MseI* e visualizados por fluorescência (fAFLPs), para a construção de mapas genéticos de citros. Progênie de 87 híbridos BC₁ entre as variedades de tangor ‘Murcott’ e laranja doce ‘Pêra’ foi avaliada pela técnica fAFLP multifluorófila realizada em seqüenciador automático de DNA. Estratégias de mapeamento, considerando a progênie como resultante de *back-crossing* e de *cross pollinator*, foram exploradas pelos aplicativos Mapmaker v. 2.0 (LOD score $\geq 3,0$ e $\theta \leq 0,40$) e JoinMap v.3.0 (LOD score $\geq 3,0$ e $\theta \leq 0,25$), respectivamente. Distâncias de mapa (cM) entre os fAFLPs ligados foram estimadas, por ambos os programas pela função de Kosambi. Mapas de ambos os parentais foram construídos pelo Mapmaker com 121 dos 202 marcadores fAFLPs de segregação mendeliana 1:1 obtidos (mapa ‘Murcott’: 65 marcadores, 9 grupos de ligação (GLs), tamanho total de 1651,47 cM e intervalo entre marcadores de 29,5 cM; mapa ‘Pêra’: 55 marcadores, 5 GLs, tamanho total de 1596,2 cM e intervalo entre os marcadores de 31,9 cM. Análise de ligação de 347 marcadores fAFLPs de segregação 3:1 e 1:1, pelo JoinMap, resultou na ligação de 227 marcadores em 9 GLs, tamanho total de 845 cM e intervalo entre marcadores de 4,25 cM. Lócus fAFLPs com distorção de segregação e/ou clusterizados foram observados em diferentes grupos de ligação dos mapas gerados por ambos os *softwares*. Os resultados são discutidos em termos da eficiência da geração, polimorfismo e ligação de marcadores fAFLPs. Esses são os primeiros mapas de citros

construídos com marcadores fAFLPs e os primeiros construídos para tangores. Suas possíveis aplicações em estudos para a identificação de QRLs (quantitative resistance locos) de citros à *X. fastidiosa* serão discutidas.

6.2. Abstract

This study describes the applicability of AFLP (amplified-fragment length polymorphism), with the use of *EcoRI* and *MseI* amplification primers and visualization through its fluorescence version (fAFLP), for the construction of genetic linkage map os citrus. Progenies of 87 BC₁ hybrids between ‘Murcott’ tangor and ‘Pera’ sweet orange were evaluated by the fAFLP technique by using an automated DNA sequencer. Mapping strategies, taking the progeny as originated from backcrossing and cross pollination and cross pollination, were generated by Mapmaker v.2.0 (LOD score ≥ 3.0 and $\theta \leq 0.40$) and JoinMap v 3.0 (LOD score ≥ 3.0 and $\theta \leq 0,25$), respectively. Map distances were estimated using the Kosambi mapping function. Two hundred two fAFLP markers were obtained from the parents, of which 121 were used to generate maps by Mapmaker, with 1:1 segregation (‘Murcott’: 65 markers, 9 linkage groups (LGs), 1,651.47 cM in total size, and 29,5 cM in distance between markers; ‘Pera’: 55 markers, 5 LGs, 1,596.2 cM in total size, and 31.9 cM in distance between markers). Analysis of 347 fAFLP markers with 3:1 and 1:1 segregations, by JoinMao, resulted in a framework map of 227 markers in 9 linkage groups with a total map lenght of 845 cM and 4.25 cM in distance between markers. fAFLP loci with segregation distortion and/or in cluster were detected in different linkage groups of maps generatedbu both *softwares*. Generation efficiency, polymorphism and linkage of AFLP markers were analyzed. To our knowledge, these are the first linkage maps toward citrus constructed using fAFLP markers and the first linake mapsof tangors. Their putative applications on the identification of quantitative resistance loci (QRL) of citrus against *X. fastidiosa* are discussed.

6.3. Introdução

Os citros (*Citrus spp.*) são espécies frutíferas de grande importância da agroindústria mundial (Luro *et al.*, 1994). O Brasil é o maior produtor do mundo

(ABECITRUS, 2003), o que torna a citricultura de expressiva relevância sócio-econômica na nossa agricultura atual.

Embora o Brasil possua condições adequadas ao cultivo de citros, a produtividade média nacional é inferior àquela obtida na Florida/USA (FAO, 1999). Fatores abióticos e bióticos, tais como pragas e doenças, concorrem para esses baixos patamares de produção.

O melhoramento genético de citros, reconhecidamente lento e trabalhoso (Kijas *et al.*, 1995), tem sido potencializado com a avaliação do polimorfismo de DNA (Luro *et al.*, 1994), permitindo a execução de análises genéticas, sem a influência do ambiente, mesmo ainda em plântulas juvenis. *Fingerprintings* de marcadores moleculares vêm sendo empregados em estudos de diversidade genética (Araújo, 2002), identificação de plântulas híbridas (Oliveira *et al.*, 2000) e construção de mapas genéticos de ligação (Cristofani *et al.*, 1999) de citros.

A construção de mapas genéticos, tendo por base marcadores moleculares, é uma das aplicações de maior impacto dessa técnica biotecnológica em plantas (Ferreira & Grattapaglia, 1996), sendo considerada o primeiro passo para detecção de fatores genéticos que controlam a expressão de características morfo-agronômicas de interesse econômico (Devey *et al.*, 1996).

A constituição genética dos citros é particularmente favorável à construção de mapas genéticos, quais sejam dotação genômica (Soost & Cameron, 1975), número cromossômico haplóide ($n = 9$) e conteúdo genômico ($1C = 0,62$ pg) reduzidos (Guerra, 1984) e geração de híbridos intraespecíficos à intergenéricos (Barrett, 1985).

Diferentes mapas genéticos de citros com o emprego de marcadores isoenzimáticos (Durham *et al.*, 1990), RFLP (Durham *et al.*, 1990), RAPD (Gmitter *et al.*, 1996), SCAR (Deng *et al.*, 1997), SSR (Garcia *et al.*, 1999) e RGC (Ling *et al.*, 2000) vêm sendo construídos. Alguns mapas de citros fornecem a identificação de loci de características qualitativas e quantitativas referentes a aspectos morfo-fisiológicos (Roose *et al.*, 1992; Fang *et al.*, 1997; García *et al.*, 1999, 2000) e à resistência a fatores abióticos (Durham, 1990; Weber, 1999; Tozlu *et al.*, 1999ab) e bióticos (Gmitter *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1997; Mestre *et al.*, 1997; Cristofani *et al.*, 1999; Ling *et al.* 2000; Siviero, 2001).

Um dos principais problemas fitossanitários da atual citricultura brasileira é a clorose variegada dos citros (CVC), bacteriose acarretada pela *Xylella fastidiosa* Wells (1987) [*Xf*] (Chang *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993). Todas as variedades-copa de laranja doce são suscetíveis à *Xf* (Laranjeira *et al.*, 1995), notadamente a laranja ‘Pêra’, variedade que representa 41% das árvores do parque citrícola paulista (Amaro *et al.*, 1997).

A seleção de genótipos resistentes à *Xf* pode ser preconizada como a alternativa racional frente à CVC. O longo tempo requerido na geração e seleção de híbridos de laranjeiras resistentes à *Xf* e na avaliação sintomatológica da CVC pode ser abreviado através do emprego de marcadores moleculares, uma vez que essa técnica pode agilizar (i) o estabelecimento de populações segregantes de cruzamentos entre variedades contrastantes quanto à expressão da CVC; (ii) a construção de mapas genéticos; (iii) a identificação de *lôcus* de resistência quantitativa de QRLs de citros à *Xf* e (iv) a seleção assistida por marcador de híbridos que contenham QRLs à *Xf*.

O presente trabalho objetivou construir mapas de ligação de citros referentes a indivíduos de tangor ‘Murcott’ e laranja doce ‘Pêra’, sabidamente resistentes e suscetíveis a CVC, respectivamente (Laranjeira *et al.*, 1998), com vistas à futura identificação de QRLs de citros à *Xf*. Marcadores fAFLPs, tipo recente de marcador de DNA que combina as vantagens das técnicas de geração dos marcadores RFLP e RAPD, foi avaliada nesse estudo quanto à sua aplicabilidade na construção de mapas genéticos de citros.

6.4. Material e Métodos

Material genético vegetal

Plantas de tangor ‘Murcott’ [*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osb.] ($2n = 2x = 18$) e laranja doce ‘Pêra’ [*C. sinensis* (L.) Osb.] ($2n = 2x = 18$), pertencentes ao banco de plantas matrizes do Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’/IAC, Cordeirópolis/SP, foram utilizadas em hibridação manual controlada como parentais feminino e masculino, respectivamente. A escolha de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’ se devem à reconhecida resposta diferencial dessas variedades cítricas à *Xf* (‘Murcott’ é

resistente e 'Pêra' é suscetível), inclusive sob pressão de inóculo de campo (Laranjeira *et al.*, 1998).

Ao total, foram identificados 312 híbridos BC₁ entre essas duas variedades cítricas, por meio da genotipagem de plântulas híbridas via marcadores SSR (Oliveira *et al.*, 2002). Desse montante, 87 híbridos BC₁ foram aleatoriamente agrupados, juntamente com os parentais, para constituir a população-mapa.

Extração e quantificação de DNA genômico total

O DNA genômico total foi isolado de folhas frescas de plantas da população-mapa, com aproximadamente três meses de idade, através de uma adaptação do método de extração CTAB-Sarcosyl (Machado *et al.*, 1996). A concentração e qualidade das amostras de DNA foram determinadas espectrofotometricamente a ABS_{260nm} e a ABS_{260nm}/ABS_{280nm}, respectivamente, e por visualização sob luz ultra violeta em gel de agarose (0,8%) com brometo de etídeo (0,5 ng/ml), juntamente com diluição serial de λ -DNA (250 a 50 ng/ μ l) (Sambrook *et al.*, 1989). Aliquotas de cada amostra de DNA foram diluídas a 100 ng/ μ l e armazenadas a -20°C.

Geração de marcadores fAFLPs

Marcadores fAFLPTM (Keygene N.V., Wageningen, The Netherlands) foram gerados de acordo com a metodologia tradicional (Zabeau, 1993), utilizando-se o AFLP *Plant Mapping Kit* (Perkin Elmer, PE) - system I, destinado a espécies cujo tamanho do genoma esteja compreendido entre 500-6000 Mb, com *primers* marcados com fluorófilos específicos. Pequenos ajustes com relação às especificações do protocolo do fabricante foram necessários e serão ressaltados posteriormente. Quantidades de certos componentes das reações não especificadas nesse trabalho e as seqüências nucleotídicas dos *primers* encontram-se explicitadas no protocolo do fabricante. As principais etapas da geração de fAFLPs foram as seguintes:

Digestão do DNA genômico total. Aliquota de solução de 0,5-1,0 μ g de DNA de cada uma das 89 amostras de DNA da população-mapa foi digerida com as enzimas *Eco*RI e *Mse*I (GIBCO; 5 e 1 U, respectivamente) em tampão 1X (*Mse*I), com um volume total de reação de 25 μ l a 37°C por 4 hs, em termociclador de tampa aquecida (GeneAmp PCR Systems 9600, PE), empregado em todas as etapas de termociclagem deste trabalho.

Ligação de adaptadores EcoRI e MseI. Aliquota de 11,5 µl de fragmentos de DNA clivados e adaptadores (oligonucleotídeos de dupla fita) dos sítios de restrição da *EcoRI* e *MseI* foi submetida à ligação, por meio da ação da *T4* DNA ligase, em tampão *T4* DNA ligase 1X, com um volume total de reação de 25 µl a 20°C por 2 hs. As amostras da reação de fragmentos de DNA ligadas aos adaptadores foram diluídas 3X (10 µl da reação + 20 µl de água esterilizada) e estocadas a -20°C.

Amplificação pré-seletiva. A primeira etapa de amplificação de DNA foi realizada utilizando-se alíquota de 3 µl da solução com fragmentos ligados aos adaptadores com DNA *template*, empregando o par de *primers EcoRI* e *MseI*, juntamente com 11,25 µl de AFLP core Mix, em um volume total de reação de 15 µl. Esses *primers* hibridizam-se às seqüências dos adaptadores e aos sítios de restrição da *EcoRI* e *MseI* e apresentam um único nucleotídeo seletivo adicional na extremidade 3' (A e C, respectivamente). As condições de termociclagem foram: 1 ciclo de 72°C por 2 min.; 20 ciclos de 94°C por 1 seg., 56°C por 30 seg. e 72°C por 2 min. As amostras de amplificação pré-seletiva foram diluídas 5X (10 µl da amplificação pré-seletiva + 40 µl de água esterilizada) e estocadas a 4°C.

Amplificação seletiva. A segunda etapa de amplificação de DNA foi realizada empregando-se alíquota de 2 µl da solução contendo os fragmentos pré-amplificados com DNA *template*, utilizando-se 64 pares de *primers* (oito *primers EcoRI* x oito *primers MseI*), contidos no kit da PE, juntamente com 7,5 µl de AFLP core mix, em um volume total de reação de 10 µl. Esses *primers* também se anelam às seqüências dos adaptadores e aos sítios de restrição da *EcoRI* e *MseI* e apresentam, diferentemente dos *primers* adotados na fase de amplificação pré-seletiva, três nucleotídeos seletivos específicos na extremidade 3'. Assim, somente um sub-conjunto de fragmentos de DNA pré-amplificados é amplificado por cada uma das 64 combinações de *primers EcoRI/MseI*. Para a análise multifluorófila dos fragmentos fAFLPs, os fluorófilos 5-FAM (5-carboxy-fluorescein), TAMRA (N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamin) ou JOE (2',7'-dimethoxy-4',5'-dichloro-6-carboxy-fluorescein) são adicionados na extremidade 5' do *primer EcoRI*. A termociclagem, sob um perfil *touch-down*, foi de um ciclo a 94°C por 2 min., 65°C por 30 seg. e 72°C por 2 min.; 8 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 seg. e extensão a 72°C por 2 min., com temperatura de anelamento de 64°C

por 30 seg., reduzindo 1°C/por ciclo, até alcançar 57°C, seguido de 23 ciclos de 94°C por 1 seg.; 56°C por 30 seg. e 72°C por 2 min. As reações de amplificação seletiva foram preferencialmente realizadas empregando o mesmo termo-ciclador, evitando-se, com isso, as típicas variações de *ramping time* entre diferentes máquinas de PCR. As reações foram estocadas a 4°C.

Análise multifluorófila dos fAFLPs gerados. Para a análise multifluorófila, alíquotas de 1 µl de três reações de amplificação seletiva foram agrupadas, a partir de uma mesma amostra de DNA, por meio de *primers EcoRI* marcados com 5-FAM, TAMRA ou JOE. À mistura dessas três alíquotas foi incorporada 1,75 µl do tampão de carregamento [0,16 µl do GeneScan-500 ROX e 1,25 µl de formamida deionizada (98% formamida e 0,005% de blue dextran/25mM EDTA)], desnaturada a 95°C por 3 min. e, posteriormente, armazenada em gelo até o carregamento no gel.

GeneScan-500 ROX é um padrão interno de peso molecular constituído de 14 fragmentos de DNA dupla fita (de 75 pb a 500 pb de comprimento) marcados com 6-carboxy-x-rhodamin, que são submetidos a co-eletroforese, em cada linha do gel, juntamente com os fragmentos fAFLPs gerados com vistas a determinar o correto tamanho dos mesmos.

Eletroforese. Alíquotas de 1,5 µl da mistura de cada três amostras de reações fAFLPs e tampão de carregamento desnaturados foram submetidos a fracionamento eletroforético em géis de 36 cm de poliacrilamida desnaturante [6% de poliacrilamida, 8 M uréia TBE 1X (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA)], em seqüenciador automático de DNA ABI 377 (PE). A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 1X, sob 1600 V, 35 mA, 70 W, com 50°C de temperatura de placa.

Coleta de dados da imagem digitalizada dos géis fAFLPs. Durante a eletroforese, AFLPs que têm incorporado *primers EcoRI* marcados com fluorófilos FAM, TAMRA ou JOE, emitem fluorescência azul, verde ou amarela, respectivamente, quando alcançam o feixe de laser que é aplicado sobre a região inferior do gel. Os dados de fluorescência dos AFLPs (cor do fluorófilo, intensidade, tempo em minutos decorrido até alcançar o feixe do laser) foram coletados e armazenados pelo *software* ABI PrismTM collection, conforme instruções do fabricante.

Análises das imagens dos géis fAFLPs. Análise semi-automatizada das imagens digitalizadas (*tracking* da imagem de cada canaleta do gel, extração de eletroferogramas para cada *dye* fluorescente, exibição gráfica dos fAFLPs sob a forma de picos) e estimativa do tamanho dos fAFLPs [em pb, tendo por base a curva-padrão com tamanho (pb) x tempo decorrido (min.) obtida da migração dos fragmentos do padrão GeneScan-500 ROX] foram realizadas pelo *software* GeneScanTM versão 2.0.2 (PE). Controle manual do *tracking* das linhas foi empregado.

Avaliação de polimorfismo de fAFLPs. A avaliação de polimorfismos de fAFLPs foi realizada por dois procedimentos complementares. Primeiramente, identificaram-se fAFLPs geneticamente polimórficos com a genotipagem (presença = '1' e ausência = '0') de cada *amplicon* para todos os indivíduos da população-mapa, por meio do *software* de análise de fragmentos de DNA Genotyper versão 2.0 (PE). Somente os fragmentos entre 50 a 500 pb foram usados para *scoring*. A classificação binária (presença/ausência) gerada pelo *software* Genotyper foi visualmente comparada com os picos gerados pelo Genescan, por duas vezes. Genótipos e/ou reações que geraram interpretação ambígua dos *amplicons* durante essa análise comparativa foram identificados como genótipo falho e descartado da análise para efeito da construção do mapa.

Notação dos marcadores fAFLPs. Os *amplicons* foram identificados a partir dos dois *primers* *EcoRI/MseI* usados na amplificação seletiva do DNA, seguido do tamanho molecular do fAFLP, em pb.

Testes de segregação mendeliana de marcadores fAFLPs

As aparentes heterozigoses de locus fAFLPs em tangor 'Murcott' (configuração parental Aa x aa); em laranja 'Pêra' (configuração parental aa x Aa) e em ambos os parentais (configuração Aa x Aa) foram geneticamente avaliadas. Para tanto, a conformidade das proporções observadas de híbridos BC₁ com e sem *amplicons*, para cada fAFLP gerado, foi avaliada quanto às proporções mendelianas esperadas de 1:1 e 3:1, por meio do teste χ^2 (qui-quadrado) de independência (Steel & Torrie, 1980), calculado pelo *software* Excel (MicrosoftTM Inc.). Marcadores fAFLPs cuja segregação observada não desviou significativamente das referidas proporções mendelianas ($p >$

0,05) ou com desvios medianos de segregação ($0,01 \leq p < 0,05$) ($gl = 1$) foram incluídos na análise de mapeamento.

Estratégias da construção dos mapas genéticos de ligação

Na construção dos mapas genéticos de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’ duas estratégias de mapeamento foram adotadas. A primeira delas considera a progênie como resultante de retrocruzamento (BC_1) entre dois genótipos diplóides heterozigóticos, i.e., como uma população backcross F_2 de fase desconhecida, com marcas em ambas fases de ligação, empregando-se a função ‘back-crossing’ (BC) do aplicativo Mapmaker v. 2.0 (Lander *et al.*, 1987). A partir de marcadores fAFLPs com configurações $Aa \times aa$ e $aa \times Aa$, o Mapmaker executou análises algorítmicas de ligação (*maximum likelihood*) por meio do comando ‘two-point’ com um LOD score $\geq 3,0$ e um valor de frequência recombinacional (θ) $\leq 0,40$, e distintos grupos de ligação (GLs) foram determinados pelo comando ‘group’ para cada um dos parentais. Posteriormente, definiu-se a ordenação linear final dos marcadores em cada GL, via comparação de todas permutações de ligação de três loci possíveis, usando o comando ‘ripple’. O aplicativo JoinMap v.3.0 (Van Ooijen & Voorrips, 2001) foi utilizado na construção de dois mapas de ligação de fAFLPs 1:1 para inferir a fase de ligação dos marcadores fAFLPs, de acordo com Mestre *et al.* (1997) e para confirmar a melhor ordem dos marcadores dentro dos GLs, à semelhança de Quarrie *et al.* (1997). As distâncias do mapa final foram estimadas usando o comando ‘map’.

A segunda estratégia de mapeamento, baseada no aplicativo JoinMap, avaliou tanto os marcadores fAFLPs de segregação 1:1 (‘back-crossing’), quanto os de 3:1 (‘ F_2 intercross’) gerados simultaneamente pelos parentais heterozigóticos desse cruzamento. Para tanto, a função ‘cross pollinator’ (CP) do JoinMap analisa esse tipo de progênie segregante como advinda de polinização aberta entre genótipos diplóides heterozigóticos, gerando-se um mapa de ligação para um determinado parental. A partir de marcadores fAFLPs 1:1 heterozigóticos para tangor ‘Murcott’ (configuração $Aa \times aa$) e 3:1 (configuração $Aa \times Aa$), GLs para tangor ‘Murcott’ foram gerados pelo módulo de agrupamento (JMGRP), utilizando-se LOD score $\geq 3,0$ modificado a partir de um teste qui-quadrado de independência, que minimiza o risco de erros na transferência de loci distorcidos para um grupo de ligação, conforme Dettori *et al.* (2001). Uma vez que os

GLs foram definidos, a análise foi conduzida fixando a ordem obtida (módulo ‘fixed order’). Frequências de recombinação entre pares de marcadores em cada GL foram determinadas usando o módulo de recombinação (JMREC). Em seguida, os valores de recombinação inferidos foram empregados pelo módulo de mapeamento (JMMAP), com LOD score $\geq 3,0$ e $\theta \leq 0,25$ para ordenação final dos marcadores em cada GL.

Distâncias de mapa ou centiMorgan (cM) entre os fAFLPs ligados foram estimadas, por ambos os *softwares*, pela função de mapeamento de Kosambi (Kosambi, 1944), a partir da conversão da frequência recombinacional. Contraste entre médias dos intervalos em cM entre fAFLPs de segregação mendeliana normal ou com um ou os dois marcadores distorcidos foi realizado via teste *t* bilateral. Previamente à execução do teste *t* bilateral, a condição homo ou heteoscedástica dos dados foi averiguada pelo teste F.

Os resultados da eficiência da geração do polimorfismo e da ligação de marcadores fAFLPs nessa população-mapa de citros foram abordados, respectivamente, em termos de taxa multiplex (TM, i.e., número de marcadores amplificados); taxa multiplex efetiva (TME, i.e., número de marcadores que efetivamente segregam na população segregante) e taxa multiplex mapeada (TMM, i.e., número de marcadores polimórficos e mapeados nos GLs), conforme Vuylsteke *et al.* (1999). Para efeito de cálculo das TME e TMM, cada fAFLP polimórfico foi interpretado como um único locus genético, não levando em consideração possível alelismo entre diferentes tipos de fragmentos AFLP, à semelhança do que foi pressuposto por Meksem *et al.* (1995). Foi avaliado, para cada uma dessas três taxas, o efeito da quantidade de bases CG presentes nas extensões nucleotídicas seletivas dos *primers* *EcoRI* e *MseI*.

Distribuição dos marcadores fAFLPs e cobertura genômica

A normalidade da distribuição dos intervalos de ligação entre marcadores fAFLPs adjacentes, para cada GL dos três mapas de ligação gerados, foi avaliada via teste Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$). Considerando o conjunto dos GLs de cada um desses mapas, avaliou-se a correlação linear de Pearson e a diferença entre a quantidade de marcadores fAFLPs observada e esperada nos GLs, via teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov (amostras independentes). A quantidade esperada de fAFLPs foi estimada por meio da multiplicação da porcentagem relativa do comprimento do GL

(comprimento do GL dividido pelo comprimento total do mapa) com o número total de marcadores mapeados, conforme Castiglioni *et al.* (1999).

O número de marcadores fAFLPs estimado para se alcançar a saturação genômica dos mapas construídos foi estimado pela fórmula $n = [\log(1-p)/\log(1 - 2c/k)].1,25$, onde p = probabilidade de cobertura genômica; c = distância máxima desejada entre fAFLPs adjacentes e k = tamanho do genoma de citros (1700 cM), conforme descrito por Beckman & Soller (1983) e Krutovskii *et al.* (1998).

6.5. Resultados

Genotipagem de lócus marcadores fAFLPs

Frente as condições experimentais desse trabalho, alguns ajustes no protocolo sugerido pelo fabricante foram necessários para a geração de fAFLPs em citros. Ao invés de diluir as reações de ligação e de amplificação pré-seletiva em 1:20 e 1:10, conforme recomendado, foram adotados os fatores de diluição 1:3 e 1:5, respectivamente. Essas medidas foram tomadas considerando-se a avaliação visual da baixa intensidade do (i) “rastros” de digestão de 10 µl de DNA e do (ii) *smear* de fragmentos-alvo pré-amplificado (100 a 1500 pb) realizada em géis de agarose de 1,5%, corado com brometo de etídeo (0,5 ng/ml). A avaliação multifluorófila dos fAFLPs, por sua vez, apresentou bandas do padrão molecular claras e confiáveis, apesar de ter-se adotado um fator de diluição para GeneScan-500 ROX, menor do que o recomendado pelo protocolo do fabricante. Exemplo o perfil de amplificação de fAFLPs de citros encontra-se na Figura 1.

Os fAFLPs foram definidos sob a forma de picos pelo *software* GeneScan (Figura 2). O eletroferograma da Figura 2 mostra apenas uma faixa de fAFLPs referente a uma das duas reações de AFLP fracionadas simultaneamente no gel de eletroforese apresentado na Figura 1. A multimixagem de duas ou três reações AFLPs, com fluorófilos diferentes, aplicados em uma mesma linha do gel, otimizou a rotina laboratorial de identificação dos *amplicons*.

Das 64 combinações de pares de *primers* avaliadas, seis delas (EACC/M-CAC, E-AGC/M-CAG, E-AGC/M-CAT, E-AGG/M-CAT, E-AAC/M-CTC e E-AAG/M-CTC) foram fracionadas em géis cuja qualidade da digitalização da imagem não foi

satisfatória e duas combinações (E-ACA/M-CAA e E-ACG/M-CAT) produziram um *smear* de *amplicons* não adequadamente resolvido na eletroforese e, portanto, foram excluídas das análises subsequentes de fAFLPs.

A eficiência da metodologia de fAFLP nessa população-mapa de citros, em termos de TM, foi de 1163 fAFLPs. A TM média foi de $21,0 \pm 10,1$ AFLPs para cada um dos 56 pares de *primers* AFLPs, variando de 2 (E-AAC/M-CTC) a 55 (E-AAG/M-CTA) fAFLPs gerados. O número de fAFLPs gerado por essas combinações de *primers* mostrou distribuição normal ($p > 0,05$), segundo o teste de Kolmogorov Smirnov (aderência Lilliefors). Foram considerados como marcadores fAFLPs distintos *amplicons* que apresentassem diferença no tamanho $> \pm 0,5$ pb entre si.

O efeito da quantidade de bases CG presentes nas extensões nucleotídicas seletivas dos *primers* *EcoRI* e *MseI*, sobre a TM é apresentado na Tabela 1.

À medida que o conteúdo relativo de CpG aumenta, independente da posição dentro das bases seletivas, os valores de TM são reduzidos de $25,3 \pm 13,6$ à $18,5 \pm 7,7$ fAFLPs. Os testes de comparações de médias de fAFLPs gerados a partir de combinações de *primers* com 33,3% x 50% e 50% x 66,6% de conteúdo CG resultaram, inclusive, níveis de probabilidades de aceitação da H_0 ($0,050 < p < 0,072$) próximas do valor α (0,05) adotado nesse estudo para a rejeição da hipótese nula (Tabela 1). Quantidade de CG e de fAFLPs amplificados apresentou correlação negativa não significativa ($r = -0,25$; $p = 0,0651$) que novamente, à semelhança dos testes t , o nível de probabilidade de aceitação da H_0 foi próximo ao do nível α de 0,05 (Tabela 1).

A eficiência da geração de fAFLPs na população-mapa de tanger ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’, em termos de TME, foi de 549 fAFLPs. A TME média foi de $9,8 \pm 6,1$ fAFLPs para cada um dos 56 pares de *primers* AFLPs, variando de 11,5% (E-ACT/M-CAG) e 55% (E-AAC/M-CAG) das respectivas TM dessas combinações de *primers*. O número de fAFLPs polimórficos gerado por essas combinações de *primers* apresentou distribuição normal ($p > 0,05$), segundo o teste de Kolmogorov Smirnov (aderência Lilliefors). Marcadores que apresentaram altos desvios de segregação (teste χ^2 ; $p < 0,01$) dos padrões mendelianos 1:1 e 3:1 esperados não foram incluídos na TME e, portanto, foram removidos das análises de mapeamento.

O efeito da quantidade de bases CG, presentes nas extensões nucleotídicas seletivas dos *primers* *EcoRI* e *MseI*, sobre a TME é apresentado na Tabela 1. A medida que o conteúdo relativo de CpG aumenta, os valores de TME são reduzidos de $13,5 \pm 6,6$ a $6,6 \pm 3,2$ fAFLPs. Quantidades de fAFLPs geradas a partir de combinações de *primers* com 33,3%, 50% e 66% de conteúdo CpG apresentaram elevada diferença estatística ($p < 0,035$) (Tabela 1). Quantidade de nucleotídeos CG e do número de fAFLPs amplificada apresentaram correlação negativa significativa ($r = -0,41$; $p = 0,0017$) (Tabela 1).

Testes de segregação mendeliana de fAFLPs

Dos 549 marcadores fAFLPs polimórficos, foram observados 96, 106 e 347 marcadores fAFLPs com configurações alélicas Aa x aa, aa x Aa e Aa x Aa entre os parentais, o que corresponde, respectivamente, a 16,2%, 17,9% e 63,2 % do total dos *amplicons* gerados. Desse modo, estava a disposição um conjunto de 47.763 pontos de dados (549 marcadores x 87 híbridos da população-mapa) potencialmente informativos para a construção dos mapas genéticos.

Do total de 96 marcadores fAFLPs com segregação Aa x aa (heterozigóticos em ‘Murcott’), 17 deles (17,7%) apresentaram distorção de segregação ($0,05 \leq p \leq 0,01$), ao passo que 33 dos 106 marcadores fAFLPs (31%) com segregação aa x Aa (heterozigóticos em ‘Pêra’) são mendelianamente distorcidos, superando em quantidade em aproximadamente 75% de fAFLPs oriundos do parental feminino.

Mapeamento genético

Da análise de ligação de marcadores fAFLPs de segregação 1:1 (‘fAFLP 1:1’) realizada pelo Mapmaker, 121 dos 202 marcadores fAFLPs 1:1 mapearam-se em 14 grupos de ligação (GL) [9 GLs para o mapa de tangor ‘Murcott’ (‘mapa M1’) e 5 GLs para o mapa de laranja ‘Pêra’ (‘mapa P1’)]. Os mapas M1 e P1 são apresentados, respectivamente, nas Figuras 3 e 4. Por sua vez, das análises de 347 marcadores fAFLPs 1:1, heterozigóticos em tangor ‘Murcott’, ou de segregação 3:1 (‘fAFLP 3:1’) realizadas pelo JoinMap, 227 marcadores mapearam em 9 GLs que constituem o mapa fAFLP 1:1 e 3:1 de tangor ‘Murcott’ (mapa M1/3) (Figura 5). As principais características dos três mapas genéticos construídos são sumarizadas no Quadro 1.

Um total de 75,4% dos marcadores fAFLPs polimórficos exibiu frequências alélicas em concordância com as expectativas mendelianas 1:1 ou 3:1 e, desses, 73,42% foram dispostos inequivocamente em GLs de um desses três mapas. O número de fAFLPs para cada GL variou de 4 a 12 (mapa M1), 8 a 15 (mapa P1) e de 13 a 45 (mapa M1/3). Os três maiores GLs dos mapas M1 (GLs I, III e IV) e M1/3 (GLs II, IV e VI) cobrem aproximadamente 50% do comprimento total desses mapas. Independente do mapa construído, os marcadores fAFLPs foram distribuídos por toda a faixa de tamanho com uma maior fração, 72,5% em média, compreendida entre 50 e 200 pb.

A eficiência da metodologia de *fingerprinting* fAFLP em citros, em termos de TMM foi de 348 fAFLPs. A TMM média foi de $4,66 \pm 3,87$ fAFLPs para cada um dos 56 pares *primers*, variando de acordo com a combinação de *primers*, de 3,2% (E-ACT/M-CTG) a 75% (E-AAC/M-CAG) das respectivas TME dessas combinações de *primers*. O número de fAFLPs polimórficos gerado por essas combinações de *primers* não apresentou distribuição normal ($p < 0,01$), segundo o teste de Kolmogorov Smirnov (aderência Lilliefors).

O efeito da quantidade de bases CG, presentes nas extensões nucleotídicas seletivas dos *primers* *EcoRI* e *MseI*, sobre a TMM é apresentado na Tabela 1. A medida que o conteúdo relativo de CpG aumenta, os valores de TMM são reduzidos de $7,2 \pm 4,6$ a $2,8 \pm 2,2$ fAFLPs. Quantidades de fAFLPs geradas a partir de combinações de *primers* com 33,3% x 50% e 33,3% x 66,6% de conteúdo CpG apresentaram elevada diferença estatística ($p < 0,009$) (Tabela 1). Quantidade de CG e de fAFLPs amplificada apresentou correlação negativa significativa ($r = -0,42$; $p = 0,0014$) (Tabela 1).

No mapa M1, 16 fAFLPs com desvio de segregação mapearam-se em sete GLs (I à VII). Desses, quatro deles (GLs I, II, III e VIII) apresentaram marcas distorcidas na extremidade dos GLs (Figura 3). No mapa P1, 15 fAFLPs distorcidos mapearam-se em todos os cinco GLs. Desses, três deles (GLs III, IV e V) tiveram marcas distorcidas na extremidade dos GLs (Figura 4). Já no mapa M1/3, 13 fAFLPs 1:1 com desvio de segregação mapearam-se em seis GLs (I, II, III, IV, VI e VIII). Dois deles (GLs II e IV) apresentaram fAFLPs distorcidos na parte final de GLs (Figura 5).

Comparando-se a média dos intervalos do mapa com um ou dois marcadores distorcidos com a dos intervalos do mapa entre marcadores sem distorção de segregação,

detectou-se uma tendência de diminuição dessas distâncias nos mapas construídos pelo Mapmaker ($27,74 \pm 8,78$ cM contra $30,86 \pm 9,11$ cM no mapa M1 e $28,77 \pm 10,41$ cM contra $34,22 \pm 12$ cM, para o mapa P1) e uma tendência de aumento no mapa M1/3 construído via JoinMap ($4,76 \pm 5,80$ cM contra $4,18 \pm 4,76$ cM). Contudo, essas diferenças numéricas não foram estatisticamente significativas ($p = 0,09$ a $0,60$ para o teste t bilateral).

Distribuição dos marcadores fAFLPs e cobertura genômica

As Tabelas 2, 3 e 4 apresentam os resultados relativos à distribuição dos marcadores fAFLPs nos GLs dos mapas M1, P1 e M1/3, respectivamente.

Dos dois mapas construídos apenas com marcadores fAFLPs 1:1, somente o GL III do mapa M1 apresentou uma leve clusterização de marcadores ($p = 0,045$). Detectou-se elevada correlação positiva entre o tamanho dos GLs e a quantidade de fAFLPs ($r > 0,80$) para os mapas M1 e P1, com significância estatística somente para o mapa P1 ($p < 0,0001$). E, como esperado, não foi detectada diferença estatística entre o número de fAFLPs observado e esperado nos GLs, para ambos os mapas ($p > 0,85$) (Tabelas 2 e 3).

Todos os GLs do mapa M1/3 apresentaram clusterização de fAFLPs ($0,001 \leq p \leq 0,013$) (Tabela 4). Naturalmente, foi detectada diferença estatística entre o número de fAFLPs observado e o esperado nos GLs ($p = 0,024$). Correlação entre tamanho dos GLs e número de fAFLPs apresentou valor positivo mediano ($r = 0,50$), sem significância estatística ($p = 0,17$) (Tabela 4).

Os GLs I a III, V e IX do mapa M1/3 apresentaram clusterização de fAFLPs que variou de 8,52% (GL V) a 41,95% (GL III). Já para os GLs IV, VI a VIII foi observada uma menor quantidade de marcadores fAFLPs do que a esperada, variando de -12,01% (GL IV) a -47,45% (GL VI) (Tabela 4).

Os GLs I a IV e VII apresentam similaridade de tendência de aumento e/ou redução da quantidade de fAFLPs, avaliando-se, separadamente, tanto os marcadores fAFLPs 1:1, quanto os fAFLPs 3:1 presentes nesses GLs. Por sua vez, para os GLs V, VI, VIII e IX, essa concordância não é mantida (dados não apresentados).

Com relação à clusterização de fAFLPs distorcidos, observou-se uma tendência da mesma de se acumular preferencialmente nos GLs I e II, inclusive com marcas distorcidas ligadas entre si, no mapa M1; nos GLs II e III do mapa P1 (no GL III há uma

seqüência de três fAFLPs distorcidos ligados entre si) e nos GLs II e III do mapa M1/3 (nos GLs II e VI há presença de marcas distorcidas ligadas entre si).

Assumindo uma distribuição randômica de fAFLPs no genoma de citros e admitindo um tamanho genômico médio de 1700 cM (Liou, 1990; Jarrell *et al.*, 1992), com 95% de probabilidade de a distância máxima média entre os locos ser ≤ 20 cM, espera-se alcançar a saturação dos mapas M1 e P1 em torno de 120 marcadores fAFLPs (Tabela 5), i.e, requer-se ainda a inclusão de aproximadamente 55 e 65 outros fAFLPs a esses mapas, respectivamente, além dos que já se encontram ligados nos GLs desses mapas, respectivamente.

Por outro lado, assumindo as mesmas premissas, com exceção de se desejar um intervalo médio entre locos ligados de no máximo 10 cM, o mapa M1/3 requereria, por exemplo, a teórica adição de outros 16 marcadores (Tabela 5).

6.6. Discussão

A amplificação enzimática de seqüências de DNA *in vitro* pela PCR (Saiki *et al.*, 1988) permitiu a geração de marcadores moleculares de diferentes categorias, destacando-se, inicialmente, os marcadores SSR (Litt & Luty, 1989) e RAPD (Williams *et al.*, 1990). Embora essas técnicas sobrepuseram as limitações da geração de marcadores em citros baseadas na restrição de DNA, tais como RFLP (Liou, 1990), a exigência do conhecimento prévio de seqüências microssatélite (Kijas *et al.*, 1997) e a sensibilidade do RAPD às intrínsecas variações das condições gerais da PCR (Cai *et al.*, 1994) tornam essas duas técnicas, respectivamente, dispendiosas e falíveis.

A técnica de marcadores AFLP, que se baseia na amplificação de subconjuntos de fragmentos de restrição de DNA genômico usando PCR, é uma poderosa técnica de *fingerprinting* que apresenta elevada insensibilidade às variações da PCR, além de não requerer conhecimento prévio de seqüências nucleotídicas da espécie a ser estudada (Vos *et al.*, 1995). A construção de mapas de ligação de AFLPs, em diferentes espécies vegetais, demonstra a eficácia desse marcador molecular (Alonso-Blanco *et al.*, 1998).

A geração dessa categoria de marcadores em citros é recente, contando a literatura com somente um único trabalho reportado por De Simone *et al.* (1998). O presente trabalho apresenta a primeira avaliação do potencial de AFLPs

fluorescentemente detectados (fAFLPs) em citros e a construção dos primeiros mapas genéticos de ligação constituídos de fAFLPs nesse gênero da Família Rutaceae.

A eficiência da geração de marcadores fAFLPs em citros foi avaliada em uma população segregante de 87 híbridos BC₁ entre tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’, considerando as taxas TM, TME e TMM. Foram obtidos, como esperado, valores decrescentes para essas taxas multiplex ($21,0 \pm 10,1$; $9,8 \pm 6,1$ e $4,66 \pm 3,87$ fAFLPs, respectivamente) (Tabela 1), com alta correlação positiva na queda dos valores entre essas taxas (TM x TME, $r = 0,78$, $p < 0,001$; TM x TMM, $r = 0,5826$, $p < 0,0001$; TME x TMM, $r = 0,7254$, $p < 0,0001$).

A partir de 50 indivíduos F₁ do cruzamento entre *C. latipes* e *C. aurantium*, De Simone *et al.* (1998) realizaram *screening* de sete combinações de *primers* AFLPs, juntamente com a genotipagem via RAPD e RFLP, construindo mapas genéticos para cada um desses parentais. Em se tratando da análise de *fingerprinting* de AFLPs, esse autores relatam taxas TM e TME médias de 99,3 e 13,2 AFLPs. A TM do *fingerprinting* de AFLPs de citros obtida por De Simone *et al.* (1998) foi 472% maior que a obtida neste trabalho. Pode ter concorrido para essa grande diferença de magnitude de TMs de AFLPs o fato de que as espécies *C. latipes* e *C. aurantium*, embora pertencentes ao gênero *Citrus*, sejam mais filogeneticamente distantes entre si do que tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’. Contudo, os níveis médios de TME desses trabalhos são similares, diferindo entre si por apenas 35%.

Excesso de falsos eventos de dupla recombinação entre marcadores moleculares acarreta incorreta ordenação dos loci (Buetow, 1991) e superestimativa do comprimento de mapa (Shields *et al.*, 1991). Tendo em vista a possibilidade de sobreposição de dois ou mais marcadores fAFLPs, representados por *amplicons* de mesmo tamanho, oriundos da amplificação de diferentes seqüências nucleotídicas a partir de uma mesma combinação de *primers* (Pazquet *et al.*, 2001), a classificação binária automática dos fAFLPs de citros efetuada pelo Genotyper, baseada em resolução de $\pm 0,5$ pb, foi visualmente validada. Aqueles dados em que esse aplicativo considerou presente uma banda, quando, na verdade havia sobreposição de duas bandas, e aqueles dados de ausência de banda, devido à má qualidade da imagem digitalizada do gel, foram descartados da análise de mapeamento. Deve ser enfatizado que mesmo com a

validação visual dos marcadores fAFLPs identificados pelo Genotyper, pode ter havido a admissão de marcadores inválidos (sobreposição de dois ou mais marcadores fAFLPs). No entanto, o *fingerprinting* fAFLP gerado nesse trabalho foi geneticamente interpretado em termos de mapeamento de ligação, i.e., os marcadores fAFLPs tiveram que ser validados, ainda, quanto ao seu ajuste às segregações mendelianas. Desse modo, a retenção de fAFLPs resultantes de eventual sobreposição de dois *amplicons* acarretou, invariavelmente, em forte desvio de segregação mendeliana, sinalizando, possivelmente, a natureza bi-lócus desse aparente locus único de fAFLP. Conseqüentemente, esses marcadores foram excluídos para efeito de construção dos mapas.

Pares de *primers* cujo valor de TMM seja igual ou próximo ao de TME são os ideais para a construção de mapas genéticos (Vuylsteke *et al.* 1999). Considerando a população-mapa de citros avaliada nesse trabalho, calculou-se o quociente entre TMM e TME, para cada uma das 56 combinações de *primers* avaliadas. Oito combinações de pares de *primers* foram admitidas como ideais nesse estudo por apresentarem quociente $TMM/TME \geq 0,760$ [média da soma de todos os quocientes (0,525) mais o valor de um desvio-padrão (0,235)], cuja relação é: E-AAG/M-CTG, E-AAC/M-CAT, E-AAC/M-CTA, E-AAC/M-CTG, E-ACT/M-CTA, E-ACT/M-CTC, E-AGC/M-CAA e E-AGC/M-CAC.

As taxas TM e TME apresentaram-se normalmente distribuídas para as 56 combinações de *primers* AFLPs empregadas ($p > 0,05$), ao passo que para TMM a distribuição apresenta desvio da normalidade ($p < 0,01$). Mapeamento genético com AFLPs de *Alstroemeria spp* também acusou desvio de normalidade, no caso, para TME (Hansen *et al.*, 1999). O desvio da normalidade da TMM, detectado neste trabalho, pode ser interpretado como decorrente da presença de um sub-grupo de pares de *primers* AFLPs cujo quociente TMM/TME é superior a um desvio-padrão positivo da média de TMM, conforme discutido anteriormente.

Todas as três taxas multiplex apresentaram reduções acentuadas das quantidades de fAFLPs detectados, à medida que se aumentava a quantidade de bases CG, presentes nas extensões nucleotídicas seletivas dos *primers* *EcoRI* e *MseI* (Tabela 1). Esses resultados concordam com outras evidências experimentais que relatam forte correlação negativa entre o número de AFLPs gerado e o conteúdo total de CG, independente da

posição nas bases seletivas dos *primers* *EcoRI* e *MseI*, descritos para *Alstroemeria spp.* (Hansen *et al.*, 1999), *Pinus taeda* (Remington *et al.*, 1999) e em soja (Keim *et al.*, 1997). Os resultados desse trabalho suportam a hipótese de que os quatro nucleotídeos comumente presentes no DNA podem ser irregularmente distribuídos em genomas de citros. Inclusive, há evidências de que o DNA de citros seja rico em seqüências AT (Kijas *et al.*, 1997).

As três taxas multiplex detectadas nessa população segregante em citros, independente da quantidade de CG presente nas extremidades seletivas dos *primers*, confirmam a capacidade de análise simultânea de vários locos por gel pela técnica AFLP, conforme relatado por Jones *et al.* (1997) e Abdalla *et al.* (2001). Contudo, a magnitude das taxas multiplex de fAFLPs em citros é menor do que a comumente relatada em trabalhos de *fingerprinting* de AFLPs para outras espécies vegetais, onde a TME pode chegar a casa de dezenas de AFLPs. Em termos percentuais, a TME dos fAFLPs em citros, descrita neste trabalho, corresponde a 47,20% da TM, o que pode ser considerada de tamanho mediano, se comparada com as TMEs de AFLPs de apenas 11% e 6,5%, como descritas para cevada (Becker *et al.*, 1995) e para o cereal etíope 'tef' (*Eragrostis tef*) (Bai *et al.*, 1999), respectivamente.

Tamanho do genoma e relação genética entre os parentais são fatores que influenciam a quantidade de polimorfismo detectada em qualquer *fingerprinting* molecular (Bai *et al.*, 1999; Saliba-Colombani *et al.*, 2000). O pequeno tamanho de genoma vem sendo invocado como o responsável pelo baixo nível de polimorfismo AFLP gerado em determinadas espécies vegetais como em 'tef' (Bai *et al.*, 1999) e pêssago (Lu *et al.*, 1998). Nessa última espécie, cujo núcleo de células $2n$ contém $0,60 \pm 0,03$ pg de DNA ou 580 Mpb, a geração de AFLPs, usando combinações de *primers* *EcoRI-MseI* com apenas dois nucleotídeos seletivos na extremidade 3' da enzima de corte raro (E+2), resultou em um número total de bandas polimórficas significativamente superior quando empregadas as mesmas combinações de *primers* *EcoRI-MseI*, com E+3 (Lu *et al.*, 1998). Células $2n$ de citros contêm quantidade de material genético similar a das células de pêssago (0,62 pg de DNA ou 600 Mpb) (Guerra, 1984). Neste presente trabalho, o DNA genômico de citros foi submetido a *fingerprinting* de fAFLPs, empregando-se E+3 do AFLP *Plant Mapping Kit* (PE) -

system I, que é compatível com a faixa do tamanho do genoma de citros (o kit é destinado para genomas entre 500-6000 Mb). Desse modo, pode-se antever que os níveis das três taxas de multiplex de fAFLPs descritos para essa e outras populações-mapa de citros possam ser incrementados com a adoção de estratégias de *fingerprinting* de AFLPs com E+2 e/ou M+2.

Além do tamanho do genoma da espécie, o número de locos polimórficos ao nível de DNA, detectado em uma progênie segregante, é diretamente proporcional à relação genética entre os dois parentais (Saliba-Colombani *et al.*, 2000). O elevado percentual de locos fAFLPs detectado em heterozigose em ambos parentais, neste estudo (63,2%; 347/549) sugere acentuada similaridade genética existente entre tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’, o que valida a constatação, feita por análise de herança materna de fragmentos de amplificação de DNA mitocondrial, de que (i) tangor ‘Murcott’ é um híbrido entre o *C. reticulata* (parental feminino) x *C. sinensis* (parental masculino), representada no cruzamento desse trabalho como laranja ‘Pêra’ e de que (ii) ‘laranja doce’ (*C. sinensis*) é um híbrido entre o *C. grandis* x *C. reticulata* (parental feminino e masculino, respectivamente) (Araújo, 2002).

Considerando que os híbridos da população-mapa avaliada nesse trabalho resultaram de um retrocruzamento entre tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’ (*C. sinensis*), esperava-se uma fração significativamente majoritária de locos fAFLPs heterozigotos para tangor ‘Murcott’. Contudo, como um resultado de ‘non-inbred’ desses parentais, três configurações de segregação de locos fAFLPs foram detectadas entre os híbridos BC₁ dessa população-mapa: Aa x aa; aa x Aa e Aa x Aa. A similaridade do grau de heterozigosidade entre os parentais (96 fAFLPs heterozigóticos em tangor ‘Murcott’ e 106 em laranja ‘Pêra’) detectada nesse trabalho pode ser explicada pelo fato de que as espécies de ambas as variedades serem de origem híbrida, conforme atestado por Araújo (2002).

A elevada heterozigosidade retida nas variedades cítricas de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’ permitiu que somente os parentais e a progênie BC₁ fossem requeridos para construir mapas genéticos de ligação específicos para cada um dos parentais, já que essas progênies F₁ são análogas à população F₂ ou de retrocruzamento (Silva, 2001).

Os mapas foram construídos sem nenhum conhecimento prévio dos genótipos parentais ou sobre a fase de ligação dos marcadores, como empregado em outros trabalhos de mapeamento em citros (Garcia *et al.*, 1999). A estratégia de se construir mapa de ligação empregando progênie BC₁, a partir dos aplicativos JoinMap e Mapmaker já foi usado para outras espécies frutíferas, como o pêssego (Dettori *et al.*, 2001).

Os padrões de segregação dos fAFLPs 1:1 da população-mapa BC₁ de citros, em fase de acoplamento, foram empregados, pelo Mapmaker, na construção de dois mapas de ligação, um para cada parental (Figuras 3 e 4). Estratégia semelhante já foi adotada em mapeamento de espécies frutíferas, como pêssego (Dettori *et al.*, 2001) e citros (Cai *et al.*, 1994; Mestre *et al.*, 1997). Por sua vez, marcadores fAFLPs 3:1 foram adicionados ao conjunto de marcadores AFLP 1:1 heterozigotos para tangor ‘Murcott’, através do aplicativo JoinMap, resultando na construção do mapa M1/3, constituído de fAFLPs com padrões de segregação típicos de backcross (1:1) e intercross F₂ clássico (3:1) (Figura 5). O aplicativo JoinMap vem sendo comumente empregado na análise de ligação de progênies segregantes a partir de parentais heterozigóticos de espécie outcrossing como a maçã (Roche *et al.*, 1997).

As grandes distâncias médias entre loci fAFLPs adjacentes dos mapas M1 e P1 (29,47 e 31,92 cM, respectivamente) possivelmente se devem ao grau mediano de saturação desses mapas obtidos até o presente momento. Adição de novos marcadores moleculares deverá acarretar a diminuição do intervalo médio entre marcas ligadas desses dois mapas.

O mapa de laranja ‘Pêra’ apresenta cinco GLs, portanto, abaixo do número haplóide de citros ($n = 9$). Vários fatores podem ter concorrido para isso, dentre eles, a diferença significativa [tabela χ^2 de contingência; p (correção de Yates = 0,0090)] da quantidade de fAFLPs com distorção de segregação ($0,05 \leq p \leq 0,01$) entre os marcadores fAFLPs 1:1 polimórficos heterozigóticos em laranja ‘Pêra’ (31,13%) e os fAFLPs 1:1 heterozigóticos em tangor ‘Murcott’ (14,58%), o que pode ser interpretado como decorrente da maior pressão de seleção gamética exercida sobre o parental masculino, devida à elevada competição do pólen, como descrito em citros por Luro *et al.* (1994).

O mapa de tangor 'Murcott' (M1/3) é constituído de 227 fAFLPs (Figura 5), o que o torna, tanto quanto se sabe, o terceiro mapa genético de citros mais saturado disponível [Fang *et al.* (1997) descreveram um mapa contendo 360 marcadores RAPD, mapeados em 108 híbridos e de *C. máxima* e De Simone *et al.* (1998) relataram um mapa com 247 marcadores para *C. aurantium*]. A distância média entre locos fAFLP adjacentes (4,25 cM) está próxima a do outro mapa anteriormente construído com o auxílio de AFLPs (3,32cM) (De Simone *et al.*, 1998).

Estratégia de se construir mapas genéticos contendo marcadores AFLPs heterozigóticos para um parental (AFLP 1:1) e marcadores AFLPs heterozigóticos em ambos os parentais (AFLPs 3:1) já foi adotada na construção de mapas de ligação de citros (Cai *et al.*, 1994) e cacau (Flament *et al.*, 2001). Contudo, em virtude da dificuldade de se mapear locos 3:1 de marcadores dominantes em conjunção com locos 1:1, já que as frações de recombinação estimadas podem ser viesadas e terem baixo conteúdo informativo sobre frequência de recombinação genética (Cai *et al.*, 1994; Maliepaard *et al.*, 1997), os marcadores fAFLPs 3:1 não puderam ser ordenados sem ambigüidade no mapa M1/3.

Outra consequência da adição dos marcadores fAFLPs de configuração Aa x Aa, também inerente à natureza genética dos marcadores de segregação 3:1, é a pronunciada redução do tamanho do mapa (de 1651,47 cM para 845 cM, correspondendo a uma redução de 48,8%). Essa redução se deve à menor taxa de recombinação entre marcadores de segregação 3:1, o que torna os marcadores presentes nos GLs mais próximos entre si. A literatura registra reduções de comprimento de mapas de ligação de citros de até 60% (Cai *et al.*, 1994), quando se empregam dados de marcadores moleculares em diferentes aplicativos. Em se tratando especificamente da comparação de mapas de ligação gerados com o Mapmaker e Joinmap, o tamanho dos mapas geralmente é diferente, o que decorre, principalmente, de duas diferenças entre esses *softwares*. Primeiro, esses aplicativos apresentam diferentes algoritmos de estimativa de recombinação gênica [método de máxima verossimilhança no Mapmaker (Lander *et al.*, 1987) e estatística LOD acoplada a um teste Qui-quadrado de independência para o Joinmap (Van Ooijin & Voorrips, 2001)]. Segundo, esses *softwares* diferem quanto à capacidade de considerar que um *crossing-over* prevenir (JoinMap) ou não (Mapmaker)

a ocorrência de outros *crossing-overs* no mesmo segmento cromossômico (Van Ooijen & Voorrips, 2001).

O mapa M1/3 apresentou 36 marcadores fAFLPs co-ligados, representado aos pares, em oito dos nove GLs o que, pode ser interpretado como o resultado da identificação de marcadores realmente muito próximos entre si ou dois alelos de locus fAFLPs codominantes (Barcaccia *et al.*, 1999). Esse mapa encontra-se quase que completamente saturado, havendo somente quatro intervalos entre locus AFLPs adjacentes superiores a 20 cM (GL IV, GL VII e dois no GL VI) (Figura 5).

Os GLs I e IV do mapa M1/3 apresentam distâncias de mapa negativas entre marcadores fAFLPs adjacentes próximos às suas extremidades (Figura 5). O aplicativo JoinMap, empregado na construção desse mapa, identifica, dessa maneira, os marcadores que não se encontram fortemente ligados a determinados GLs. Mapeamento de AFLPs em alho, empregando o JoinMap, também resultou nessa configuração em um dos GL (Heun *et al.*, 1991).

À semelhança de mapa genético de citros descrito por Cai *et al.* (1994), os três maiores GLs de cada um dos mapas M1 e M1/3 cobriram metade do comprimento total de cada um desses mapas. Já para o mapa P1, por haver apenas cinco GLs, os três maiores GLs respondem por 70% do comprimento total do mapa desse parental.

Espera-se que populações-mapa constituídas de progênie F_1 obtidas de cruzamento entre parentais altamente heterozigóticos, não geneticamente melhorados, apresentem baixos níveis de distorção de segregação (Barcaccia *et al.*, 1999). Contudo, distorção de segregação de alelos de locus marcadores tem sido frequentemente relatada em cruzamentos intra ou inter-específicos em citros, independentemente do tipo de marcador molecular empregado. Dos quatorze trabalhos em que as populações-mapa de citros foram utilizadas para a construção de mapas genéticos (Torres *et al.*, 1985; Liou, 1990; Jarrell *et al.*, 1992; Durham *et al.*, 1992; Luro *et al.*, 1994; Cai *et al.*, 1994; Luro *et al.*, 1996; Kijas *et al.*, 1997; Prado, 1997; De Simone *et al.*, 1998; Fang & Roose, 1999; Roose *et al.*, 2000; Sankar & Moore, 2001 e Oliveira, 2001), tem-se uma porcentagem média de 25% de locus marcadores com distorção de segregação, oscilando de 12% de locus AFLP (De Simone *et al.*, 1998) até 40%, para locus RAPD (Cai *et al.*, 1994). No presente trabalho, a porcentagem média de distorção de

segregação de marcadores polimórficos foi de 24,6%. O nível de distorção de segregação, desse e de outros trabalhos de mapeamento de citros encontra-se dentro da amplitude descrita para outras espécies anuais ou perenes, com valores que variam entre 1,4% para *Hevea* spp., empregando-se marcadores AFLP, RFLP, SSR e isoenzimáticos (Lespinasse *et al.*, 2000), passando por 69% em *Cryptomeria japonica*, empregando-se marcadores AFLP (Nikaido *et al.*, 1999) e alcançando 100% em RFLPs em tomate (Nienhuis *et al.*, 1987).

Marcadores polimórficos com distorção de segregação responderam por apenas 24,59% e 12,39% da TME e TMM, respectivamente, havendo, portanto, uma redução à metade da representação de fAFLPs distorcidos que permaneceram retidos em um dos três mapas genéticos de citros construídos.

Distorção de segregação pode ser provocada por diferentes mecanismos que, isolada ou conjuntamente, acarretam aspectos seletivos desvantajosos para a transmissão gamética ou a viabilidade do zigoto. São eles: (i) ligação de locus com desvio de segregação à genes letais ou sub-letais, expostos a seleção direcional nos estágios de desenvolvimento pré- ou pós-zigótico (Zamir & Tadmor, 1986) à fatores gametofíticos (“pollen killer”) que acarrete o abortamento do gameta masculino (Foolad, 1996; Liu, 1998); (ii) erro de amostragem e/ou o tamanho da população disponível (Lu *et al.*, 1998); (iii) segregação não-aleatória de gametas (Gadish & Zamir, 1986); (iv) tamanho e heterozigosidade estrutural dos cromossomos dos genomas parentais, notadamente em progênie resultante de hibridizações inter-específica e intergenérica (Luro *et al.*, 1994), (v) presença de alelos de auto-incompatibilidade (Bert *et al.*, 1999) e/ou (vi) variação não-genética artefactual, geração de amplicons a partir de sequência de DNA organelar ou interações epigenéticas (Soltis *et al.*, 1998).

Em se tratando de espécies com indivíduos altamente heterozigóticos ocorre, via de regra, forte depressão endogâmica, que é considerada a maior causa de distorção de segregação (Bailey, 1961). Evidências experimentais comumente demonstram altos desvios das taxas mendelianas de segregação de locus em famílias segregantes obtidas de cruzamentos interespecíficos (Zamir & Tadmor, 1986).

Os citros apresentam um modo peculiar de reprodução apomítica facultativa que gera depressão por endogamia em progênie oriunda de hibridações controladas, já que a

grande maioria dos indivíduos das populações cítricas carrega locos deletivos perpetuados em heterozigose, cujo alelo recessivo pode induzir um padr3o anormal de segregac3o gam3tica (Luro *et al.*, 1994). Acredita-se que a maioria dos locos distorcidos no genoma de citros esteja ligado a genes expostos 3 selecc3o direta (Cai *et al.*, 1994). Outro aspecto que potencializa as distorcc3es de segregac3o em citros, e que tamb3m adv3m da apogamia facultativa que predomina no g3nero, 3 o ac3mulo de elevada heterozigosidade cromoss3mica estrutural, j3 que sucessivos rearranjos cariot3picos s3o gerados por cruzamentos entre variedades interespec3ficas e perpetuados apomiticamente (Roose *et al.*, 1998). Evid3ncias experimentais geradas por an3lise com bandeamento por fluorocromo suportam a hip3tese de que os cromossomos de citros apresentam altos n3veis de heteromorfismos (Guerra, 1993).

As porcentagens de marcadores polim3rficos que n3o se ligaram a nenhum dos GLs dos mapas M1, P1 e M1/3 foram de 32,29%, 48,11% e 34,58%, respectivamente. Os n3veis percentuais de desvio deste trabalho s3o bem superiores quando comparados com os n3veis de n3o ligac3o de marcadores polim3rficos de outros mapas de citros, que oscilam de 10,3% (De Simone *et al.*, 1998) a 28,9% (Cai *et al.*, 1994).

Tendo em vista que a populac3o-mapa F₁ genotipada neste trabalho adv3m de um retrocruzamento entre um h3brido de tangerineira/laranjeira ('Murcott') com laranjeira ('P3ra'), parte do desvio de segregac3o de locos fAFLPs detectado pode ser resultante do tipo de cruzamento entre parentais heterozig3ticos, seguida de algum n3vel de depress3o por endogamia na prog3nie. Quando da identificac3o e multiplicac3o vegetativa dos h3bridos, previamente 3 construcc3o do mapa gen3tico, ocorreram ciclos sucessivos de mortes de h3bridos. Desse modo, parte das distorcc3es de segregac3o entre alelos pode ser atribu3da 3 acc3o da selecc3o direcional, possivelmente agindo sobre um est3gio pr3 ou p3s-zig3tico (germinac3o da semente e desenvolvimento da pl3ntula) contra genes letais ou sub-letais, fisicamente ligados a esses locos marcadores distorcidos. Outra frac3o das distorcc3es de segregac3o pode ser decorrente da maior selecc3o gam3tica sofrida pelo parental masculino, conforme j3 discutido anteriormente.

Em se tratando de marcadores fAFLPs, desvios de segregac3o podem se originar da sobreposic3o de fragmentos de AFLPs, de tamanhos similares. Na construcc3o do mapa de ligac3o de *Cryptomeria japonica*, 69% dos marcadores fAFLPs apresentaram

desvios na segregação esperada, não sendo utilizados nas análises de ligação, o que foi atribuído a problemas relativos à incorreta identificação dos marcadores amplificados (Nikaido *et al.*, 2000).

Todos os três mapas genéticos apresentam fAFLPs distorcidos ligados em GLs (Figuras 3 a 5). Lócus com desvio de segregação não é impeditivo para o seu uso em estudos de mapeamento (Zamir & Tadmor, 1986). A construção de mapas e localização de QRLs/QTLs, a partir de lócus com distorção de segregação em populações de mapeamento, não é comprometida em diferentes espécies vegetais, incluindo culturas anuais como arroz (Nandi *et al.*, 1997), cevada (Heu *et al.* 1991), milho (Beaumont *et al.*, 1996), tomate (Helentjaris *et al.*, 1986), batata (Kuhl *et al.*, 2001) e perenes como café (Paillard *et al.*, 1996), conífera ‘douglas-fir’ (Krutovskii *et al.*, 1998), pêssago (Lu *et al.*, 1998) e em citros (Cai *et al.*, 1994).

Os mapas M1 e P1 não apresentaram desvios entre o número esperado e o observado de marcadores fAFLPs ($p = 0,92$ e $0,86$, respectivamente). Por sua vez, o mapa M1/3 apresentou desvio significativo ($p = 0,024$). Ou seja, esse último mapa apresentou clusterização de fAFLPs em todos os GLs, como pode ser evidenciado pelo desvio de normalidade da distribuição dos intervalos de ligação entre lócus adjacentes ($p = 0,001$ a $0,013$). Clusters de fAFLPs gerados pelas enzimas de restrição EM, cujas seqüências-alvo são ricas em AT (5'-GAATTC-3' e 5'-TTAA-3', respectivamente), ocorrem em regiões próximas de centrômeros e de heterocromatina e vêm sendo amplamente relatados para batata (VanEck *et al.*, 1995; Rouppe Van Der Voort *et al.*, 1997; Zimnoch-Guzowska *et al.*, 2000), arroz (Nandi *et al.*, 1997), cevada (Castiglioni *et al.*, 1998; Becker *et al.*, 1995; Powell *et al.*, 1997; Qi *et al.*, 1998), soja (Keim *et al.*, 1997; Young *et al.*, 1999), lentilha (Eujayl *et al.*, 1998), eucalipto (Marques *et al.*, 1998), *Arabidopsis thaliana* (Alonso-Blanco *et al.*, 1998), milho (Castiglioni, *et al.*, 1999; Vuylsteke *et al.*, 1999), girassol (Gedil *et al.*, 2001) e trigo (Rodriguez Milla & Gustafson, 2001).

No presente trabalho, o mapa que apresentou clusterização de fAFLPs possui marcas com segregação 1:1 e 3:1. Conforme discutido anteriormente, esse última categoria de segregação resulta em uma redução das distâncias entre os lócus adjacentes. Desse modo, a clusterização de fAFLPs em citros detectada na mapa M1/3 pode se

dever à ação dos marcadores com segregação 3:1 e/ou à intrínseca clusterização de loci AFLPs em regiões próximas de centrômeros e de heterocromatina.

Os mapas M1/3 e P1 não apresentaram correlação linear significativa entre tamanho e quantidade de AFLPs ($r = 0,82$, $p = 0,08$ e $r = 0,50$, $p = 0,17$, respectivamente). Ausência de correlação linear significativa entre o número de marcadores AFLPs nos GLs e a distância genética coberta também foram detectadas em mapeamento genético de *ryegrass* (Bert *et al.*, 1999) e de pêsego (Lu *et al.*, 1998).

6.7. Perspectivas e emprego do mapa

Em resumo, os resultados desse estudo (i) relatam que a tecnologia de marcação e detecção de marcadores AFLPs com fluorescência pode ser usada, com sucesso, para gerar *fingerprintings* de DNA em citros, passíveis de serem empregados na construção de mapas de ligação em citros e (ii) apresentam os dados preliminares sobre mapas de ligação construídos a partir de uma progênie BC₁ para as variedades de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’. Esse é o segundo trabalho de mapeamento de citros, juntamente com o de De Simone *et al.* (1998), em que se descreve a construção de mapas de ligação oriundos de populações segregantes entre duas variedades pertencentes ao gênero *Citrus*.

O quociente médio entre TMM/TM detectado pelo *fingerprinting* com AFLP nessa população segregante de citros foi relativamente baixo (22,19%). Contudo, conforme enfatizado por Becker *et al.* (1995), a técnica de marcadores AFLP permite, por sua vez, a análise simultânea de um grande número de fragmentos de DNA em um único gel, de uma forma rápida e confiável, o que a torna uma eficiente ferramenta para rápida construção de mapas de ligação.

Há diferentes indícios de que os mapas M1 e P1 encontram-se, quando muito, medianamente saturados, que incluem o fato de que (i) o número de GLs obtido ser menor que o número haplóide ($n = 9$) de cromossomos em citros (mapa P1), (ii) falta de detecção de marcadores polimórficos em determinadas regiões genômicas, o que resultou em *gaps* entre loci adjacentes superiores a 30 cM e (iii) presença de marcadores polimórficos não ligados. A genotipagem dessa população-mapa com novos marcadores moleculares resultará, provavelmente, no aumento de GLs para o mapa P1 e saturação dos *gaps* existentes nos dois mapas.

Trabalhos de mapeamento em espécies perenes apresentam uma característica que favorece a tarefa de saturação dos mapas, uma vez que os mesmos híbridos empregados nessa população-mapa poderão ser usados para a adição de novos marcadores moleculares. Estratégias eficazes para se obter saturação direcionada (Giovannoni *et al.*, 1991), em detrimento da inclusão de novos marcadores randômicos, devem ser priorizadas para se alcançar saturação em áreas pobremente marcadas desses mapas, incluindo extremidades de GLs curtos e marcadores não ligados, conforme enfatizado por Krutovskii *et al.* (1998). Pode-se, com esse objetivo, utilizar-se pares de *primers* AFLPs E+3/M+3 que contenham até 2 bases CG, já que alcançam até 50% e 257% a mais de TMM do que as combinações de *primers* com quatro ou seis dessas bases na extensão seletiva. Outra alternativa é adotar pares de *primers* que contenham dois nucleotídeos seletivos, ao invés de três, como usado neste estudo e, adicionalmente, adotar enzimas de restrição que restrinjam, preferencialmente, regiões eucromáticas, não metiladas, como a *Pst*I, por exemplo.

A progênie de 312 híbridos BC₁ gerada entre tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’, os mapas de ligação construídos e os marcadores derivados a partir deles poderão ser úteis para o melhoramento genético em citros. Tendo em vista que esse cruzamento foi construído a partir de parentais heterozigóticos, pode-se supor que uma ampla faixa de características morfo-agronômicas esteja segregando em sua progênie, o que permitirá que as mesmas sejam geneticamente dissecadas. Dentre essas características, é notável o comportamento diferencial dos parentais quanto à resistência à CVC (Laranjeira *et al.*, 1998), condição essencial em trabalhos de melhoramento. Também são relatadas respostas diferenciais quanto ao cancro cítrico e leprose, sendo também o tangor ‘Murcott’ como o parental resistente. Tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’ se diferenciam também quanto aos aspectos relativos às qualidades físico-químicas do suco da fruta. Desse modo, os mapas genéticos de ligação descritos neste trabalho constituem o primeiro passo para a identificação de loci de resistência quantitativa (QRLs) para as referidas doenças e de loci de características quantitativas (QTLs) relacionadas às propriedades físico-químicas do suco da fruta da laranja ‘Pêra’, principal variedade de laranja doce do Brasil (Amaro *et al.*, 1997). Esse mapa está sendo avaliado, agora, em estudos para a identificação de QRLs de citros à *Xf*, causadora da CVC.

6.8. Referências Bibliográficas:

- ABDALLA, A. M. *et al.* Genetic diversity and relationships of diploid and tetraploid cottons revealed using AFLP. *Theor Appl Genet* v.102, p.222-229, 2001.
- ABECITRUS, 2003 (<http://www.abecitrus.com.br>). Acesso em 25 de fevereiro de 2003.
- ALONSO-BLANCO C. *et al.* Development of an AFLP based linkage map of Ler, Col and Cvi *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a Ler/Cvi recombinant inbred line population. *Plant J* v.14, p.259-71, 1998.
- AMARO, A. A.; MAIA, M. L. & GONZALEZ, M. A. Efeitos econômicos decorrentes da clorose variegada dos citros. In: DONADIO, L. C. & MOREIRA, C. S. Clorose Variegada dos Citros. 1ed., Bebedouro: 1997, 162 p.
- ARAÚJO, E. F. *Filogenia de citrus e gêneros afins*. Campinas, UNICAMP, 2002. 120 p. Tese (Doutorado) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- BAI, G. *et al.* A genetic linkage map os tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter] based on amplified fragment lenght polymorphism. *Theor Appl Genet* v.99, p.599-604, 1999.
- BAILEY, N. T. J. Introduction to the mathematical theory of linkage. Clarendon Press, Oxford. 1961.
- BARCACCIA, G. *et al.* AFLP fingerprinting in *Medicago spp.*: Its development and application in linkage mapping. *Plant Breeding*, v.118, p.335-340, 1999.
- BARRETT, H. C. Hybridization of *Citrus* and related genera. *Fruit varieties J.*, v. 39, p. 11-16, 1985.
- BEAUMONT, V. H. *et al.* Comparison of RAPD and RFLP markers for mapping F2 generations in maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet.* v.93, p.606-612, 1996.
- BECKER, J. *et al.* Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol Gen Genet* v. 249, p.65-73, 1995.

- BECKMANN, J. S. & SOLLER, M. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement methodologies, mapping and costs. *Theor Appl Genet*, v.67, p. 35-43, 1983.
- BERT, P. F. *et al.* A high-density molecular map for ryegrass (*Lolium perenne*) using AFLP markers. *Theor Appl Genet*, v.99, p.445-452, 1999.
- BUETOW, K. H. Influence of aberrant observations on high-resolution linkage analysis outcomes. *Am J Hum Genet*, v.49, p.985-994, 1991.
- CAI, Q.; GUY, C. L. & MOORE, G. A. Extension of the linkage map in *Citrus* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. *Theor Appl Genet*, v.89, p.606-614, 1994.
- CASTIGLIONI, P. *et al.* AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution. *Theor Appl Genet*, v.99, p.425-431, 1998.
- CHANG C. J. *et al.* Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Curr Microbiol*, v.27, p.137-142, 1993.
- CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. & GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. *Euphytica*, v. 109, p. 25-32, 1999.
- DE SIMONE, M. D. *et al.* Construction of genetic maps for *Citrus aurantium* and *C. latipes* based on AFLP, RAPD and RFLP markers. *Fruits*, v. 53, p. 383-390, 1998.
- DENG, Z. *et al.* Development and characterization of SCAR markers linked to the citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata*. *Genome*, v.40, p. 697-704, 1997.
- DETTORI, M. T.; QUARTA, R. & VERDE, I. A peach linkage map integrating RFLPs, SSRs, RAPDs, and morphological markers. *Genome*, v. 44, p. 783-790, 2001.

- DEVEY, M. E. *et al.* A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers. *Theor Appl Genet*, v. 92, p. 673-679, 1996.
- DURHAM, R. E. *et al.* Linkage of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in *Citrus*. *Theor Appl Genet*, v. 84, p. 39-48, 1992.
- DURHAM, R. E. *Mapping genes involved in freezing tolerance in a backcross of Citrus and Poncirus using a linkage map of isozymes and restriction fragment length polymorphisms*. 1990, p. 114 f. Dissertation - University of Florida.
- EUJAYL, I. *et al.* A genetic linkage map of lentil (*Lens sp.*) based on RAPD and AFLP markers using recombinant inbred lines. *Theor Appl Genet*, v. 97, p. 83-89, 1998.
- FANG, D. Q. & ROOSE, M. L. Inheritance of intersimple sequence repeat markers in *Citrus*. *J Hered*, v. 90, p. 247-249, 1999.
- FANG, D. Q.; FEDERICI, C. T. & ROOSE, M. L. Development of molecular markers linked to a gene controlling fruit acidity in citrus. *Genome*, v. 40, p. 841-849, 1997.
- FAO QUARTERLY BULLETIN OF STATISTICS. Rome, v.12, n.3/4, p. 152, 1999.
- FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. LUMA gráfica, Brasília, 1996, 220 p.
- FLAMENT, M-H. *et al.* Genetic mapping of resistance factors to *Phytophthora palmivora* in cocoa. *Genome*, v. 44, p. 79-85, 2001.
- FOOLAD, M. R. Unilateral incompatibility as a major cause of skewed segregation in the cross between *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon pennellii*. *Plant Cell Rep*, v. 15, p. 627-633, 1996.
- GADISH, I. & ZAMIR, D. Differential zygotic abortion in an interspecific *Lycopersicum* cross. *Genome*, v. 29, p. 156-159, 1986.
- GARCÍA, M. R.; ASÍNS, M. J. & CARBONELL. QTL analysis of yield and seed number in *Citrus*. *Theor. Appl. Genet.* v. 101, p. 487-493, 2000.

- GARCÍA, M. R. *et al.* Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. *Theor Appl Genet*, v. 99, p. 511-518, 1999.
- GEDIL, M. A. *et al.* An integrated restriction fragment length polymorphism-amplified fragment length polymorphism linkage map for cultivated sunflower. *Genome*, v. 44, p. 213-221, 2001.
- GIOVANNONI, J. J. *et al.* Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations. *Nucleic Acids Res*, v. 19, p. 6553-6558, 1991.
- GMITTER, J. R. *et al.* A localized linkage map of the citrus virus resistance gene region. *Theor Appl Genet*, v. 92, p. 688-695, 1996.
- GUERRA, M. Cytogenetics of Rutaceae. V. High Chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity*, v. 71, p. 234-241, 1993.
- _____. Cytogenetics of rutaceae. II. Nuclear DNA content. *Caryologia*, v. 37, p. 219-226, 1984.
- HANSEN, M. *et al.* Evaluation of AFLP in *Beta*. *Theor Appl Genet*, v. 98, p. 845-852, 1999.
- HELENTJARIS, T. *et al.* Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphism. *Theor Appl Genet*, v. 72, p. 761-769, 1986.
- HEUN, M. *et al.* Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). *Genome*, v. 34, p. 437-447, 1991.
- JARRELL, D. C. *et al.* A genetic maps of *Citrus* based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross. *Theor Appl Genet*, v. 84, p. 49-56, 1992.
- JONES, C. J. *et al.* Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol Breed*, v. 3, p. 381-390, 1997.

- KEIM, P. *et al.* A high-density soybean genetic map based on AFLP markers. *Crop Sci*, v. 37, p. 537-543, 1997.
- KIJAS, J. M. H. *et al.* Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of *Citrus*. *Theor Appl Genet*, v. 94, p.701-706, 1997.
- KIJAS, J. M. H.; FOWLER, J. C. S. & THOMAS, M. R. An evaluation of sequence tagged microsatellites site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. *Genome*, v. 38, p. 349-355, 1995.
- KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen*, v. 12, p. 172-175, 1944.
- KRUTOVSKII, K. V. *et al.* RAPD genome maps of Douglas-Fir. *J Hered*, v.3, p. 197-205, 1998.
- KUHL, J. C.; HANNEMAN Jr., R. E. & HAVEY, M. J. Characterization and mapping of *Rpi1*, a late-blight resistance locus from diploid (1EBN) Mexican *Solanum pinnatisectum*. *Mol Genet Genomics*, v. 265, p. 977-985, 2001.
- LANDER, E. S. *et al.* MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, v. 1, p. 174-181, 1987.
- LARANJEIRA, F. F. *et al.* Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo. *Fitopatologia bras*, v. 23, p.147-154, 1998.
- LARANJEIRA, F. F.; POMPEU Jr., J. & HARAKAVA, R. Seleção de variedades de citros tolerantes e/ou resistentes à clorose variegada dos citros. *Fitopatologia bras*, v. 20, p. 304, 1995.
- LEE R. F. *et al.* Citrus variegated chlorosis: confirmation of a *Xylella fastidiosa* as the causal agent. *Summa Phytopathol*, v. 19, p. 123-125, 1993.

- LESPINASSE, D. *et al.* A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea spp.*) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. *Theor Appl Genet*, v. 100, p. 127-138, 2000.
- LING, P. *et al.* Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. *Theor Appl Genet*, v. 100, p. 1010-1017, 2000.
- LIU, P. C. *A molecular study of the citrus genome through restriction fragment length polymorphism and isozyme mapping*. 1990, 143 f., Dissertation - University of Florida.
- LITT, M. & LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *A J Hum Genet*, v. 44, p. 398-401, 1989.
- LIU, B. H. Statistical genomics. Linkage, mapping and QTL analysis. CRC Press. Boca Raton, 1998, 611 pp.
- LU, Z-X. *et al.* Construction of a genetic linkage map and identification of AFLP markers for resistance to root-knot nematodes in peach rootstocks. *Genome*, v. 41, p. 199-207, 1998.
- LURO, F. *et al.* Genetic mapping of an intergeneric citrus hybrids using molecular markers. *Fruits*, v. 49, p. 404-408, 1994.
- LURO, F. *et al.* Citrus genome mapping with molecular markers: two maps obtained by segregation analysis of progeny of one intergeneric cross. In: International Citrus Congress, 8., Sun City, 1996. Proceedings. Sun City, v.2, p. 862-866, 1996.
- MACHADO, M. A. *et al.* Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. *Euphytica*, v. 92, p. 321-326, 1996.
- MALIEPAARD, C. *et al.* Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: overview and consequences for applications. *Genet Res Camb.* 70:236-250, 1997.

- MARQUES, C. M. *et al.* AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. *Theor Appl Genet*, v. 96, p. 727-737, 1998.
- MEKSEM, K. *et al.* A high-resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol Gen Genet*, v. 249, p. 74-81, 1995.
- MESTRE, P. F. *et al.* Molecular markers flanking citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Theor Appl Genet*, v. 94, p. 458-464, 1997.
- NANDI, S. *et al.* Mapping QTLs for submergence tolerance in rice by AFLP analysis and selective genotyping. *Mol Gen Genet*, v. 255, p. 1-8, 1997.
- NIENHUIS, J. *et al.* Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with insect resistance in tomato. *Crop Science*, v.27, p.797-803, 1987.
- NIKAIDO, A. *et al.* Segregation distortion for AFLP markers in *Cryptomeria japonica*. *Genes Genes Systems*, v. 74, p. 55-59, 1999.
- NIKAIDO, A. *et al.* AFLP and CAPS linkage maps of *Cryptomeria japonica*. *Theor Appl Genet*, v. 100, p. 825-831, 2000.
- OLIVEIRA, A. C. *et al.* Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. *Euphytica*, v. 128, p. 397-403, 2002.
- _____. Identification of sexual and nucellar *Citrus* seedlings through single and duplex PCR of simple sequence repeat locus. v. I, p. 138-141, Proc. Intl. Soc. Citriculture IX Congress, 2000.
- OLIVEIRA, R. P. *Mapeamento de laranja 'Pêra' [Citrus sinensis (L.) Osbeck] e tangerina 'Cravo' (C. reticulata Blanco) por pseudo-testcross*. Piracicaba, ESALQ, 2001. 181 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear aplicada a Agricultura, Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'.
- PAILLARD, M.; LASHERMES, P. & PETIARD, V. Construction of a molecular linkage map in coffee. *Theor Appl Genet*, v. 93, p. 41-47, 1996.

- PAZQUET, J. *et al.* Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene *Run1* in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. *Theor Appl Genet*, v. 103, p. 1201-1210, 2001.
- POWELL, W. *et al.* Analysis of quantitative traits in barley by the use of amplified fragment length polymorphisms. *Heredity*, v. 79, p. 48-59, 1997.
- PRADO, E. E. *Desenvolvimento de mapas de ligação das espécies Citrus grandis (L.) Osbeck (1757) e Citrus aurantifolia Swingle (1913), baseados em marcadores RAPD.* Botucatu, UNESP, 1997. 94 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista.
- QI, X.; STAM, P. & LINDHOUT, P. Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. *Theor Appl Genet*, v. 96, p. 376-384, 1998.
- QUARRIE, S. A. *et al.* QTL analysis to study the association between leaf size and abscisic acid accumulation in droughted rice leaves and comparisons across cereals. *Plant Mol Biol*, v. 35, p. 155-165, 1997.
- REMINGTON, D. L. *et al.* Construction of an genetic map with nearly complete genome coverage in *Pinus taeda*. *Theor Appl Genet*, v. 98, p. 1279-1292, 1999.
- ROCHE, P. *et al.* RFLP and RAPD markers linked to the rosy leaf curling aphid resistance gene (*Sd1*) in apple. *Theor Appl Genet*, v. 94, p. 528-533, 1997.
- RODRIGUEZ MILLA, M. A. & GUSTAFSON, J. P. Genetic and physical characterization of chromosome 4DL in wheat. *Genome*, v. 44, p. 883-892, 2001.
- ROOSE, M. L.; SCHWARZACHER, T. & HESLOP-HARRISON, J. S. The chromosomes of *Citrus* and *Poncirus* species and hybrids: identification of characteristic chromosomes and physical mapping of rDNA loci using in situ hybridization and fluorochrome banding. *J Hered*, v. 89, p. 83-86, 1998.
- ROOSE, M. L.; JARREL, D. C. & KUPPER, R. S. Genetic mapping in *Citrus* x *Poncirus* F₂ population. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, v. 1, p. 210-213, 1992.

- ROOSE, M. L. *et al.* Mapping the Citrus genome. In: R. GOREN and E.E. GOLDSCHMIDT (eds). Proceedings of the International Symposium on Citrus Biotechnology, 1. 2000. *Acta Horticulturae*, v.535, p. 25-32, 2000.
- ROUPPE VAN DER VOORT, J. N. A. M. *et al.* Use of allele specificity of comigrating AFLP markers used to align genetic maps from different potato genotypes. *Mol Gen Genet*, v. 255, p. 438-447, 1997.
- SAIKI, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v. 239, p. 487-491, 1988.
- SALIBA-COLOMBANI, V. *et al.* Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. *Genome*, v. 43, p. 29-40, 2000.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. E. & MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- SANKAR, A. A. & MOORE, G. A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of the linkage map. *Theor Appl Genet*, v. 102, p. 206-214, 2001.
- SHIELDS, D. C. *et al.* Error filtration, interference, and the human linkage map. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 88, p. 6501-6505, 1991.
- SILVA, H. D. *Aspectos Biométricos da Detecção de QTL's (Quantitative Trait Loci)" em Espécies Cultivadas*. Piracicaba, ESALQ, 2001. 147 p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'.
- SIVIERO, A. *Avaliação de métodos de inoculação de Phytophthora parasítica e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de Citrus sunki vs. Poncirus trifoliata à gomose*. Botucatu, UNESP, 2001. 117 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista.
- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. & DOYLE, J. J. Molecular systematics of plants. II. DNA sequencing. Kluwer Academic Publishers. Norwell, Mass. 1998.

- SOOST, R. K. & CAMERON, J. W. *Citrus*. In: JANICK, J. & MOORE, J. N. Advances in Fruit Breeding. Purdue Univ. Press, Indiana, 1975, p. 507-540.
- STEEL, R. G. D. & TORRIE, J. H. Principles and procedures of statistics, A biometrical approach. 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., New York. 1980.
- TORRES, A. M. *et al.* Segregation distortion and linkage of *Citrus* and *Poncirus* isozyme genes. *The Journal of Heredity*, v. 76, p. 289-294, 1985.
- TOZLU, I.; GUY, C. L. & MOORE, G. A. QTL analysis of Na⁺ and Cl⁻ accumulation related traits in an intergeneric BC₁ progeny of *Citrus* and *Poncirus* under saline and nonsaline environments. *Genome*, v. 42, p.692-705, 1999a.
- _____. QTL analysis of morphological traits in an intergeneric BC₁ progeny of *Citrus* and *Poncirus* under saline and nonsaline environments. *Genome*, v.42, p.1020-9, 1999b.
- VAN ECK, H. J. *et al.* The inheritance and chromosomal localisation of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol Breed*, v. 1, p. 397-410, 1995.
- van OOIJEN, J. W. Draw Map: a computer program for drawing genetic linkage maps. *J Hered*, v. 85, p. 66, 1994.
- _____ & VOORRIPS, R. E. JoinMapTM version 3.0; *software* for the calculation of genetic linkage maps. Wageningen: Plant Research International, 2001. 51 p.
- VOS, P. *et al.* AFLP: a new technique for DNA *fingerprinting*. *Nucleic Acids Res.* v. 23, p. 4407-14, 1995.
- VUYLSTEKE, M. *et al.* Two high-density AFLP linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. *Theor Appl Genet*, v. 99, p. 921-935, 1999.
- WEBER, C. A. *Mapping cold tolerance quantitative trait loci in a Citrus grandis x Poncirus trifoliata F₁ pseudo-testcross population using molecular markers and*

- evaluation of homology with a related population map*. 1999. Dissertation, University of Florida, Gainesville.
- WELLS, J. M. *et al.* *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *Intern J of Syst Bacteriology*, v. 37, p. 136-143, 1987.
- WILLIAMS, J. G. K. *et al.* DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- YOUNG, W. P.; SCHUPP, J. M. & KEIM, P. DNA methylation and AFLP marker distribution in the soybean genome. *Theor Appl Genet*, v. 99, p. 785-792, 1999.
- ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA *fingerprinting*. European Patent Application N° 0534858 A1. 1993.
- ZAMIR, D. & TADMOR, Y. Unequal segregation of nuclear genes in plants. *Bot Gaz*, v. 147, p. 355-358, 1986.
- ZIMNOCH-GUZOWSKA, E. *et al.* QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* spp. *Atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP, and resistance-gene-like markers. *Crop Sci*, v. 40, p. 1156-1167, 2000.

6.9. Tabelas

Tabela 1. Geração de marcadores fAFLP em citros de acordo com o conteúdo CpG das extensões nucleotídicas seletivas dos *primers* *EcoRI* e *MseI*.

Conteúdo GC	TM ^[6]	TME ^[7]	TMM ^[8]
A (33,3%) ^[1]	25,3 ± 13,6	13,5 ± 6,6	7,2 ± 4,6
B (50%) ^[2]	19,4 ± 8,7	9,3 ± 6,1	4,0 ± 3,5
C (66,6%) ^[3]	18,5 ± 7,7	6,6 ± 3,2	2,8 ± 2,2
Teste de médias A x B ^[4]	0,0715 ^{ns}	0,0240*	0,0086*
Teste de médias A x C	0,0507 ^{ns}	0,0008*	0,0015*
Teste de médias B x C	0,3690 ^{ns}	0,0322*	0,1076 ^{ns}
Análise de correlação entre quantidade de CG e de fAFLPs amplificados ^[5]	r = -0,25 (p = 0,0651 ^{ns})	r = -0,41 (p = 0,0017*)	r = -0,42 (p = 0,0014*)

Observações: ^[1] presente em 15 combinações de *primers*; ^[2] presente em 27 combinações de *primers*; ^[3] presente em 14 combinações de *primers*; ^[4] teste *t* de comparação de médias, adotando-se nível de significância (α) de 0,05; ^[5] magnitude, sentido e significância da correlação, estimadas pelo coeficiente de correlação linear de Pearson (*r*); ^[6] TM (taxa multiplex) = número de fAFLPs amplificados; ^[7] TME (taxa multiplex efetiva) = número de marcadores que segregam na população segregante e ^[8] TMM (taxa multiplex mapeada) = número de marcadores polimórficos e mapeados.

Tabela 2. Distribuição dos marcadores fAFLPs com segregação mendeliana 1:1 sobre os grupos de ligação do mapa de tangor ‘Murcott’, construído pelo Mapmaker.

<i>Grupos Ligação (GLs)</i>	<i>Tamanho (cM)</i>	<i>Distr. dos intervalos de ligação</i>	<i>Quantidade observada de fAFLPs</i>	<i>Quantidade esperada fAFLPs</i>
I	252,6	0,92 ^[1]	11	9,95 ^[2]
II	223,8	0,30	10	8,81
III	310,7	0,045*	12	12,23
IV	256,9	0,070	10	10,12
V	185,1	0,30	6	7,29
VI	92,6	— ^[3]	4	3,64
VII	110,1	-	4	4,33
VIII	114,3	-	4	4,5
IX	104,4	-	4	4,11
Correlação entre tamanho e quantidade de fAFLPs dos GLs ^[4]				r = 0,97 (p < 0,0001)
Diferença entre o número de fAFLPs observados e esperados nos GLs ^[5]				0,92 ^{ns}

Observações: ^[1] teste do ajuste de normalidade da extensão dos intervalos de ligação para loci adjacentes (H_0 : extensão dos intervalos de ligação segue distribuição normal; H_1 : extensão dos intervalos de ligação não segue distribuição normal), avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, conforme Krutovskii *et al.* (1998); ^[2] a quantidade esperada de fAFLPs foi estimada por meio da multiplicação entre a porcentagem relativa do comprimento do GL e o número total de marcadores mapeados, conforme Castiglioni *et al.* (1999); ^[3] quantidade de intervalos entre marcas insuficientes para se avaliar distribuição normal das mesmas; ^[4] magnitude e significância da correlação estimadas pelo coeficiente de correlação linear de Pearson (r); ^[5] teste de hipótese entre o número de fAFLPs observado e o esperado nos GLs (H_0 : quantidades observadas não diferem das quantidades esperadas de fAFLPs nos GLs; H_1 : quantidades observadas diferem das quantidades esperadas de fAFLPs nos GLs, avaliadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (amostras independentes)).

Tabela 3. Distribuição dos marcadores fAFLPs com segregação mendeliana 1:1 sobre os grupos de ligação do mapa de laranja 'Pêra', construído pelo Mapmaker.

<i>Grupos Ligação (GLs)</i>	<i>Tamanho (cM)</i>	<i>Distr. dos intervalos de ligação</i>	<i>Quantidade observada de fAFLPs</i>	<i>Quantidade esperada fAFLPs</i>
I	464,4	0,53 ^[1]	15	15,84 ^[2]
II	310,7	0,14	12	10,77
III	231,5	0,76	10	7,9
IV	366	0,08	10	12,49
V	239,5	0,42	8	8,17
Correlação entre tamanho e quantidade de fAFLPs dos GLs ^[3]				0,82 (p = 0,08 ^{ns})
Diferença entre o número de fAFLPs observados e esperados nos GLs ^[4]				0,86 ^{ns}

Observações: ^[1] teste do ajuste de normalidade da extensão dos intervalos de ligação para loci adjacentes (H₀: extensão dos intervalos de ligação segue distribuição normal; H₁: extensão dos intervalos de ligação não segue distribuição normal) avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, conforme Krutovskii *et al.* (1998); ^[2] a quantidade esperada de fAFLPs foi estimada por meio da multiplicação entre a porcentagem relativa do comprimento do GL e o número total de marcadores mapeados, conforme Castiglioni *et al.* (1999); ^[3] magnitude e significância da correlação estimadas pelo coeficiente de correlação linear de Pearson (r); ^[4] teste de hipótese entre o número de fAFLPs observado e o esperado nos GLs (H₀: quantidades observadas não diferem das quantidades esperadas de fAFLPs nos GLs; H₁: quantidades observadas diferem das quantidades esperadas de fAFLPs nos GLs), avaliadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (amostras independentes).

Tabela 4. Distribuição dos marcadores fAFLPs com segregação mendeliana 1:1 e 3:1 sobre os grupos de ligação do mapa de tangor ‘Murcott’ construídos pelo JoinMap.

<i>Grupos Ligação (GLs)</i>	<i>Tamanho (cM)</i>	<i>Distr. dos intervalos de ligação</i>	<i>Quant. observada (QO) de fAFLPs</i>	<i>Quant. esperada (QE) de fAFLPs</i>	<i>Dif. (Δ) entre QO e QE</i>	<i>Quociente Δ/QE (%)</i>
I	85	0,008 ^{[1]*}	29	22,83 ^[2]	6,17	27,02
II	102	0,009*	37	27,4	9,6	35,03
III	118	0,008*	45	31,7	13,3	41,95
IV	110	0,007*	26	29,55	-3,55	-12,01
V	48	0,013*	14	12,9	1,1	8,52
VI	170	0,007*	24	45,67	-21,67	-47,45
VII	77	0,009*	15	20,69	-5,69	-27,50
VIII	61	0,009*	13	16,38	-3,38	-20,63
IX	74	0,001*	24	19,87	4,13	20,78

Correlação entre tamanho e quantidade de fAFLPs dos GLs^[3]

$r = 0,50$

($p = 0,17^{ns}$)

Diferença entre o número de fAFLPs observados e esperados nos GLs^[4]

$p = 0,024^*$

Observações: ^[1] teste do ajuste de normalidade da extensão dos intervalos de ligação para loci adjacentes (H_0 : extensão dos intervalos de ligação segue distribuição normal; H_1 : extensão dos intervalos de ligação não segue distribuição normal) avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, conforme Krutovskii *et al.* (1998); ^[2] a quantidade esperada de fAFLPs foi estimada por meio da multiplicação entre a porcentagem relativa do comprimento do GL e o número total de marcadores mapeados, conforme Castiglioni *et al.* (1999); ^[3] magnitude e significância da correlação estimadas pelo coeficiente de correlação linear de Pearson (r); ^[4] teste de hipótese entre o número de fAFLPs observado e o esperado nos GLs (H_0 : quantidades observadas não diferem das quantidades esperadas de fAFLPs nos GLs; H_1 : quantidades observadas diferem das quantidades esperadas de fAFLPs nos GLs), avaliadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (amostras independentes).

Tabela 5. Número de marcadores fAFLPs estimado para se alcançar a saturação dos mapas de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’ [tamanho do genoma (K) = 1700 cM].

<i>Mapa(s) genético(s)</i>	<i>P</i> ^[1]	<i>c</i> ^[2] (cM)	<i>n</i> ^[3]
‘Murcott’ (fAFLPs 1:1)	0,90	20	121
‘Murcott’ (fAFLPs 1:1 e 3:1)	0,90	10	488

Observações: ^[1] probabilidade de cobertura genômica; ^[2] distância máxima desejada entre AFLPs adjacentes; ^[3] número máximo de marcadores esperados, onde $n = [\log(1-p)/\log(1 - c/k)].1,25$, conforme Beckman & Soller (1983) e Krutovskii *et al.* (1998).

6.10. Quadro

Quadro 1. Sumário das principais características dos mapas de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’, construídos com marcadores fAFLP de segregação mendeliana 1:1 e do mapa de tangor ‘Murcott’, construído com fAFLP de segregação 1:1 e 3:1.

Característica do mapa	Tangor ‘Murcott’ (fAFLPs 1:1)	Laranja ‘Pêra’ (fAFLPs 1:1)	Tangor ‘Murcott’ (fAFLPs 1:1 e 3:1)
Frequência recombinação Máxima	$\leq 0,40$	$\leq 0,40$	$\leq 0,25$
LOD score mínimo	$\geq 3,0$	$\geq 3,0$	$\geq 3,0$
Número de grupos de ligação	9	5	9
Tamanho total dos grupos de ligação (cM)	1651,47	1596,2	845
Número total de marcadores fAFLPs empregado na construção do mapa	96	106	347
Número total de marcadores mapeados	65	55	227
Razão do número total de marcadores mapeados/total de marcadores polimórficos	67,70%	51,88%	65,41%
Porcentagem de marcadores fAFLPs sem distorção de segregação, mapeada	75,75%	72,72%	94,27%
Porcentagem de marcadores fAFLPs com distorção de segregação, mapeada	24,25%	27,29%	5,73%
Número total de marcadores não mapeados	31	51	120
Porcentagem de marcadores fAFLPs sem distorção de segregação, não mapeada	83,87	72,54	55
Porcentagem de marcadores fAFLPs com distorção de segregação, não mapeada	16,12	27,46	45
Distância média entre locos adjacentes (cM) ^[1]	$29,47 \pm 9,02$	$31,92 \pm 11,63$	$4,25 \pm 4,89$

Observação: ^[1] A distância média entre marcadores AFLPs adjacentes foi calculada pela divisão da soma do comprimento dos grupos de ligação pelo número de intervalos.

6.11. Figuras



Figura 1. Perfil da imagem do gel fAFLP de citros após eletroforese no seqüenciador de DNA ABI 377 (PE) de alíquotas de reações AFLPs a partir dos pares de *primers* E-ACG/M-CAA (*amplicons* em verde) e E-ACT/M-CAA (*amplicons* em azul). *Amplicons* marcados em vermelho: GeneScan-500 ROX.

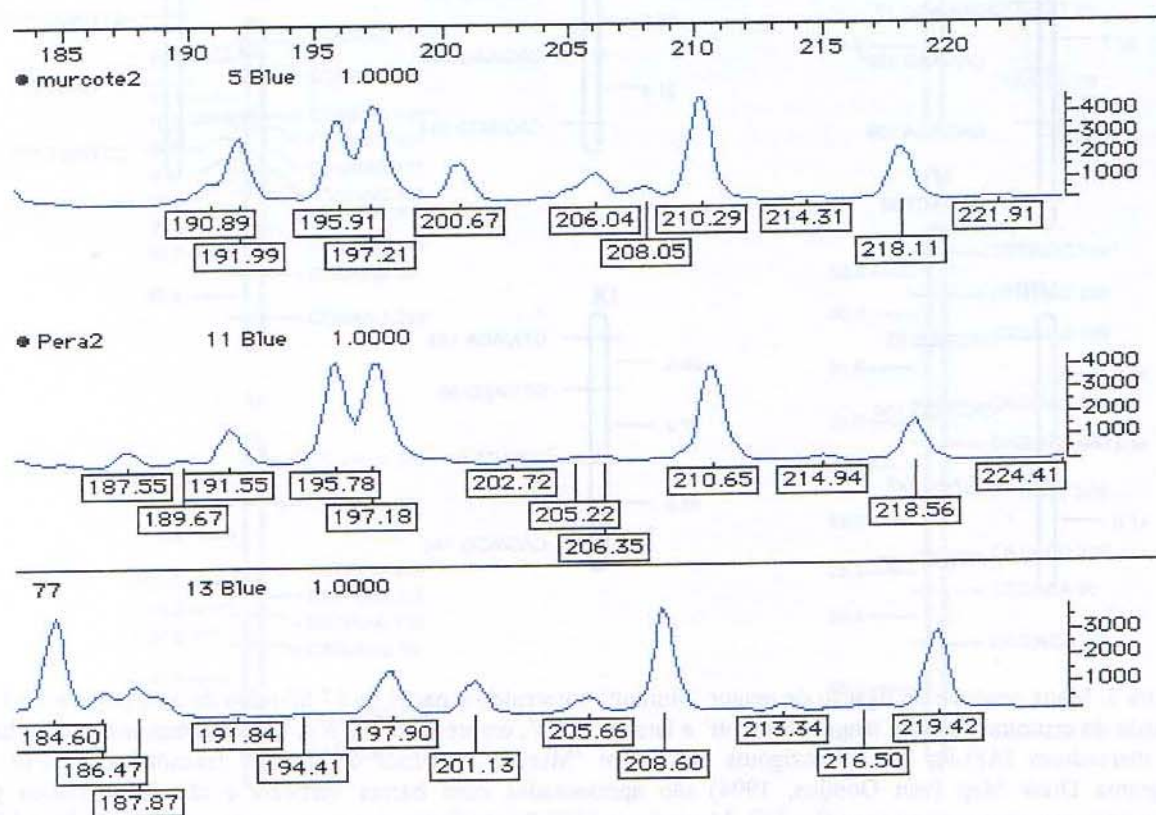


Figura 2. Eletroferograma de fAFLPs (faixa de 180-230 pb), contendo marcador AFLP (201 pb) polimórfico em tangor 'Murcott', em laranja 'Pêra' e no híbrido 77, obtido da amplificação com os *primers* E-ACT/M-CAA. Os números abaixo dos picos indicam o peso molecular, em pb, de cada fAFLP. Escalas verticais a direita exibem a intensidade relativa do sinal de fluorescência dos fAFLPs.

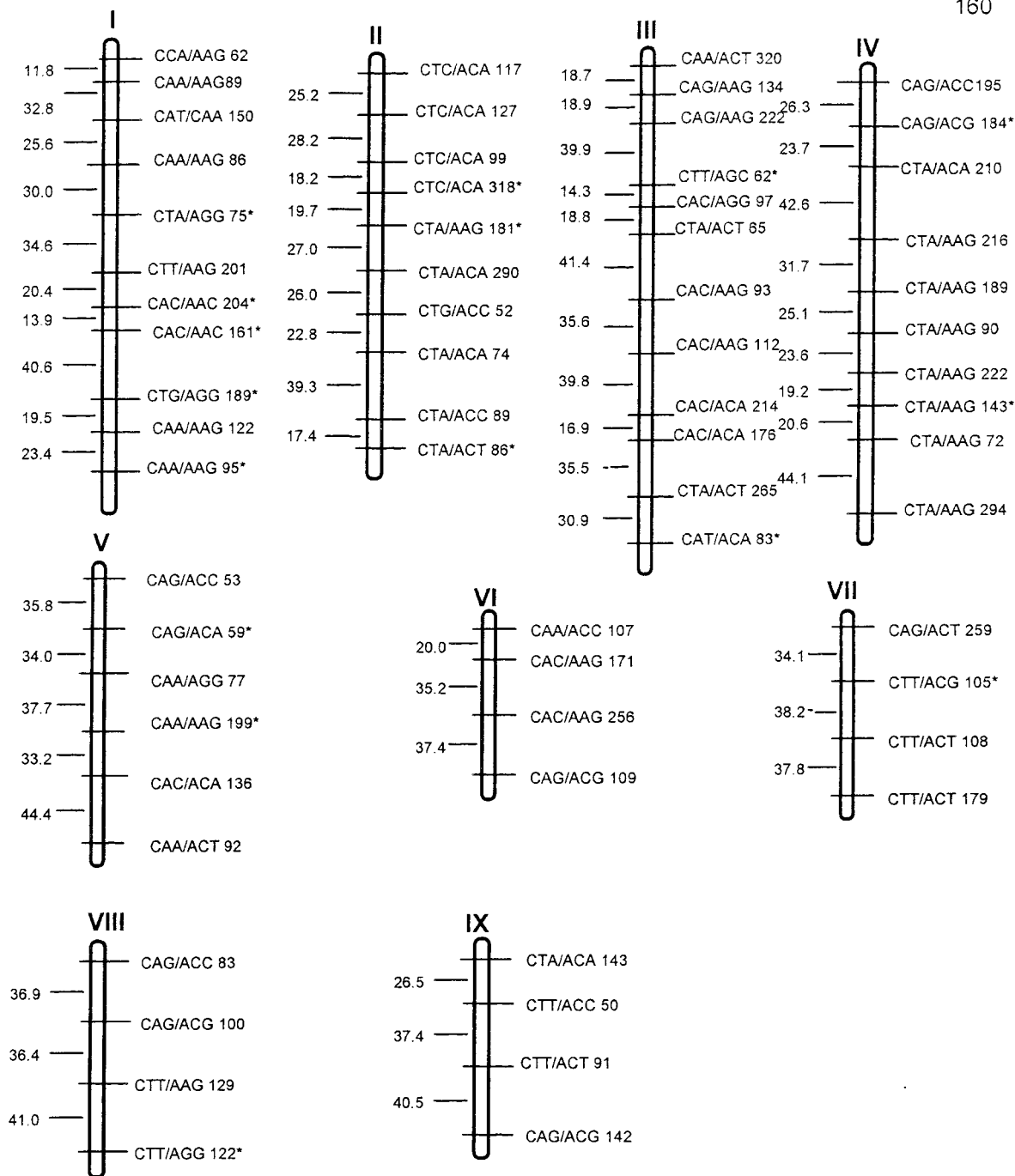


Figura 3. Mapa genético de ligação de tangor 'Murcott' construído a partir de 87 híbridos de uma população BC₁ oriunda do cruzamento entre tangor 'Murcott' e laranja 'Pêra', empregando-se o aplicativo Mapmaker, com base em marcadores fAFLPs 1:1 heterozigotos em tangor 'Murcott'. Grupos de ligação desenhados a partir do programa Draw Map (van Ooijen, 1994) são apresentados com barras verticais e são identificados por algarismos romanos em seu topo (I a IX). Marcadores fAFLPs são indicados pelo par de primers *EcoRI* e *MseI* empregado na amplificação do DNA. À direita da representação dos grupos de ligação, encontram-se listados os marcadores fAFLPs que co-segregam juntos. À esquerda dos mesmos, é relacionada a distância em centimorgans (cM) (função Kosambi) de cada par de marcadores fAFLPs. Marcadores que apresentam desvios de segregação mendeliana ($0,05 < p < 0,01$) são identificados com asterisco (*).

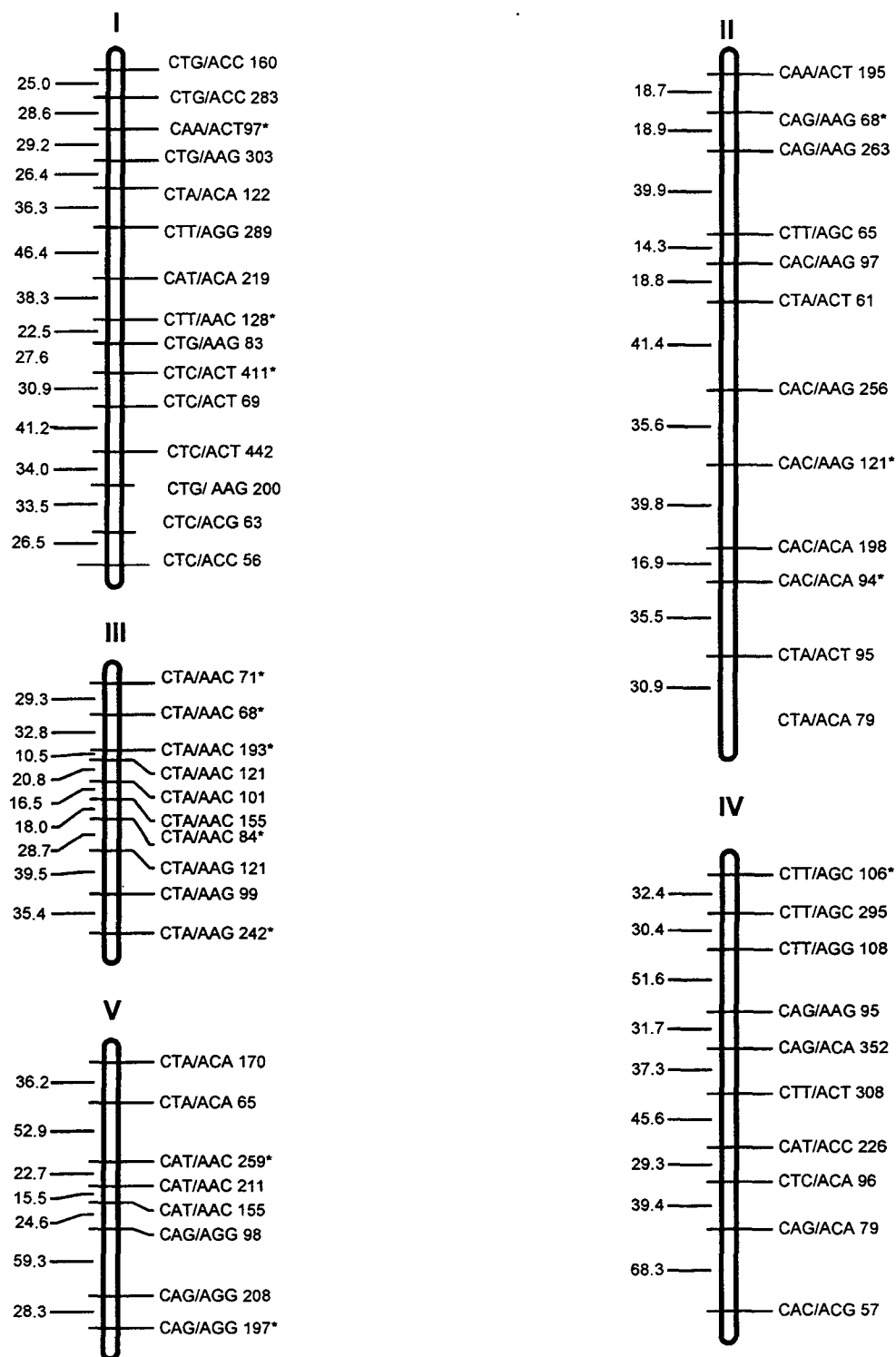


Figura 4. Mapa genético de ligação de laranja 'Pêra' construído a partir de 87 híbridos de uma população BC₁ oriunda do cruzamento entre tangor 'Murcott' e laranja 'Pêra', empregando-se o aplicativo Mapmaker, com base em marcadores fAFLPs 1:1 heterozigotos em laranja 'Pêra'. Grupos de ligação desenhados a partir do programa Draw Map (van Ooijen, 1994) são apresentados com barras verticais e são identificados por algarismos romanos em seu topo (I a V). Marcadores fAFLPs são indicados pelo par de *primers* *EcoRI* e *MseI* empregado na amplificação do DNA. À direita da representação dos grupos de ligação, encontram-se listados os marcadores fAFLPs que co-segregam juntos. À esquerda dos mesmos, é relacionada a distância em centimorgans (cM) (função Kosambi) de cada par de marcadores fAFLPs. Marcadores que apresentam desvios de segregação mendeliana ($0,05 < p < 0,01$) são identificados com asterisco (*).

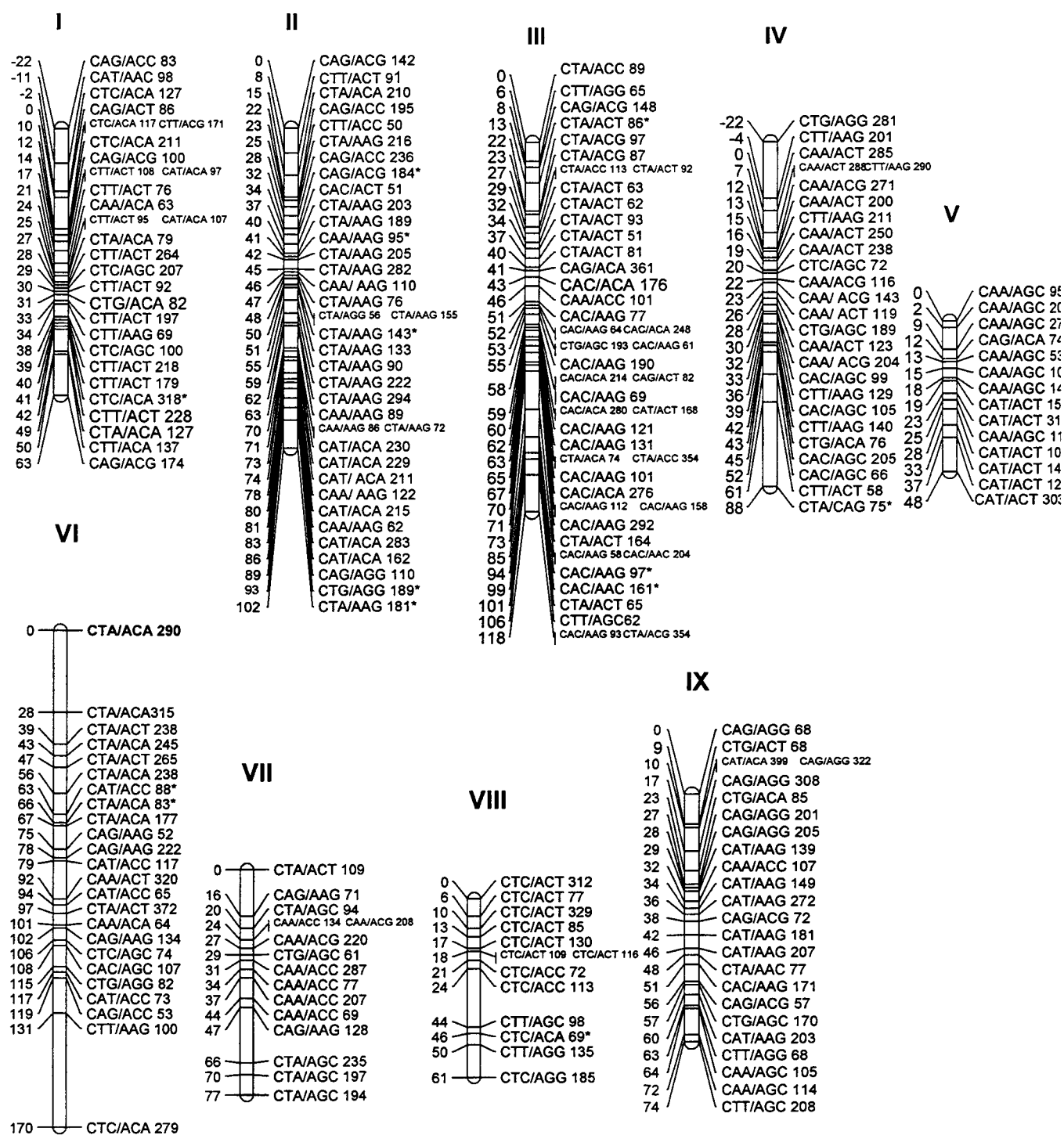


Figura 5. Mapa genético de ligação de tangor 'Murcott' construído a partir de 87 híbridos de uma população BC₁ oriunda do cruzamento entre tangor 'Murcott' e laranja 'Pêra', empregando-se o aplicativo JoinMap, com base em marcadores fAFLPs 1:1, heterozigotos em tangor 'Murcott', e 3:1 (configuração Aa x Aa). Grupos de ligação são apresentados por barras verticais e são identificados por algarismos romanos em seu topo (I a IX). Marcadores fAFLPs são indicados pelo par de *primers* *Eco*RI e *Mse*I empregado na amplificação do DNA. À direita da representação dos grupos de ligação, encontram-se listados os marcadores fAFLPs que co-segregam juntos. À esquerda dos mesmos, é relacionada a distância acumulativa em centimorgans (cM) (função Kosambi) de cada par de marcadores fAFLPs. Marcadores fAFLPs de segregação 1:1 que apresentam desvios de segregação mendeliana ($0,05 < p < 0,01$) são identificados com asterisco (*).

Capítulo 7

Mapeamento genético de QRLs de citros à *Xylella fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros.

Capítulo 7

Mapeamento genético de QRLs de citros à *Xylella fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros

Antonio Carlos de Oliveira^[1] & Marcos Antônio Machado^[2]

^[1] Departamento de Genética e Evolução, UNICAMP, C.P. 6109 C.E.P. 13081-970 Campinas, São Paulo; ^[2] CAPTA Citros ‘Sylvio Moreira’/IAC, C.P. 04 C.E.P. 13490-000 Cordeirópolis, São Paulo.

7.1. Resumo

A clorose variegada dos citros (CVC), acarretada pela *Xylella fastidiosa* Wells (1987) (*Xf*), constitui uma das principais bacterioses da atual citricultura brasileira. A sintomatologia da CVC é associada ao entupimento do xilema, decorrente da multiplicação da bactéria no interior desses vasos, acarretando a obstrução de água e sais minerais para as folhas, prejudicando a fotossíntese. Uma análise de QRL (*quantitative resistance loci*) de citros à *Xf* foi realizada em 87 híbridos BC₁ entre tangor ‘Murcott’ [*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osb] e laranja ‘Pêra’ [*C. sinensis* (L.) Osb.], variedades cítricas resistente e suscetível à *Xf*, respectivamente, para as quais mapas genéticos de fAFLPs haviam sido anteriormente construídos. Soluções estéreis ou contendo suspensão de 10⁸ UFC/ml de *Xf* foram inoculadas em mudas de plantas da população-mapa (87 híbridos e os dois parentais) através de perfuração mecânica com agulha. Decorridos 10 meses após a inoculação, as plantas foram fisiologicamente analisadas quanto a trocas gasosas, a partir da mensuração das variáveis assimilação líquida de CO₂ (*A*); condutância estomática (*gs*); concentração de CO₂ interno (*C_i*) e transpiração (*E*) em folhas maduras intactas de plantas acondicionadas em câmara de crescimento (densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 1000 μmol.m⁻².s⁻¹ e déficit de pressão de vapor de 2,5 kPa), empregando analisador portátil de trocas gasosas por radiação infra vermelho (LICOR - Li 6400). Adicionalmente, para as plantas que foram inoculadas com suspensão de *Xf*, a capacidade de multiplicação da bactéria no interior do xilema foliar (‘quantificação de *X. fastidiosa*’, variável QXF) foi mensurada,

adotando-se uma variante do diagnóstico molecular por PCR da *Xf*, denominada PCR quantitativo em tempo real (*real-time quantitative* PCR, RTQ-PCR). A progênie expressiu uma resposta diferencial precoce à inoculação de *Xf*, segregando, sob a forma de distribuição contínua, para a maioria dos caracteres avaliados, sugerindo possível controle poligênico para os aspectos de resistência/suscetibilidade precoce avaliados quanto à colonização da bactéria. As médias das variáveis foram utilizadas na localização de regiões genômicas associadas à resposta diferencial precoce de resistência e suscetibilidade das plantas inoculadas com a bactéria, através do método de mapeamento por intervalo composto, empregando-se o aplicativo QTL Cartographer v.2.0 e por meio de análise pontual de marcadores (teste *t* bilateral). Dois QRLs de citros à *Xf* foram identificados e mapeados nos grupos de ligação V (*Xf*-A1), relativo à variável *A* e no grupo de ligação IV (*Xf*-QXF), relativo à variável QXF do mapa de tangor ‘Murcott’. Esses dois QRLs foram responsáveis, respectivamente, por 13,53% e 12,66% da variação fenotípica total da resistência precoce de tangor ‘Murcott’ à inoculação com *Xf*. Análise pontual de marcadores revelou, ainda, seis QRLs putativos (PQRLs) para as variáveis *A*, *E* e QXF. A saturação do mapa de tangor ‘Murcott’ permitirá, possivelmente, a identificação de outros QRLs à *Xf*, e a saturação específica das regiões genômicas em que se localizam os dois QRLs já identificados resultará *primers* flaqueadores cada vez mais próximos a esses QRLs que, eventualmente, poderão ser empregados em uma seleção assistida por marcador de genótipos de citros resistentes à CVC.

7.2. Abstract

The citrus variegated chlorosis (CVC), caused by the *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987) (*Xf*), is a major bacterial disease of the Brazilian citrus industry. The main symptoms of CVC are associated to the blockage of xylem vessels caused by the bacterial multiplication, which leads to an obstruction of water and mineral salts to the leaves and then a reduction of photosynthesis. The analysis of quantitative resistance loci (QRL) of citrus against *Xf* was performed using 87 hybrids from BC1 between ‘Murcott’ tangor [*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osb] and ‘Pera’ sweet orange [*C. sinensis* (L.) Osb.], varieties that are resistant and susceptible, respectively,

and to which fAFLP was previously used for genetic linkage mapping. Sterile solution as well as suspensions with 10^8 colony-forming units per ml of *Xf* were inoculated in young plants collected from the mapping-population (87 hybrids and 2 parents) through mechanical inoculation using needles. Nine months after inoculations, all plants were analyzed for gas exchange, by measuring of CO₂ uptake (*A*); stomatal conductance (*gs*), concentration of internal CO₂, and transpiration (*E*) of fully expanded leaves from plants kept under greenhouse conditions ($1000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ of photosynthetic photon flux density and 2,5 kPa of vapor pressure deficit), by means of the use of a portable photosynthesis system (Li-Cor Model LI-6400). In addition, for those plants that were inoculated with bacterial suspension, the capacity of multiplication inside the foliar xylem (“quantification of *X. fastidiosa*”, QXF variable) was measured by adapting a variant of the molecular diagnostic of *Xf* by PCR, named real-time quantitative PCR (RTQ-PCR). The progeny expressed an early differential response to the inoculations with *Xf*, with segregation, as a continuous distribution, for most of the traits evaluated during the assay, suggesting a probable polygenic inheritance for early resistance/susceptibility responses evaluated for the bacterial colonization. The means of the variables were used for the localization of genomic regions associated to the early differential response of resistance and susceptibility to the bacteria, using of a method of mapping by composite interval mapping, with the QTL Cartographer v.2.0. software and by means of a localized analysis of markers (bilateral *t* test). Two QRLs of citrus to *Xf* were identified and mapped in linkage groups V (*Xf*-A1), related to the *A* and *IV* variables (*Xf*-QXF), related to the QXF variable from the Murcott tangor map. These two QRLs were responsible, respectively, for 13.52% and 12.66% of the total phenotypical variation of the early response of Murcott tangor to the inoculation with *Xf*. The individual analysis of these markers revealed 6 putative QRLs (PQRLs) for the *A*, *E* and QXF variables. The map saturation of the Murcott tangor will possibly allow the identification of other QRLs to *Xf* and the specific saturation of genomic regions where the two already identified QRLs will result in flanking *primers* even closer to these QRLs and, eventually, will be used in an marker-assisted selection of citrus genotypes resistant against CVC.

7.3. Introdução

Dentre os âmbitos da atual agroindústria brasileira, a cultura de citros (*Citrus spp.*) distingue-se pela sua expressiva importância sócio-econômica (Moreira & Moreira, 1991), respondendo a citricultura paulista por 76% da produção nacional (Amaro, 1999).

Um dos principais problemas fitossanitários da atual citricultura brasileira é a clorose variegada dos citros (CVC) (Feichtenberger *et al.*, 1997), bacteriose provocada pela *Xylella fastidiosa* Wells (1987) (*Xf*) (Chang *et al.*, 1993). A *Xf* vive estritamente no xilema de plantas hospedeiras (Bové & Garnier, 2002). Árvores de laranjeiras sintomáticas da CVC produzem frutos pequenos de casca enrijecida, inviáveis para o consumo ‘*in natura*’ e/ou extração de suco (Beretta *et al.*, 1992). Quanto mais cedo a árvore for infectada pela *Xf*, maior será seu período de inviabilidade econômica (Salva *et al.*, 1995).

Os mecanismos de patogenicidade da *Xf* em citros não foram ainda completamente elucidados. Evidências experimentais suportam a hipótese de que a colonização da *Xf* no interior do xilema de laranjeiras acarreta redução de condutividade hidráulica xilemática, diminuição do estado de hidratação foliar e da abertura estomática, o que restringe a entrada de moléculas de CO₂ atmosférico no mesófilo, acarretando decréscimo da capacidade fotossintética (Machado *et al.*, 1994; Habermann, 1999; Oliveira *et al.*, 2000; Medina, 2002) e, conseqüentemente, queda do estado energético, i.e. menor acúmulo de amido (Gomes, 2001). Além da queda da taxa de assimilação de CO₂, plantas com CVC apresentam redução na eficiência intrínseca da fotossíntese, sinalizando algum comprometimento do metabolismo foliar fotossintético (Habermann, 1999).

Diferentes estratégias que visam ao convívio com a CVC vêm sendo estudadas, tendo em vista que se trata de uma doença bacteriana, vascular, de caráter sistêmico, de sintomatologia inespecífica, sem possibilidade de controle químico imediato do fitopatógeno. Emprego de interenxertos entre as variedades porta-enxerto e copa (Ribeiro *et al.*, 1999), aplicação de ativadores de resistência a fitopatógenos em plantas com CVC (Calegari & Castro, 2000), descoberta de antagonistas efetivos para controle biológico da *Xf*/CVC (Araújo *et al.*, 2002) e de seus insetos vetores (Gravena *et al.*, 1997) e poda de eliminação de fonte de inóculo (ramos e galhos sintomáticos) (Rodas,

1994) foram reportados. Aliado a isso, tendo em vista que o agente etiológico da CVC é uma bactéria, obtém-se a eliminação da *Xf* em material de propagação vegetativa, como as borbulhas, permitindo aos citricultores o estabelecimento de novos pomares cítricos livres da CVC nos primeiros anos do crescimento das plantas.

O plantio de variedades resistentes é considerado o único meio viável de controle da CVC (Lima, 1995), tendo em vista que a doença já se tornou endêmica no estado de São Paulo (Salva *et al.*, 1995). Enquanto não aparecerem variedades resistentes, a poda de ramos e galhos com CVC é o principal mecanismo de convivência à *Xf*, o que vem assegurando a continuidade da atividade citrícola (Rodas, 1994). Contudo, essa prática de convivência com a CVC acarreta, juntamente com o replantio de mudas sadias, o aumento no custo operacional de produção e redução de 30% da produção média de frutos (AGRIANUAL, 1999), acarretando prejuízos que ultrapassaram US\$ 100 milhões à cadeia produtiva paulista de citros somente em 2000 (Ayres, 2001).

Variedades de laranjeiras resistentes à *Xf* não são disponíveis nas coleções de germoplasma de citros (Pompeu Jr *et al.*, 1998). Alguns híbridos resistentes à *Xf* já foram gerados (Laranjeira, 1997b), contudo, até o momento, híbridos de laranja doce resistentes a esse fitopatógeno não foram obtidos (Mourão Filho *et al.*, 1997), incluindo a variedade laranja ‘Pêra’ que ocupa, sozinha, 41% dos pomares do estado de São Paulo (Amaro *et al.*, 1997).

Hibridação sexual pode resultar genótipos superiores quanto à resistência a *Xf*. Recentemente foi descrito o tangor ‘Victória’, híbrido natural entre tangerineira e laranjeira descoberto em um pomar da região sul de São Paulo. Esse híbrido apresenta tolerância à CVC, características hortícolas de copas similares às de laranja doce, maturação de fruto muito precoce e produção de suco em quantidade e de boa qualidade (Li, 1997).

Haja vista que a síntese de híbridos de citros requer escolha de parentais com caracteres favoráveis ao melhoramento genético (Hearn *et al.*, 1974), e que, uma vez obtido um híbrido de laranjeira resistente à *Xf*, esse deve apresentar qualidade de suco compatível às variedades de laranjeiras comerciais para o seu amplo cultivo pelos citricultores, cruzamentos entre laranja ‘Pêra’ e variedades híbridas de tangerina e laranja, como é o caso do tangor ‘Murcott’, constituem materiais genéticos fortemente

promissores, face às suas excelentes características hortícolas (Figueiredo *et al.*, 1997) e por apresentar elevada resistência à *Xf* (Laranjeira *et al.*, 1998).

Considerando que (i) a mensuração dos danos da infecção e multiplicação do fitopatógeno na capacidade fotossintética das plantas é um aspecto fundamental em estudos fitopatológicos (Boote *et al.*, 1993); (ii) o nível ideal de avaliação da resistência de plantas a doenças é a quantificação do fitopatógeno, presente em um dado momento na planta hospedeira (Vale *et al.*, 2001), o presente trabalho objetivou estimar o número, posições genômicas e magnitude de efeitos de potenciais associações significativas entre marcadores moleculares a QRLs de citros à *Xf*, envolvidos quanto à (a) reduzidas quedas de trocas gasosas e relações hídricas foliares e/ou (b) elevada capacidade de inibição da multiplicação da *Xf* em plantas de uma população-mapa anteriormente empregada na construção de mapas genéticos das variedades de tangor ‘Murcott’ e laranja doce ‘Pêra’ (Oliveira *et al.*, dados não publicados).

7.4. Material e métodos

Material genético vegetal e multiplicação vegetativa

Com vistas à obtenção de dados fenotípicos replicados, foi empregada multiplicação vegetativa dos 87 híbridos BC₁ de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’, utilizados na construção de mapas genéticos dessas variedades cítricas (Oliveira *et al.*, dados não publicados). Borbulhas sadias removidas de plantas da população-mapa (87 híbridos e os dois parentais) foram enxertadas no caule de mudas de porta-enxerto de limão-cravo (*Citrus limonia* Osb.), com oito meses de idade. O local da enxertia foi protegido por uma cobertura de fitilho durante vinte dias. As plantas de limão cravo enxertadas foram mantidas em sacos plásticos de polietileno, com capacidade de 3,8 litros de substrato a base de areia, terra e plantimax para citros, as quais foram postas para crescer em telado de 160 m² (20m x 8m x 3m), provido de antecâmara para evitar a passagem de insetos para o interior do telado e coberta com tela anti-afídeo (nylon com malha de 2mm) que impedia a entrada de cigarrinhas da CVC, especialmente construída para esse fim no Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’/IAC, Cordeirópolis, SP, Brasil. O telado anti-afídeo, além de impedir a entrada de insetos vetores da doença, permitiu com que as plantas do experimento crescessem em condições ambientes (temperatura e

luminosidade) mais propícias para a expressão de sintomas da CVC em plantas infectadas com a *Xf*, do que em plantas dispostas em casa-de-vegetação (Nunes, 1999).

O substrato empregado para o preenchimento dos vasos apresentava composição e pH adequados para o crescimento e desenvolvimento de plantas cítricas, conforme laudo emitido pelo Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Solos e recursos Ambientais/IAC (dados não apresentados). Adubações com sais e ácidos a esse substrato, que disponibilizaram B, Cu, K, Mg, Mn, N, Mo, N, P, S e Zn as plantas, foram regularmente realizadas visando fornecer as quantidades específicas desses elementos às plantas de citros em crescimento.

Tendo em vista que híbridos de citros apresentam vigor de crescimento muito variável, diferentes podas foram realizadas nas mudas da população-mapa, objetivando uniformizar a altura das plantas em aproximadamente 80 cm, antes de elas serem inoculadas com a *X. fastidiosa*.

Delineamento experimental e condução das plantas

Ao final da enxertia, foram obtidas 890 mudas de limão-cravo enxertadas, cada qual, com uma borbulha da população-mapa (89 genótipos x 10 repetições). As dez parcelas experimentais (1 parcela = 1 planta/repetição) foram dispostas aleatoriamente em delineamento inteiramente casualizado, constituído de sete linhas, arranjadas no sentido Norte-Sul, dentro do telado anti-afídeo. As mudas das plantas estavam dispostas 20 cm uma das outras, dentro da linha e distantes 70 cm entre si, entre as linhas.

Tendo em vista que o experimento objetivou estudar a resistência e suscetibilidade precoces de citros à *Xf*, cujo mecanismo de patogenicidade está relacionado ao entupimento do xilema vascular, adotaram-se alguns incrementos no experimento. Instalou-se um sistema de fertirrigação por gotejamento, o que permitiu dispensar volumes moderados e homogêneos de água (200 ml/planta/dia) e/ou de solução nutritiva (200 ml/planta/semana) nos vasos com as plantas, cuja composição e concentração dos sais é uma adaptação de Furlani (1997). Adicionalmente, cobriu-se com plástico a abertura superior dos vasos das plantas, evitando-se a deposição de água de chuva e/ou a perda de água por evaporação, proporcionando uniformidade quanto à disponibilidade de água as plantas.

Estirpe de *Xf* 9a5c recém-isolada de *Catharanthus roseus* (Colleta Filho, dados não publicados) foi cultivada *in vitro* em placa de petri com meio de cultura SPW Agar, com 84 dias de antecedência da inoculação. As placas, seladas com fita de polietileno para prevenir dissecação, foram incubadas no escuro a 28 °C no BOD, por cinco sub-cultivos de 14 dias cada.

Nos dias de inoculação, ocorrida em duas etapas, ambas no verão, as colônias de *Xf* foram raspadas do meio de cultura, re-suspensas em água destilada e removidas de restos do meio de cultura por centrifugação (3.000 g/5 minutos). O precipitado resultante foi lavado duas vezes com tampão PBS estéril (100 mM fosfato sódico; NaCl 0,85%) e suspenso em mesmo tampão, resultando em concentração estimada de 10^8 células de *Xf*/ml, conforme adaptação de metodologia descrita por Lee *et al.* (1993). Concentração determinada por meio de leitura ótica por espectrofotômetro (A_{600} nm) (Minsavage *et al.*, 1994; Hopkins, 1988) revelou densidade óptica de 0,25 (10^7 a 10^8 UFC/ml).

Volume de 8 µl dessa suspensão da bactéria, diluída momentos antes da inoculação e regularmente agitada, para garantir a manutenção das bactérias em suspensão, foi mecanicamente inoculado sobre o xilema do caule das plantas da população-mapa por meio da adaptação do método 'pin prick' (picada de alfinete), descrita por Hill & Purcell (1995) com a perfuração com alfinete entomológico nº 1. Foram realizadas duas inoculações, com intervalo de 25 dias, na região do caule do ponteiro ainda pouco lignificado das plantas, priorizando a seção abaixo do penúltimo fluxo de emissão de folhas. Em cada uma dessas duas épocas de inoculação, a gotícula era depositada sobre essa região do caule que, posteriormente, era perfurada, por meio de 5 alfinetadas.

Objetivando maior eficiência de penetração da suspensão bacteriana no interior do caule, as plantas foram submetidas a estresse hídrico por dois dias antes da inoculação, que ocorreu nas horas mais quentes do dia (11 às 13 horas; com uma amplitude térmica registrada de 27 a 35°C) e mantidas por duas horas na posição horizontal. Essas medidas resultaram em rápida e completa absorção da solução contendo a *Xf*, possivelmente devido a uma maior tensão xilemática. A região do caule inoculada com a bactéria foi marcada com fita plástica. As folhas emitidas acima desse ponto foram amostradas para diagnóstico e quantificação da *Xf*.

Das dez mudas de cada genótipo da população-mapa, oito delas foram inoculadas com a *Xf* (plantas-teste) e duas mudas foram inoculadas somente com tampão PBS estéril (sem a bactéria) (plantas-controle).

As plantas tiveram sua parte aérea parcialmente podada, antes da inoculação das plantas, conforme Li (1997). Após a inoculação, as plantas foram submetidas à poda de condução, mantendo-as sob a forma de haste única.

Extração e quantificação de DNA genômico total

DNA genômico total foi isolado de amostras de 150 mg de xilema do pecíolo de folhas frescas de plantas inoculadas com a *Xf* da população-mapa, dispostas acima do ponto de inoculação da *Xf* através de dois tipos diferentes de *minipreps* de DNA. Após 2,5; 5 e 10 meses após a inoculação, o monitoramento da eficácia da inoculação da *Xf* nas plantas foi realizado através de diagnóstico por PCR (*polymerase chain reaction*), adotando-se *miniprep* de DNA baseado em SDS mais sucinto para extração de DNA, adaptado para citros (Oliveira *et al.*, 2000). Decorridos 10 meses após a inoculação da bactéria, quantificou-se a *Xf* a partir do DNA extraído via adaptação do método CTAB-Sarcosyl, descrito para citros por Machado *et al.* (1996).

A concentração e qualidade das amostras de DNA extraídas via CTAB foram determinadas espectrofotometricamente a ABS_{260nm} e ABS_{260nm}/ABS_{280nm} , respectivamente e por visualização sob luz ultra violeta em gel de agarose (0,8%) com brometo de etídeo (0,5 ng/ml), juntamente com diluição serial de λ -DNA (250 a 50 ng/ μ l) (Sambrook *et al.*, 1989). As amostras de DNA foram diluídas a 100 ng/ μ l e armazenada a $-20^{\circ}C$.

Diagnóstico molecular de *X. fastidiosa*

Reações da PCR foram realizadas em volume de 25 μ l, constituídas de 100 mM de Tris-HCl pH 8,3; 500 mM de KCl; 25 mM de $MgCl_2$; 0,01% de gelatina; 200 mM de solução de dNTPs (GIBCO-BRL); 20 ng dos *primers* CVC-1 e 272-2-int, descritos por Pooler & Hartung (1995) e sintetizados pela OPERON Technologies; 20 ng de DNA e 1,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (CENBIOT/RS). Foram executados 30 ciclos de 1 minuto a $94^{\circ}C$; 1 minuto a $55^{\circ}C$; 2 minutos a $72^{\circ}C$; sucedidos por uma extensão final de 10 minutos a $72^{\circ}C$. Aliquota de 7 μ l/amostra foi aplicada em géis de agarose (1,5%) preparados em tampão TAE (0,04 M Tris Acetato; 1 mM EDTA) e contendo brometo de

etídio (0,5 ng/ml) para a visualização do *amplicon* de 507 pb da *Xf*. Quatro plantas PCR+, i.e., plantas inoculadas com a *Xf* cujo diagnóstico por PCR acusou a multiplicação da bactéria, identificadas até a 3ª época de avaliação (10 meses após a inoculação), referente a cada um dos 89 genótipos da população-mapa, com exceção de tangor ‘Murcott’, foram utilizadas para dar continuidade às etapas seguintes do experimento.

Amostras de duas folhas de cada repetição de um mesmo genótipo de plantas inoculadas e não inoculadas foram agrupadas e submetidas a extrações conjunta de DNA total, na primeira época de avaliação (2,5 meses) para se atestar sua condição de plantas PCR+ e PCR- para *Xf*, totalizando 178 reações de PCR. Diagnóstico da bactéria, em plantas inoculadas com *Xf*, decorridos 5 e 10 meses após a inoculação, foi feita com 3 ou 4 folhas de cada repetição, isoladamente, de cada genótipo, totalizando 712 reações de PCR, para cada uma dessas duas épocas de avaliação.

Delineamento experimental e condução das plantas na câmara de crescimento

Um total de 445 mudas do experimento [89 genótipos x 5 mudas/genótipo (quatro comprovadamente infectadas, PCR+ e uma planta-controle, PCR-)] tiveram parâmetros de trocas gasosas avaliados, conforme descritos a seguir, em condições de casa-de-vegetação e de câmara de crescimento (ILKA) pertencentes ao Centro de Ecofisiologia e Biofísica do Instituto Agrônomo, Campinas/SP. Por limitação de espaço, o número de plantas dispostas no interior da câmara de crescimento foi reduzido, adotando-se, portanto, o delineamento de blocos ao acaso, com parcelas subdivididas [tratamento primário: genótipo; tratamento secundário: estado fitossanitário das plantas (sadias e infectadas)], com disposição aleatória dos genótipos dentro de cada bloco, onde ficavam por até 60 segundos antes do início das medidas.

Variáveis de resistência precoce à *Xf* mensuradas

Avaliação de trocas gasosas. Trocas gasosas foram mensuradas não-destrutivamente e sob condições controladas. Folhas maduras, de aproximadamente 10 meses de idade, com limbo foliar totalmente expandido, localizadas acima do ponto de inoculação, foram avaliadas quanto às seguintes variáveis:

(a) assimilação fotossintética líquida de CO₂ (*A*): diferença da pressão parcial de CO₂ que entra e sai da câmara do IRGA, mensurada em mmol CO₂ m⁻².s⁻¹;

- (b) condutância estomática (g_s): mensurada em $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}.\text{s}^{-1}$;
- (c) concentração de CO_2 interno (C_i): mensurada em $\text{mmol CO}_2.\text{mol}^{-1}$ e
- (d) transpiração (E): mensurada em $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

As medidas de trocas gasosas foram realizadas na região mediana das folhas, em área foliar de 6 cm^2 , empregando um analisador portátil de fotossíntese por radiação infra vermelho (“Infra Red Gas Analyser”, IRGA, modelo LICOR – Li 6400, Lincon, Nebraska), seguindo método descrito por Vu *et al.* (1986). Foram tomadas três medidas em uma folha madura de limbo íntegro, sem perfurações, de cada uma das cinco plantas avaliadas (quatro mudas infectadas com a *Xf* e da muda sadia, inoculada com solução tampão PBS sem a bactéria) por cada genótipo da população-mapa. As medidas de trocas gasosas eram registradas pelo IRGA quando o coeficiente de variação total dos dados encontrava-se entre 0,1 e 0,2%.

Antecedendo a avaliação das trocas gasosas, as plantas foram uniformemente irrigadas, introduzidas no interior da câmara de aclimatização tipo Fitotron (ILKA™) e aclimatizadas no escuro sob déficit de pressão de vapor (DPV) de 2,5 kPa e temperatura de 28°C por 60 minutos. Durante a avaliação das trocas gasosas, uma folhas madura, extendida, com aproximadamente oito meses de idade das plantas foi submetida, ainda, às condições ambientes normatizadas no interior da câmara do IRGA: (i) fonte de luz com fluxo de fótons fotossintetizantes (FFF) de $1000 \mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, emitida sobre sua face adaxial, suficiente para saturação lumínica da fotossíntese (Syvertsen, 1984) e (ii) corrente de ar, proveniente da atmosfera externa, impulsionada para o interior da câmara do IRGA a 400 ml min^{-1} , a uma concentração de CO_2 de 360 ppm. O ar coletado do meio externo foi submetido à refrigeração e umidificação por meio do aparelho “Dew Point Generator” (Modelo LICOR – Li-610, Lincon, Nebraska), de forma que se gera ar a temperatura de ponto de orvalho, com DPV de 2,5 Kpa, antes de ser bombeado para o interior da câmara de medição do IRGA, mantida a 28°C pelo próprio aparelho. O FFF ($\mu\text{mol}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e a temperatura ($^\circ\text{C}$) foliares foram quantificados, respectivamente, por um quantômetro e um termopar, acoplados ao IRGA. Durante a coleta dos dados referentes às variáveis fisiológicas, cada folha era mantida em equilíbrio dentro da câmara, sob as condições ambiente descritas acima, durante, aproximadamente 30

segundos, antes da obtenção das medidas, até que o valor da taxa de assimilação da diferença de CO₂ permanecesse constante.

Cumprе salientar que as etapas de inoculação artificial das plantas com a *Xf* e mensuração de variáveis fisiológicas relacionadas a trocas gasosas, conforme descritas anteriormente, foram previamente avaliadas em condições de experimento-piloto, com mudas dos parentais da população-mapa.

Quantificação molecular de carga bacteriana de Xf. Após a avaliação das trocas gasosas, DNA de amostras de pecíolo de folhas de plantas infectadas com a *Xf*, localizadas na mesma região da planta que tiveram suas folhas fisiologicamente avaliadas, foi extraído via miniprep SDS adaptado para citros (Oliveira *et al.*, 2000). Quantificação do número de células de *Xf* presentes nessas amostras foi realizada empregando o *System Detection Sequence* 7000, do Laboratório de Biologia Molecular (Fac. Ciências Farmacêuticas, USP/Ribeirão Preto), através de análise de PCR quantitativo em tempo real, cuja metodologia é descrita por Oliveira *et al.* (2002). O experimento foi instalado em delineamento de blocos casualizados, com duas repetições. A variável quantificação de células de *Xf* (QXF) foi expressa em UFC/mg de tecido amostrado.

Os dados *per se* de todas as cinco variáveis mensuradas (*A*, *g*, *C_i*, *E* e QXF) foram submetidos às seguintes análises estatísticas:

- a) Teste de normalidade de distribuição fenotípica: empregado para se testar a hipótese da normalidade da distribuição de frequência das 89 médias dos genótipos da população-mapa quanto a cada uma das variáveis estudadas. Calculado via teste Kolmogorov-Smirnoff (aderência Lilliefors) ($\alpha = 0,05$), por meio do aplicativo BioEstat 2.0 (Ayres *et al.*, 2000).
- b) Transformação de escala de variável: Conforme apresentado em resultados e discussão, a variável QXF requereu transformação de escala, por apresentar não normalidade de distribuição fenotípica. Adotou-se a transformação $\log(n + 1)$, onde $n =$ UFC/mg, conforme já adotado para *Xf* em citros por Fry & Milholland (1990).
- c) Teste de comparação de médias: testes paramétrico (Scott-Knott) e não paramétrico (Kruskal-Wallis) de comparação de médias foram empregados para se contrastar as 89 médias dos genótipos da população-mapa de cada uma das variáveis estudadas (ambos

os testes com $\alpha = 0,05$), a depender, respectivamente, se as mesmas apresentavam ou não distribuição normal dos dados. O teste Scott-Knott, que separa as médias através de comparações entre grupos de média de dados, foi calculado por meio do *software* SASM. Agri, versão 3.2.1 (Althaus *et al.*, 2002) e o teste Kruskal-Wallis pelo aplicativo BioEstat 2.0 (Ayres *et al.*, 2000).

Os dados *per se* das variáveis relacionadas a trocas gasosas e relações hídricas (A , g , C_i e E) foram submetidos, ainda, às seguintes análises estatísticas:

d) Análise de variância (ANAVA): empregada para se detectar efeito significativo, ou não, entre estados fitossanitários (inoculado e sadio), entre médias de tratamentos genéticos e interação genótipo x estado fitossanitário ($\alpha = 0,05$). Calculada via programa estatístico SANEST (Zonta & Machado, 1986).

Por fim, com vistas a averiguar a existência ou não de correlação de dependência significativa entre a concentração bacteriana detectada e os efeitos na redução da capacidade fotossintética das plantas infectadas, os resultados médios das variáveis fisiológicas (A , g , C_i e E) e de quantificação da bactéria (QXF) foram submetidos à correlação linear de Pearson, objetivando mensurar a magnitude e o grau de associação entre esses grupos de variáveis.

Análise de QRLs de citros à Xf

A análise de identificação de marcadores fAFLPs associados a locus de resistência quantitativa (QRL) de citros à Xf , baseadas nos resultados médios das análises fotossintéticas e de quantificação da carga bacteriana, referentes a cada híbrido da população-mapa infectados com a Xf , descritos nesse trabalho, juntamente com os marcadores fAFLPs dos mapas de ligação anteriormente gerados para tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’, via MapMaker (Oliveira *et al.*, dados não publicados), foi investigada empregando as seguintes metodologias:

a) Mapeamento por intervalo composto (MIC). Essa função de mapeamento baseia-se na associação de métodos de máxima verossimilhança e regressões lineares múltiplas (Zeng 1993, 1994). O MIC foi realizado através do QTL Cartographer v.1.14 (Basten, *et al.* 2000). Esse aplicativo é constituído de um conjunto de programas que mapeia locus quantitativos (QTLs ou QRLs) a partir de mapas genéticos construídos pelo MapMaker.

Os arquivos ‘maps’ e ‘raw’ do Mapmaker, contendo os dados genotípicos (marcadores fAFLPs de segregação mendeliana 1:1 dos mapas de tangor ‘Murcott’ e de laranja ‘Pêra’) e fenotípicos (médias fenotípicas dos genótipos dos híbridos da população-mapa) foram transferidos para os programas ‘rmap’ e ‘rcross’ do QTL Cartographer, respectivamente. Foi adotada uma análise de regressão (*forward regression with backward elimination*, FB), via programa ‘srmmap.qtl’, na qual somente marcadores com associação significativa com a característica ($p < 0,1$) foram considerados. Posteriormente, os dados foram submetidos ao programa ‘zmapqtl’, responsável pelo MIC, adotando-se uma caminhada em intervalos de 2 cM pelos grupos de ligação e um tamanho de janela de 10 cM, conforme descrito para mapeamento de QTLs para citros (Tozlu *et al.*, 1999). O número de marcadores co-fatores escolhido para controlar o *background* genético e aumentar a resolução da detecção de QRLs foi fixado pela regressão “stepwise forward-backward” ($p < 0,05$), usando o modelo 6 do programa ‘zmapqtl’ (modo default do QTL Cartographer) (Tozlu *et al.*, 1999ab).

Valores empíricos de LOD score críticos para se decidir a presença ou ausência de um QRL nos grupos de ligação ($\alpha = 0,05$), empregados na análise de MIC desse trabalho, foram calculados via análise de permutação randômica, conforme Churchill & Doerge (1994). Médias fenotípicas das variáveis mensuradas e o polimorfismo fAFLP identificado nos 87 híbridos BC₁ foram permutados por 1000 vezes e valores LOD score foram determinados para cada característica independentemente. Posteriormente, os programas ‘eqtl’ e ‘preplot’ foram usados para preparar o perfil da taxa de probabilidade (likelihood ratio, LR) com vistas a identificação e localização de QRL(s) referente(s) a cada variável mensurada, ao longo de cada grupo de ligação. Picos máximos de LOD significativos para os QRLs identificados foram usados para estimar a posição dos mesmos nos grupos de ligação à semelhança de Tozlu *et al.* (1999ab).

A estimativa da magnitude da proporção da variação fenotípica total da característica (%) explicada pelo QRL(s) detectado(s) via MIC foi determinada pelo módulo Zmapqtl do QTL Cartographer (Basten *et al.*, 2000), calculando-se o coeficiente de determinação (R^2), obtido por meio de análise de regressão múltipla para os marcadores moleculares ligados ao(s) locu(s) poligênico(s) identificado(s), conforme Edwards *et al.* (1987).

b) Análise pontual de marcadores (APM) . Análise de identificação de QRLs à Xf , levando em consideração cada locus fAFLP polimórfico em separado, adotou as seguintes estratégias:

b.1) Teste de Student (teste t bilateral). Esse teste paramétrico de comparação de médias foi adotado para a análise individual da hipótese de associação de cada um dos marcadores fAFLPs polimórficos na população-mapa de segregação mendeliana 1:1, não ligados aos mapas de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’ e de segregação mendeliana 3:1, ligados ou não aos grupos de ligação do mapa M1/3 descritos para tangor ‘Murcott’ (Oliveira *et al.*, dados não publicados) aos resultados médios de variáveis ($\alpha = 0,05$), cuja distribuição fenotípica foi anteriormente constatada como sendo normal. Os híbridos da população-mapa foram distribuídos em duas classes: uma se refere aos híbridos com a presença do *amplicon* no locus fAFLP e a outra se refere ao grupo de híbridos com ausência de *amplicon* no locus fAFLP.

Previamente à execução do teste t , a condição homo (variância igual) ou heterocedástica (variância desigual) dos dois conjuntos de observações fenotípicas a ser comparado pelo teste t foi averiguada pelo teste F, conforme Beiguelman (1994). Tanto os testes estatísticos F e t têm o polimorfismo de marcadores fAFLPs como variável independente e os resultados médios das variáveis fenotípicas mensuradas como variável dependente. Os valores de probabilidade (p) do teste F e t foram calculados pelo software Excel (MicrosoftTM).

A hipótese H_0 , que se refere à ausência de QRL ligado a um marcador fAFLP qualquer, foi rejeitada quando as médias das classes genotípicas do locus marcador foram significativamente diferentes, pelo teste t , com $p \leq 0,05$.

b.2) Teste Kruskal-Wallis. Esse teste não paramétrico de comparação de médias ($\alpha = 0,05$) testou a hipótese de associação de cada um dos marcadores fAFLPs polimórficos ligados ou não aos mapas de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’ aos resultados médios da variáveis ‘QXF’, cuja distribuição fenotípica não apresentou normalidade. Para efeito de análise, a variável independente foi considerada o polimorfismo de marcadores fAFLPs e a dependente os resultados médios da variável ‘QXF’. A rejeição da H_0 (ausência de QRL ligado ao marcador), pelo teste Kruskal-Wallis, se deu quando o valor de $p \leq 0,05$, conforme Flament *et al.* (2001).

Independente da natureza normal ou com desvio da normalidade dos dados das variáveis, a identificação de marcadores putativamente ligados a QRLs, via APM, foi colocada a prova, por meio de teste de permutação randômica (5000 permutações), conforme Churchill & Doerge (1994). Para a referida análise, foi empregado o software teste de permutação desenvolvido por Horgan & Rouault (BioSS) (www.bioss.ac.uk).

A estimativa da magnitude da proporção da variação fenotípica total da característica (%) explicada pelo QRL(s) detectado(s) via APM foi determinada por análise de regressão linear simples calculando-se o coeficiente de determinação ajustado (R^2), a partir dos marcadores fAFLPs ligados ao(s) locus poligênicos identificado(s), conforme Fulton *et al.* (2000).

As regiões genômicas contendo QRLs identificadas foram nomeadas com Xf , seguido pelo símbolo da característica avaliada e por um número, que corresponde ao grupo de ligação em que se encontram os QRLs nos mapas de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’, construídos (Oliveira *et al.*, dados não publicados). Marcadores fAFLPs de segregação 1:1 e 3:1 não ligados a esses mapas, associados à QRLs à Xf via APM, foram nomeados Xf_{nl} seguido por número.

7.5. Resultados:

Experimentos-piloto

No desenvolvimento do processo de avaliação a avaliação de variáveis relacionadas ao patossistema *Xylella*-cítricos, que possam exprimir a capacidade da planta de manter elevada performance fotossintética, mesmo em plantas infectadas com a bactéria, o que denotaria eventos precoces de resistência de plantas cítricas à Xf , foram necessários a montagem de quatro experimentos-piloto:

1) *Eficiência de métodos de inoculação de Xf* . Plantas ‘pé franco’ e mudas adultas de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’ foram infectadas com a Xf , através do método ‘pin prick’ (conf. material e métodos) ou por encostia de mudas de laranjeira sintomáticas para a CVC e PCR⁺ para a Xf , conforme método descrito por Medina *et al.* (2000). Plantas-controle (inoculação por agulha de solução PBS pura e encostia de limão-cravo sadio) foram empregadas. A transmissão da Xf foi acompanhada por PCR aos 1,5; 2,5; 5 e 10 meses após a inoculação.

A detecção da *Xf* nas plantas infectadas foi possível somente após 10 meses da inoculação. Constatou-se eficiência de inoculação de 63,6% e 75% de transmissão de *Xf* através das técnicas de encostia e ‘pin prick’, respectivamente. As proporções entre o número de plântulas PCR⁺ e PCR⁻ para a *Xf* foi não significativa (teste χ^2 de contingência 2 x 2, $\alpha = 0,05$; dados não apresentados). Assim, adotou-se o método ‘pin prick’ como procedimento padrão de inoculação das plantas da população-mapa, face à maior (i) uniformidade quanto à concentração da *Xf* a ser introduzida nas plântulas, em comparação com diferentes concentrações populacionais de *Xf*, possivelmente presentes em plantas inoculantes; (ii) praticidade da inoculação da bactéria por agulha, por não requerer cuidados fitotécnicos dispensados de plantas-inóculo e por haver (iii) relatos de que a encostia de plantas com CVC em plantas sadias de variedades cítricas resistentes resulta na transmissão e multiplicação da *Xf* para o interior dessas plantas resistentes à *Xf*, tornando-as temporariamente hospedeiras da bactéria (Salibe, 2001).

2) *Avaliação de redução de taxas fotossintéticas em folhas aparentemente sadias.* Constataram-se diferenças significativas entre a quantidade de CO₂ fotoassimilado de folhas de mudas sadias de laranja ‘Valência’ e de folhas com 0% de sintomas da CVC de mudas sabidamente infectadas com a bactéria, via diagnóstico PCR (teste *t* bilateral, $\alpha = 0,05$, dados não apresentados). Desse modo, embora as folhas assintomáticas de plântulas de laranja ‘Valência’ inoculadas com a bactéria ainda não tenham sintomas foliares característicos da CVC, detecta-se, precocemente, redução significativa da taxa de fotoassimilação de CO₂.

3) *Condições atmosféricas do interior na câmara de aclimatização.* O desenvolvimento da CVC é influenciado pelas condições atmosféricas, notadamente a temperatura e umidade relativa do ar. Assim, o déficit de pressão de vapor (DPV), índice que mede a capacidade de desidratação do ar (Gomes, 2001), foi ajustado no interior da câmara de crescimento para emular condições de alta demanda atmosférica, caracterizadas por reduzida umidade relativa do ar (40%) e elevada temperatura ambiental (28°C), o que resulta em uma maior taxa de evaporação de uma superfície úmida e, contribui para detecção mais precoce da redução da capacidade de hidratação foliar em plântulas de citros contaminadas com a *Xf* (dados não apresentados).

4) *Avaliação da eficiência da adição de glicerol 15% ao tampão PBS e das épocas de avaliação para mensuração de variáveis fisiopatológicas.* Nesse experimento-piloto, avaliou-se o efeito do conteúdo da solução de inoculação (PBS ou PBS + glicerol 15%) de duas estirpes de *Xf*/CVC, recém-obtidas de plantas infectadas por Coletta Filho (dados não publicados), quanto ao aumento da eficiência de colonização da bactéria em laranja 'Pêra' e tangor 'Murcott'. Para cada uma das variedades cítricas havia duas plantas testemunhas; uma inoculada somente com solução PBS e a outra com PBS + Glicerol. A eficiência da transmissão da *Xf* foi averiguada por PCR aos 1,5; 2,5; 5 e 10 meses após a inoculação. Adicionalmente, avaliou-se a mensuração das variáveis fisiopatológicas *A* e *g* em folhas de plantas inoculadas e sadias dessas variedades, decorridos 9 e 14 meses após a inoculação da *Xf*, sob as condições atmosférica e de luminosidade descritas no item material e métodos.

Não se observou efeito da composição da solução inicial de suspensão da *Xf* na proporção de plantas infectadas com a bactéria, detectadas via PCR, para ambas as estirpes de *Xf* (teste χ^2 de contingência 2 x 2, $\alpha = 0,05$; dados não apresentados). Quanto à mensuração das variáveis fisiológicas, constatou-se que a multiplicação e colonização de *Xf* reduziram significativamente os níveis das taxas *A* e *gs* de plantas inoculadas de laranja 'Pêra', em relação às suas plantas controle, ao passo que plantas inoculadas e sadias de tangor 'Murcott' apresentaram níveis similares para esses parâmetros fisiológicos, em ambas as épocas de avaliação (teste *t* bilateral, $\alpha = 0,05$; dados não apresentados). Diferença significativa também foi detectada ao se comparar os resultados médios mensurados referentes às plantas inoculadas de ambas as variedades cítricas. Por sua vez, as médias das taxas *A* e *gs* detectadas entre tangor 'Murcott' e 'Pera' sadias foram contrastadas, não apresentando diferença significativa (teste *t* bilateral, $\alpha = 0,05$; dados não apresentados). Desse modo, parâmetros fisiopatológicos relacionados a trocas gasosas e relações hídricas mensurados em plantas de citros inoculadas com *Xf*, nas condições experimentais especificadas nesse experimento-piloto, sugeriam a capacidade de se distinguir resposta fisiopatológica diferencial precoce de tangor 'Murcott' e laranja 'Pêra' à *Xf*.

Avaliação de trocas gasosas e relações hídricas das plantas da população-mapa

Estabelecida as condições para inoculação da *Xf* e avaliação das plantas, as oito mudas das plantas da população-mapa (87 híbridos BC₁ mais os dois parentais), inoculadas com a bactéria, foram diagnosticadas via PCR. O número de plantas infectadas com a *Xf* aumentou gradualmente com o tempo após inoculação para todas os híbridos avaliados. O número mínimo de quatro mudas infectadas pela *Xf* foi alcançado somente no décimo primeiro mês. Após a inoculação, um total de quatro mudas de cada híbrido ou parental infectado com a bactéria, cuja extração de DNA total de amostras peciolares obtidas de cada planta, individualmente, da região da planta inoculada, apresentaram-se PCR⁺, i.e., com amplificação de fragmento de DNA de 507 pb da *Xf* (Figura 1), foram fisiologicamente mensuradas em câmara de crescimento. Os resultados dessa análise são apresentados na Tabela 1.

Análise de variância detectou F altamente significativo ($p < 0,01$) devido ao efeito de genótipo (G), estado sanitário (ES - infectado e sadio) e para interação G x ES, referente às variáveis *A*, *g* e *E*. Esses resultados sinalizam que (i) a infecção da *Xf* foi a responsável pela diminuição dos referidos índices fisiológicos nas plantas infectadas, em relação às plantas sadias e (ii) que há diferenças genéticas entre as médias apresentadas por essas variáveis nas plantas doentes.

A variável *Ci* referente ao conjunto de plantas da população-mapa sadias e infectadas apresentaram médias estatisticamente semelhantes. Os dados referentes à mensuração de *Ci* não foram considerados, portanto, na análise para identificação de QRLs. A discussão da não significância detectada para essa variável será apresentada detalhadamente a seguir.

Detectou-se elevada amplitude de variação entre as médias referentes as quatro variáveis fotossintéticas mensuradas nas plantas inoculadas, quer no conjunto das plantas infectadas com a *Xf*, quer nas plantas sadias (Tabela 2). As maiores e menores médias obtidas de híbridos na parcela de plantas inoculadas, com exceção da variável *Ci*, foram sempre menores que às obtidas nas plantas da parcela sadia.

Cumprir registrar que, para as plantas-controle, sadias, não foi detectada a presença de bactéria por PCR, confirmando que a única fonte de infecção de *Xf* no

interior da estufa foi a inoculação realizada por perfuração mecânica. Não foram observadas alterações fisiológicas ou nutricionais nas plantas-controle.

Quantificação molecular de carga bacteriana

Posteriormente à avaliação fisiológica das plantas, o número de células de *Xf* presentes em amostras de pecíolos de folhas de plantas inoculadas foi quantificado via RTQ-PCR. Os resultados dessa análise são apresentados na Tabela 3. À semelhança das variáveis fisiológicas *A*, *gs* e *E*, a ANAVA detectou diferença significativa ($p < 0,01$) devido ao efeito de genótipo. Enorme amplitude de variação das médias de QXF entre os genótipos da população-mapa foi detectada (Tabela 4).

Distribuição fenotípica das variáveis nas plantas da população-mapa infectadas com *Xf*

Variabilidade genética significativa para as variáveis *A*, *gs*, *E* e QXF foi observada entre os híbridos da população-mapa, infectadas com a *Xf*. Os resultados médios obtidos da mensuração dessas quatro variáveis, ranqueados pelo teste de comparação de médias Scott-Knott, encontram-se na Tabela 5. Para a variável QXF, somente dados não transformados são mostrados, já que a transformação de dados para se obter a distribuição normal revelou aproximadamente o mesmo ranqueamento de médias (dados não mostrados).

Os efeitos da infecção de *Xf* sobre os parâmetros fisiológicos das plantas da população-mapa foram nítidos. A distribuição das médias das variáveis *A*, *g* e *E* resultou em curvas de variação contínua ($p > 0,05$; teste de Kolmogorov-Smirnov), conforme as Figuras 2, 3 e 4, respectivamente.

A distribuição da variável QXF entre os híbridos da população-mapa foi contínua embora o caráter não foi normalmente distribuído ($p < 0,05$; teste de Kolmogorov-Smirnov) (Figura 5).

Detectou-se, para as quatro variáveis quantificadas, o surgimento de híbridos BC₁, cujo valor fenotípico da característica mensurada sobrepujou ao dos parentais, fenômeno conhecido como segregação transgressiva (Tabela 5).

Correlações fenotípicas

Magnitude, sentido e significância de correlações linear de Pearson entre as médias fenotípicas das quatro variáveis mensuradas (*A*, *gs*, *E* e QXF) nas mudas de

plantas da população-mapa inoculadas com a *Xf* encontram-se na Tabela 6. Valores de correlação foram baixas, ressaltando-se o de *A* x QXF ($r = -0,15$, $p = 0,17$).

Identificação de locus de resistência quantitativa de citros à *Xf*

Resultados da análise via MIC, empregando marcadores fAFLPs de segregação 1:1 ligados aos mapas dessas variedades e por APM, a partir de fAFLPs de segregação 1:1, não ligados aos mapas de tangor ‘Murcott’ e ‘Pêra’ e os de segregação 3:1, presentes no mapa M1/3, encontram-se nas Tabelas 7 e 8.

A análise via MIC, executada pelo QTL Cartographer, detectou dois QRLs: o *Xf*-A1 e *Xf*-QXF, localizados, respectivamente, nos grupos de ligação V e IV do mapa de ligação de fAFLPs de segregação 1:1 anteriormente descrito para tangor ‘Murcott’ (Oliveira *et al.*, dados não publicados). Esses QRLs identificados foram responsáveis por 13,53% e 11,66% da variância fenotípica das variáveis *A* e QXF referente às plantas da população-mapa inoculadas com a *Xf*.

Os gráficos LR x grupo de ligação gerados pelo aplicativo QTL Cartographer, referentes à localização dos QRLs *Xf*-A1 e *Xf*-QXF encontram-se ilustrados nas Figuras 6 e 7, respectivamente. Os QRLs apresentados foram significativos como determinados empiricamente, a partir de um valor LR (likelihood-rate) limiar médio 9,50, baseado no teste de permutação. Os marcadores fAFLPs dos grupos de ligação dos mapas genéticos, e a distância entre eles, em cM, são apresentados ao longo do eixo da abscissa. No eixo da ordenada, é disposta a escala LR. A linha horizontal (‘threshold’) na altura de 9,5 LR indica o limiar estrigente que o LOD score deve ultrapassar para se inferir a presença de um QRL. A linha ondulada indica a análise realizada via MIC. A altura da linha ondulada indica a força da evidência ($\log_{10}$ odds ratio) para a presença do QRL naquela localização. Todas as regiões da linha ondulada acima da linha horizontal são consideradas QRLs. A posição mais provável do QRL é o ponto mais alto da curva.

Já a APM detectou seis locus fAFLPs putativamente ligados a QRLs (PQRLs): *Xf*-AGL3M1/3, *Xf*-A_{n1}1, *Xf*-A_{n1}2, e *Xf*-A_{n1}3, associados à *A* de plantas inoculadas com a bactéria; *Xf*-E_{n1}1, referente à variável *E* e o QRL *Xf* –QXF_{n1}1, relativo à variável QXF. Esses PQRLs responderam por 7,33% a 10,56% da variância fenotípica para as características que se encontram associados e foram oriundos exclusivamente do

genoma de tangor ‘Murcott’ (Xf -E_{nl}1, Xf A_{nl}2 e Xf A_{nl}3) ou providas de ambos os parentais [Xf -A(GL3M1/3; Xf -A_{nl}1 e Xf -QXF_{nl}1).

7.6. Discussão

Este trabalho relata a primeira identificação de QRLs de citros, ou de qualquer outra espécie hospedeira à Xf . Para a quantificação de resistência à Xf ao nível de fisiologia da planta e de multiplicação do fitopatógeno, foram (i) gerados uma progênie BC₁ derivada de um cruzamento entre variedades cítricas suscetível e resistente à essa bacteriose e (ii) desenvolvidos e/ou adaptados métodos de inoculação da bactéria, avaliação de trocas gasosas e relações hídricas e quantificação molecular de carga de Xf em plantas infectadas. Os métodos de avaliação de resistência de citros à Xf , desenvolvidos na presente pesquisa, enfocam aspectos iniciais do processo patogênico do patossistema *Xylella*-citros que exprimem, precocemente, o potencial de resistência genética quantitativa diferencial de genótipos de citros infectados com a Xf .

Experimentos-piloto de inoculação da Xf

A Xf /CVC vem sendo transmitida artificialmente por diferentes métodos, com eficiência de transmissão variável em função de fatores associados ao inóculo e/ou à planta. No presente trabalho, o método de inoculação ‘pin prick’ resultou uma taxa média de 50 à 75% de infecção das plantas da população-mapa com a Xf , conforme diagnosticado via PCR. A eficiência de infecção descrita neste trabalho é superior aos 25% de infecção de Xf relatada em mudas de laranjeiras por Salibe (2001), empregando-se o mesmo método de inoculação.

A maior eficiência de infecção de Xf , descrita no presente trabalho, pode se dever a dois fatores básicos. O primeiro deles está relacionado à região da planta em que a suspensão bacteriana foi inoculada; no caule lignificado por Salibe (2001) e, neste trabalho, em uma faixa de transição do caule recém-lignificado e ainda não lignificado, próximo ao ponteiro da planta. O segundo fator, não menos importante, está relacionado à quantidade de inóculo de Xf . Salibe (2001) inoculou nas plantas, aproximadamente, 6×10^4 UFC de Xf (3 µl de solução de $1,98 \times 10^7$ UFC/ml). Já no presente trabalho, plantas da população-mapa foram inoculadas com $1,6 \times 10^6$ UFC de Xf (16 µl de solução de $1,00 \times 10^8$ UFC/ml).

Os resultados do presente trabalho corroboram o relato de Lopes *et al.* (2001) de que maior eficiência de inoculação de *Xf*/CVC é obtida empregando-se suspensões bacterianas de 10^8 UFC/ml. Eficiência de inoculação obtida no presente trabalho é similar àquela obtida com a inoculação de $9,2 \times 10^5$ UFC/ml (2 μ l de suspensão de $4,6 \times 10^8$ UFC/ml) obtida por Lopes *et al.* (2001).

Avaliação de trocas gasosas e relações hídricas das plantas da população-mapa

A fotossíntese é um aspecto biológico primordial para as plantas. Por meio desse processo fisiológico, plantas convertem energia solar em energia química e têm acesso a carbono para a síntese de moléculas orgânicas, que são empregados nas vias biossintéticas celulares (Goodman *et al.*, 1986). Importância da fotossíntese em estudos fitopatológicos vem sendo experimentalmente averiguada. A ausência de relação entre severidade de doenças e danos à produção em muitas espécies vegetais aponta para o fato de que a produção vegetal não decorre somente da área da planta colonizada pelo fitopatógeno, mas adicionalmente, do comprometimento da atividade fotossintética como um todo (Monteith, 1977).

Embora tenha havido relativo sucesso na inoculação da *Xf*, as plantas da população-mapa apresentaram, durante o período de avaliação do experimento, poucas folhas com os típicos sintomas foliares de CVC. Para efeito de normatização, folhas avaliadas quanto a trocas gasosas e relações hídricas com sintomas de CVC não foram utilizadas para a avaliação fisiológica.

Resultados da avaliação da fisiologia da fotossíntese das plantas da população-mapa (Tabela 1), artificialmente inoculadas com a *Xf*, corroboraram os relatos da literatura de que a colonização de *Xf* promove obstrução física dos vasos de xilema de citros, induzindo uma diminuição do estado de hidratação foliar e uma conseqüente redução na condutância estomática e assimilação do CO_2 , antecedendo a típica expressão sintomatológica externa da CVC.

Deve ser enfatizado que a redução significativa dos resultados médios das variáveis fisiológicas de plantas infectadas com *Xf* foi detectada em folhas assintomáticas não sendo avaliadas, portanto, regiões cloróticas foliares típicas da CVC, i.e., a redução das variáveis fisiológicas advém de medidas em tecido aparentemente

sadio, em plantas de citros infectadas pela *Xf* em condições de campo (Machado *et al.*, 1994), por encostia (Medina, 2002) e por infecção por agulha (Ribeiro, 2002).

São amplamente relatados os efeitos de entupimento que a colonização da *Xf* acarreta no xilema de diferentes espécies hospedeiras. No patossistema *Xylella*-videira, por exemplo, o potencial hídrico foliar de videiras com doença de Pierce é reduzido, apresentando resistência hidráulica ao fluxo de seiva nos pecíolos de 60 a 200 vezes maior em plantas doentes, em relação àquelas sadias (Goodwin *et al.*, 1988).

Antecedência do comprometimento de trocas gasosas e relações hídricas em relação à expressão de sintomas externos de doenças também são comuns em outros patossistemas cujo fitopatógeno coloniza xilema, tais como o da *Pseudomonas solanacearum*-bananeira (Beckman *et al.*, 1993) e *Verticillium dahliae*/*Pratylenchus penetrans*-batata (Saeed *et al.*, 1997) e mesmo para patógenos de plantas não relacionados a sistemas vasculares, como o do *Colletotrichum lindemuthianum*-feijoeiro (Bassanezi, 1997). Adicionalmente, vem sendo relatada a ação prejudicial de microorganismos endofíticos não-patogênicos sobre a fotossíntese de diferentes espécies de plantas hospedeiras, tais como para os fungos *Neotyphodia coenophiolum* para a erva 'tall fescue' (Richardson *et al.*, 1993; Marks & Clay, 1996; Pinto *et al.*, 2000) e *Fusarium avenae* e *Colletotrichum morae*, para milho e banana, respectivamente (Pinto *et al.*, 2000).

Efeitos fisiológicos/fotossintéticos da inoculação de outros fitopatógenos em citros foram relatados para *Phoma tracheiphila*, patógeno de sistema vascular responsável pela doença de 'mal seco', antes mesmo de qualquer evidência da expressão de sintomas externos (Germanà *et al.*, 2000, *in press*); viróides de citros (CEVDs) (Moreschet *et al.*, 1998) e declínio ('blight'), doença de citros de etiologia desconhecida (Cohen, 1979). Contudo, plantas cítricas nem sempre apresentam redução de parâmetros fotossintéticos quando inoculadas com fitopatógenos, como é o caso do fungo vascular patogênico *Armillaria spp.* (*Citrus aurantium* L.) (Loreto *et al.*, 1993).

A expressão de sintomas fisiológicos decorrentes da inoculação da *Xf* nas plantas da população-mapa requereu um longo período de incubação da bactéria, i.e., intervalo de tempo decorrido desde a inoculação até o desenvolvimento de sintomas da doença (Rava & Sartorato, 1994). O período de incubação é bastante variável para os

patossistemas em que a *Xf* está envolvida, e parece depender do tempo requerido para a sua multiplicação e posterior movimentação no hospedeiro (Fry & Milholland, 1990). Durante a execução do experimento-piloto, construído para a definição da época adequada para avaliação do experimento, as plantas foram avaliadas cinco meses após a inoculação, não se obtendo resultados estatisticamente diferentes entre as mudas sadias e inoculadas quanto aos parâmetros fisiológicos avaliados (dados não apresentados). Pode-se creditar esse resultado à necessidade de um longo período de incubação pela bactéria para a expressão de sintomas das plantas hospedeiras, mesmo aqueles relacionados ao comprometimento das atividades fotossintéticas. Os resultados médios da segunda época de avaliação, decorridos 4 meses após a 1ª época de avaliação, demonstraram que a bactéria se estabeleceu e se multiplicou suficientemente no interior da planta, para efeito de detecção de sintomas relacionados à redução de trocas gasosas e relações hídricas. Esses resultados fornecem evidências experimentais indiretas de que patogenicidade da *Xf* seja dependente da alta densidade da população da bactéria no interior da planta, conforme evidenciado *in vitro* para *Xf*/CVC por Scarpari (2001), à semelhança do que ocorre com algumas bactérias reguladas pelo sistema de sensores de quorum.

A ausência de diferença significativa entre concentração interna de CO₂ em folhas de plantas sadias e inoculadas com *Xf* (Tabela 1) decorre, provavelmente, pelo fato da concentração desse gás ser homogênea no ar atmosférico e pelo fato de o CO₂ se acumular em igual concentração nas câmaras subestomáticas tanto de folhas de plantas sadias, quanto de folhas infectadas com *Xf* (Medina, C.L., comunicação pessoal, 2003). Situação semelhante foi encontrada no patossistema batata-*Verticillium dahliae*/*Pratylenchus penetrans*, em que redução significativa de trocas gasosas foliares foi atestada sem, contudo, haver variação da concentração de CO₂ intercelular (Saeed *et al.*, 1997).

Além da redução da capacidade de fotossíntese das plantas infectadas com *Xf* (Machado *et al.*, 1994; Medina, 2002; Ribeiro, 2002), outras sutis alterações de planta cítricas, antes mesmo da expressão de sintomas da CVC, vêm sendo relatadas. Análise proteômica do apoplasto (fluido intercelular) de folhas de laranjeiras assintomáticas de plantas infectadas com a *Xf* revelou uma concentração 96% maior de determinadas

proteínas com 41kDa em relação a folhas de laranjeiras de plantas não-infectadas, de possível papel regulatório na interação *Xylella*-citros (Almeida, 2001).

A demora na expressão de sintomas foliares da CVC, ou mesmo a translocação da *Xf* no interior de plantas de citros, sob diferentes sistemas de inoculação, é comumente relatada. Objetivando acompanhar a movimentação da bactéria dentro de laranja 'Pêra', observou-se que a bactéria ainda permanecia no ponto da enxertia da borbulha até o 130º dia após a inoculação; e a *Xf* foi detectada, via PCR, nas folhas ascendentes após 305 dias da inoculação, em somente 66% das plantas avaliadas, todas assintomáticas para a CVC (Nunes, 1999).

A expressão de sintomas tardios a partir de inoculações artificiais de *Xf* não está circunscrita somente em experimentação com citros. Plantas de ameixeira enxertadas com borbulhas procedentes de ameixeiras severamente infectadas com a *Xf* começaram a apresentar sintomas da escaldadura da folha da ameixeira somente quatro anos após a inoculação por enxertia, mesmo assim, com relativa dificuldade de diagnóstico da *Xf*, via isolamento primário e teste serológico (Leite Jr. *et al.*, 1998).

Quantificação de *X. fastidiosa*

Resistência quantitativa a fitopatógenos pode ser definida, segundo Vale *et al.* (2001), como uma resistência que varia de um modo contínuo, desde um pequeno a um grande nível de controle do crescimento populacional do patógeno. Esses autores ressaltam que quanto maior a diferença da quantidade de fitopatógeno em uma planta em relação a um cultivar suscetível, da mesma espécie, maior seria o grau de resistência apresentado por esse genótipo.

O principal mecanismo proposto quanto à patogenicidade da *Xf* em seus diferentes hospedeiros baseia-se na obstrução de vasos xilemáticos, seguida de redução da disponibilidade de água para a fotossíntese. Esforços recentes vêm sendo dispensados na quantificação de *Xf*, através da técnica RTQ-PCR para *Xf* causadora das doenças de Pierce em videira (Schaad *et al.*, 2002) e CVC em citros (Oliveira *et al.*, 2002).

A variável QXF não apresentou distribuição normal (Figura 5). Pode ter concorrido para isso o fato de que a colonização dos vasos xilemáticos pela *Xf* ocorre de forma errática. A partir do momento em que a suspensão da bactéria foi inoculada no caule das plantas, deu-se início a colonização dos vasos xilemáticos, em maior ou menor

intensidade. À medida que as gemas se diferenciavam para formar as folhas e que se tornavam contíguos os xilemas do caule e da folha recém-formada, essa passava a ser colonizada com a pressão de inóculo desses vasos de xilema presentes naquela região do caule.

Já foi constatada substancial diferença, entre espécies de hospedeiros, quanto ao período de incubação da *Xf*, sugerindo que a taxa de multiplicação da bactéria é diferencial em relação ao hospedeiro em que se encontra (Hill & Purcell, 1995). O grande espectro de resultados médios da carga bacteriana de *Xf*, detectado em amostras foliares das plantas da população-mapa (Tabela 5) pode ser interpretado, em parte, como decorrente do efeito de período de incubação diferencial da *Xf* no xilema dos híbridos BC₁ avaliados.

A laranja ‘Pêra’, dentre todas plantas avaliadas na população-mapa, foi o segundo genótipo que apresentou maior concentração de *Xf* (Tabela 5), corroborando relatos na literatura da maior quantidade da bactéria, nessa variedade cítrica, detectada por ELISA, ao se comparar oito variedades/clones de laranjeiras (Salibe, 2001).

A média geral da concentração da *Xf* detectada nas mudas da população-mapa foi de 321,2 UFC/mg de tecido vegetal (Tabela 5). Sabe-se que a concentração da bactéria é baixa em plantas de citros, mesmo quando sintomáticas. O fumo (*Nicotiana tabacum*), modelo experimental alternativo de hospedeiro de alta suscetibilidade à *Xf*, apresenta número de UFC da bactéria/g de nervura peciolar de 100 a 1000 vezes maior do que em laranja ‘Caipira’ com CVC (Lopes & Souza, 2001).

Deve ser ressaltado que a técnica RTQ-PCR, à semelhança de todas as variantes da PCR, gera *amplicons* a partir de DNA template de células-alvo, independente de estarem vivas ou mortas. As relativamente baixas populações de células cultiváveis de *Xf* de plantas de citros com sintomas de CVC, quando comparadas com o tamanho das populações resgatadas a partir do patossistema *Xylella-videira*, sugerem que a maioria das células de *Xf* esteja morta (Almeida, 2001), o que não deve ser muito diferente para experimentos de inoculação artificial da *Xf*. Li (1997) admite que até 99% das células bacterianas possam morrer logo após a inoculação por perfuração por agulha.

Distribuição fenotípica das variáveis nas plantas da população-mapa infectadas com *Xf*

A distribuição dos valores médios das variáveis entre os híbridos foi contínua, variando de extrema suscetibilidade a extrema resistência (Figuras 2 a 5). Em outras palavras, a *Xf* foi mais ou menos patogênica, a depender do híbrido em que foi artificialmente inoculada, sugerindo que a resistência precoce de citros à *Xf* seja provavelmente conferida por múltiplos genes.

Segregação transgressiva foi observada para todas as variáveis mensuradas (Tabela 5), i.e., foram identificados híbridos BC₁ cuja magnitude média da variável fenotípica estudada extrapola a média fenotípica detectada nos dois parentais, tendo, inclusive, sido detectado, para as variáveis fisiológicas, que as médias da progênie BC₁ sobrepujaram às médias dos parentais (Tabelas 2).

Segregação transgressiva, geralmente relatada para características herdadas quantitativamente, pode ser definida como o surgimento de descendentes em progênies segregantes cujo valor fenotípico da característica mensurada sobrepuje os valores fenotípicos dos parentais (Rick & Smith, 1953). A ocorrência de híbridos transgressivos resulta, provavelmente, da combinação de alelos positivos ou negativos complementares, que produzam efeitos em direções opostas para a resistência quantitativa, de ambos os progenitores para a característica em estudo (De Vicente & Tanksley, 1993). A ocorrência de alelos parentais crípticos, cujos efeitos são opostos aqueles preditos pelo seu fenótipo, i.e., que contribuem para o aumento da resistência, podendo se originar tanto do parental resistente quanto do suscetível; vem sendo comumente relatada na literatura (Camargo *et al.*, 1995; Prioul *et al.*, 1997; Bubeck *et al.*, 1993). Em outras palavras, alelos de locus que aumentem a resistência a uma determinada doença, dispersos entre os parentais, podem se reunir, por meiose, em indivíduos híbridos, cujo fenótipo ultrapasse a característica mensurada nos pais (Prioul *et al.*, 1997).

Segregação transgressiva é observada tanto em progênies inter quanto intraespecíficas (Paterson *et al.*, 1998; Tanksley *et al.*, 1993), embora haja maior probabilidade de ocorrência em cruzamentos entre progenitores geneticamente distantes entre si. Tangor ‘Murcott’, parental feminino da população-mapa sob estudo, é sabidamente um híbrido interespecífico e há fortes evidências de que a laranja ‘Pêra’

também o é (Araújo, 2002), justificando assim, o fato de o cruzamento entre essas variedades cítricas produzir híbridos BC₁ tão diferentes uns dos outros; a ponto de se detectar fenótipos transgressivos para as variáveis estudadas nesse trabalho.

Há exemplos de distribuição de fenótipos de populações-mapa em que as médias fenotípicas dos parentais não se encontram nas extremidades da distribuição e a média do fenótipo na progênie é menor que a média fenotípica dos parentais, como é o caso da concentração de sorbitol (g/l) em pêssego (Dirlewanger *et al.*, 1999), o que possui analogia com as variáveis fisiológicas mensuradas nas plantas infectadas com a *Xf* no presente estudo (Tabela 5). Emprego dessa distribuição fenotípica distorcida da concentração de sorbitol permitiu a identificação de um QTL para a característica (Dirlewanger *et al.*, 1999). Em se tratando de detecção de QRLs, a presença de segregação transgressiva também não impede com que regiões genômicas associadas à resistência quantitativa sejam identificadas. Exemplo disso é a detecção de 4 QRLs para ‘área foliar doente’, variável com distorção de segregação avaliada em famílias F₃, em repolho, inoculadas com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, responsável pela podridão preta de crucíferas (Camargo *et al.*, 1995).

Segregação transgressiva para variáveis relacionadas a trocas gasosas vem sendo também registrada na literatura (Mahon & Hobbs, 1981; González *et al.*, 1995), inclusive em estudos de mapeamento de QTLs relacionados às variáveis *A* e *gs* relacionados à fotossíntese em uma progênie F₂ de feijoeiro (Bressan-Smith, 1998).

A variável QXF apresentou segregação transgressiva (Tabela 5) e distribuição não normal dos dados (Figura 5). A média da variável QXF mensurada na progênie BC₁ (321,2 UFC/mg) foi menor que a média dos parentais (878,8 UFC/mg), inclinando-se para a média do parental resistente (Tabela 4), tendência essa que vem sendo descrita para diferentes características de resistência à fitopatógenos (Backes *et al.*, 1995; Spaner *et al.*, 1998).

Correlações fenotípicas

Magnitude das correlações fenotípicas entre as variáveis fisiológicas, mensuradas nas plantas inoculadas com a *Xf*, foi elevada ($r = 0,42$ a $0,85$, $p < 0,001$). Esse resultado era previsível, tendo em vista que os parâmetros fotossintéticos da *A*, *gs* e *E* são fisiologicamente associados.

Por sua vez, valores de correlação entre variáveis fisiológicas e QXF foram baixos e não significativos ($r = -0,10$ à $-0,15$; p de $0,17$ à $0,33$). Quantidade de um fitopatógeno vascular e a severidade dos sintomas da doença que é acarretada pelo mesmo são, no geral, fracamente correlacionadas (Vale *et al.*, 2001). Em se tratando dos patossistemas em que a *Xf* está envolvida, o resultado encontrado no presente trabalho aparentemente se opõe à hipótese vigente de que a colonização e a multiplicação da *Xf* no interior do xilema dos hospedeiros resultam em oclusão vascular, seguidas de diminuição da reposição de água perdida pela evapotranspiração e, conseqüentemente, reduções dos níveis fotossintéticos da planta (Machado *et al.*, 1994).

Vários são os motivos que podem, isolada ou conjuntamente, ter acarretado a baixa correlação estatística entre carga bacteriana e capacidade fotossintética das plantas infectadas com a *Xf* da população-mapa. Um aspecto determinante está relacionado ao efeito de amostragem do tecido. Avaliação da quantidade de células de *Xf* para efeito de correlação com fluxo de água não apresentou resultados significativos em estudos microscópicos de contagem de vasos obstruídos pela bactéria em pecíolos de folhas de videira (Goodwin *et al.*, 1988), uma vez que outros vasos, dispostos em diferentes regiões do pecíolo, não contemplados na avaliação, poderiam estar obstruídos.

Os resultados obtidos no presente trabalho validam evidências experimentais de que a porcentagem média de vasos colonizados em pecíolo de folhas de citros com sintomas leves (9,8%) ou intensos (11,8%) são estatisticamente semelhantes e de que a população de *Xf*, determinada pelo isolamento em meio de cultivo, não apresenta relação com a expressão dos sintomas em laranjeira, ameixeira e cafeeiro (Alves, 2003).

Identificação de locus de resistência quantitativa de citros à *Xf*

Desde 1992, resistência quantitativa a fitopatógenos, responsáveis por doenças complexas em diferentes espécies vegetais, tem sido identificada (Heun, 1992; Landry *et al.*, 1992). Em citros até agora, somente dois trabalhos de mapeamento de QRLs foram reportados, o primeiro para o nematóide *Tylenchulus semipenetrans*, responsável por doenças de raiz em citros (Ling *et al.*, 2000) e o segundo para o fungo *Phytophthora parasítica*, responsável pela gomose de citros (Siviero, 2001).

Quanto à CVC, a base genética dos fatores envolvidos na relação planta-patógeno no patossistema *Xylella*-citros é desconhecida. O presente estudo de QRLs à *Xf*

é o primeiro esforço de mapeamento de fatores genéticos controlando resistência quantitativa à *Xf*, tanto em citros quanto em qualquer de uma de suas espécies hospedeiras. Para tanto, foi gerada progênie segregante de citros a partir do cruzamento entre parentais contrastantes para a característica em estudo (Oliveira *et al.*, 2000, 2002); foram construídos mapas genéticos para essa progênie segregante (Oliveira *et al.*, dados não publicados) e, neste presente trabalho, a referida progênie segregante foi avaliada quanto a parâmetros fisiopatológicos da CVC e de quantificação da *Xf*, o que resultou na identificação de dois QRLs (Tabela 7) e seis PQRLs (Tabela 8).

O fato de ter sido encontrado mais de um locus de resistência de citros à *Xf* no mapa de tanger 'Murcott' não constituiu surpresa. Há indícios fortes de que a resistência de citros à *Xf* seja quantitativa. Primeiro, em citros, raros são os caracteres morfo-agronômicos importantes que apresentam herança monogênica (Davis & Albrigo, 1994). Segundo, não menos importante, é o fato de que a *Xf* não apresenta sistema excretor de proteína do tipo III (Simpson *et al.*, 2000), o que impossibilita as suas plantas hospedeiras apresentarem um sistema de defesa monogênico do tipo gene-a-gene (Flor, 1951).

Neste trabalho, locus de resistência quantitativa à *Xf* foram identificados por duas estratégias diferentes (MIC e APM). Regiões genômicas ligadas a características quantitativas são geralmente identificadas e seus efeitos estimados por intermédio de duas ou mais abordagens estatísticas. Geralmente se adota mapeamento por intervalo, simples ou composto, com teste de permutação (Lepinasse *et al.*, 2000), combinado com outra metodologia complementar, tais como ANAVA (Bubeck *et al.*, 1993); análise de regressão *single-point* (García *et al.*, 1999); regressão linear (Grattapaglia *et al.*, 1996); regressão múltipla (Quarrie *et al.*, 1997); teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (Roupe van der Voort *et al.*, 2000) e teste *t* (Soller *et al.*, 1976), essa última considerada uma abordagem-chave em APM (Soller *et al.*, 1976).

O MIC apresenta elevada acurácia quanto à localização de QTLs/QRLs, já que essa abordagem combina mapeamento por intervalo (Lander & Botstein, 1989) com análise de regressão múltipla. No presente trabalho, adotou-se essa estratégia na análise dos grupos de ligação dos mapas M1 e P1, descritos por Oliveira *et al.* (dados não

publicados), construídos com marcadores fAFLPs de segregação 1:1, típica de backcross, conforme García *et al.* (2000).

Por sua vez, a análise de QTLs/QRLs, empregando-se teste *t* de duas amostras, se dá com a comparação das médias fenotípicas de duas classes genotípicas distinguidas pela presença ou ausência do marcador molecular analisando-se, individualmente, cada marcador molecular (Zimnoch-Guzowska *et al.*, 2000). No presente trabalho, essa estratégia foi adotada na análise dos marcadores fAFLPs de segregação 1:1, não ligados a esses dois mapas anteriormente citados e todos os marcadores 3:1, utilizados na construção do mapa M1/3, descrito por Oliveira *et al.* (dados não publicados), tendo em vista que marcadores genéticos não mapeados podem ser utilizados com esse objetivo (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Milach, 1998).

Estudos de QTLs fornecem uma estimativa quanto à natureza oligo ou poligênica de uma característica (Lander & Botstein, 1989). Avaliando conjuntamente os marcadores associados à resistência quantitativa à *Xf*, por essas duas estratégias de análise dos dados, foram detectados 5 QRLs/PQRLs para a performance de taxa fotossintética de plantas infectadas com a *Xf*, 2 QRLs/PQRLs relacionados à quantidade de células de *Xf* no interior da planta e 1 PQRL para o volume de água evapotranspirada por essas mudas de plantas inoculadas com a *Xf* (Tabelas 7 e 8).

A variação fenotípica explicada pelos QRLs/PQRLs, identificados no presente estudo, respondem por 45,8%, 20,46% e 10,56% da variação total das variáveis *A*, QXF e *E*, respectivamente. Dos 8 QRLs/PQRLs identificados, três deles [*Xf*-A1(GL5); *Xf*-QXF(GL4) e *Xf*-E_{n1}] podem ser considerados QRLs ‘major’, por responderem por mais de 10% da variância fenotípica da variável sob estudo, conforme nomenclatura sugerida por Tanksley *et al.* (1993). Como os genomas totais de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’ não foram completamente cobertos pelos marcadores fAFLPs (Oliveira *et al.*, dados não publicados), outros QRLs à *Xf* presentes nesses parentais podem, ainda, serem identificados. Uma estimativa da proporção de QRLs à *Xf* que devem, hipoteticamente, ainda serem identificados, pode ser obtida calculando-se a porcentagem total da variação fenotípica explicada, obtida pela soma da porcentagem da variação de cada um dos QRLs, para uma mesma variável (Thumma *et al.*, 2001). Contudo, conforme enfatizado por Beavis (1998), o valor da magnitude do coeficiente de determinação (R^2) de um

QTL/QRL deve ser interpretado com cautela, já que os mesmos são significativamente influenciados pelo tamanho da população utilizado no estudo.

Tendo em vista que um dos problemas da APM é a detecção de falso QTLs/QRLs, caso o nível de significância seja baixo (Tanksley *et al.*, 1982, 1993), neste estudo estabeleceu-se que marcadores fAFLPs não ligados a um dos três mapas genéticos descritos por Oliveira *et al.* (dados não publicados) estivessem associados a QRLs à *Xf* desde que o teste *t* bilateral, seguido de teste de permutação, acusasse $p \leq 0,01$, diminuindo, assim, a probabilidade de interação de um marcador molecular com QRL artefactual (Tanksley *et al.*, 1993). Estratégias similares vêm sendo empregadas, adotando-se, por exemplo, valor limiar de $p < 0,005$ (Garcia *et al.*, 2000).

Deve ser enfatizado que alguns dos PQRLs detectados a partir de marcadores fAFLPs de segregação 3:1 não ligados no mapa M1/3 (*Xf-A_{nl}1*; *Xf-E_{nl}1*; *Xf-A_{nl}2*; *Xf-QXF_{nl}1*), identificados via APM podem, na verdade, estar ligados entre si e refletirem os efeitos de um mesmo QRL. Assim, com a inserção de novos marcadores moleculares ao referido mapa, os marcadores fAFLPs 3:1 associados a PQRLs identificados no presente estudo podem, hipoteticamente, ligarem-se entre si, reduzindo, então, o número de PQRLs à *Xf* estimado nessa primeira avaliação.

Com relação à variável QXF, que não apresentou distribuição normal (Figura 5), testes de comparação de médias (teste *t* bilateral) e de separação de médias (Scott-Knott), que requerem normalidade dos dados para o seu correto emprego, foram, ainda assim, aplicados. Variáveis com desvios de normalidade diminuem a sensibilidade das análises (deixa de detectar QRLs quando de fato deveriam ser detectados). Contudo, análises similares de dados não normalizados em análises genéticas de locus quantitativos têm sido relatadas (Doebley *et al.*, 1990; Veldboom *et al.*, 1994). À semelhança de Byrne *et al.* (1996), foi aplicado nesse estudo um teste não paramétrico (Teste Mann-Whitney) que validou estatisticamente ($p = 0,0058$) o *Xf-QXF_{nl}1*, PQRL associado à variável QXF, identificado via testes *t* e de permutação.

Testes de aleatorização geram, com base nos próprios dados, as probabilidades usadas para determinar os níveis de significância das diferenças entre grupos, de modo experimental, constituindo uma alternativa aos testes tradicionalmente utilizados (teste *t*, teste F). Métodos baseados em permutação têm a vantagem de serem de distribuição

livre e de não serem limitados pelo design experimental (Churchill & Doerge, 1994). Em síntese, médias fenotípicas são re-amostradas, sem reposição, inúmeras vezes, contra os genótipos, objetivando detectar correlação genotípica-fenotípica oriunda de um QTL/QRL artefactual.

A exata distribuição nula da estatística LOD score empregado no MIC, via aplicativo QTLCartographer, foi obtida através do teste de permutação baseada nos princípios descritos por Churchill & Doerge (1994), de sorte que o desvio da normalidade da distribuição para a variável QXF não afetou a distribuição do teste estatístico LOD usado pelo MIC na detecção de QRLs.

No presente trabalho, julgou-se conveniente submeter os dados de polimorfismo de marcadores fAFLPs em backcross, não ligados aos mapas M1 e P1, e os marcadores fAFLPs 3:1, à análise de permutação (5000 randomizações). Dos 16 marcadores fAFLPs de segregação 3:1 associados à PQRLs via teste t ($p \leq 0,01$), a análise de permutação validou a significância das diferenças entre médias para 5 marcadores fAFLPs ($p \leq 0,01$). Para os dois marcadores fAFLPs de segregação 1:1 associados a PQRLs, a análise de permutação certificou apenas um dos marcadores (Tabela 8). Em outras palavras, com o emprego da análise de permutação, foram detectadas associações PQRL à Xf – marcadores fAFLPs que foram produto do acaso, as quais foram descartadas da APM. Conforme enfatizado por Edgington (1987), mesmo que uma determinada variável apresente distribuição normal na população (o que foi o caso para as variáveis A , g e E , neste estudo), a amostragem aleatória das unidades que compõem o experimento é raramente possível, o que, para o caso dessa pesquisa, justifica o emprego da análise de permutação em estudos de locus de resistência via APM.

Ao total, foram identificados 5 QRLs/PQRLs à Xf a partir do genoma de tangor ‘Murcott’, parental resistente à CVC e 3 PQRLs comuns a ambos os parentais e nenhuma região genômica associada à resistência a essa bacteriose oriunda exclusivamente de laranja ‘Pêra’, variedade cítrica sabidamente suscetível à CVC (Laranjeira *et al.*, 1998) (Tabelas 7 e 8). Os três PQRLs comuns a tangor ‘Murcott’ e a laranja ‘Pêra’ [Xf -A(GL3M1/3); Xf A_{nl}1 e Xf -QXF_{nl}1] podem corresponder a regiões do genoma de *C. sinensis* que estejam presentes na constituição genômica das variedades de

laranja 'Pêra' e tangor 'Murcott', cuja natureza híbrida entre *C. sinensis* e *C. reticulata* foi recentemente demonstrada (Araújo, 2002).

A herdabilidade de um região genômica associada à uma característica quantitativa pode ser aumentada, minimizando-se os efeitos da variação ambiental ou aumentando-se o número de réplicas genotípicas de cada uma das plantas da população-mapa. Diferentemente da grande maioria dos trabalhos de mapeamento em plantas, que se utiliza de populações F_2 ou de backcross de difícil replicação de valores fenotípicos mensurados, requerendo a geração de famílias F_3 individuais e de linhas duplo haplóides ou RILs (Beckmann & Soller, 1989), citros é dotada de mecanismos de reprodução vegetativa que permitem facilmente com que uma mesma planta seja fenotipicamente avaliada em um número ilimitado de clones geneticamente idênticos. A capacidade de replicar vegetativamente a progênie, por meio de enxertia de borbulhas, foi explorada neste trabalho.

É razoável interpretar as regiões genômicas de citros identificadas como QRLs/PQRLs à *Xf*, neste estudo, como sendo decorrentes do método de inoculação empregado, i.e., a mesma população-mapa, submetida a outro método de inoculação de *Xf* pode resultar na detecção de outros QRLs/PQRLs e/ou responder por outras porções da variância percentual da característica, como atestado para o patossistema *Pseudomonas solanacearum*/tomateiro (Danesh *et al.*, 1994).

Obviamente que o número de QRLs calculado no presente trabalho é apenas uma sub-estimativa do número total de QRLs de citros à *Xf*. O tamanho adotado da progênie (87 híbridos BC_1) implica que somente QRLs com grande efeito puderam alcançar significância estatística, o que pode ser atestado pelo fato de que o somatório da variância total de nenhuma das características mensuradas tenha ultrapassado 50%. Aliado a isso, foi impossível avaliar o controle genético da característica como um todo, dado que em diferentes regiões do genoma não foi detectado polimorfismo entre os parentais, conforme relatado por Oliveira *et al.* (dados não publicados). É concebível, portanto, que outros genes de resistência, principalmente os de pequeno efeito, estejam em operação. Populações-mapa numerosas, aproximadamente 2000 indivíduos, em se tratando de plantas F_2 , são requeridas para se detectar fatores genéticos responsáveis por pequenos efeitos (2-3%) sobre a variação fenotípica de características quantitativas

(Soller *et al.*, 1976). Com a saturação desse mapa de ligação, muito possivelmente o número de QRLs à *Xf* variará, já que o número atual de QRLs identificados é função das diferenças genéticas mapeadas entre os dois parentais empregados para dar origem à população segregante. Por essa razão, o número de QRLs encontrados, nesse primeiro relato de mapeamento de QRLs de citros à *Xf*, pode ser considerado como uma estimativa mínima.

Deve ser enfatizado que o mapeamento de QRLs aqui relatado aplica-se somente ao específico ambiente testado e que, conforme prudentemente assinalado por Juenger *et al.* (2000), QRLs/QTLs detectados devem ser considerados como uma hipótese de trabalho até maior avaliação.

Em adição a metodologia de inoculação/avaliação das plantas descrita neste trabalho, é fortemente sugerido que novas abordagens de inoculação sejam empregadas em futuras análises genéticas de QRLs à *Xf*, utilizando a mesma população-mapa avaliada no presente trabalho, principalmente aquelas que contemplem inoculação natural da bactéria por intermédio das cigarrinhas vetoras e avaliação de características associadas à produtividade de frutos da planta.

A escolha de estratégias de inoculação artificial de plantas para o teste de patogenicidade de bactérias é geralmente um compromisso entre o desejável e o possível (Gurr *et al.*, 1992) e, para o presente trabalho, isso não foi diferente. Conforme Gurr *et al.* (1992), o ideal é que a rota de introdução e o caminho percorrido pelo fitopatógeno pela planta sejam o mesmo que ocorre predominantemente na natureza o que, em muitos casos, contudo, envolvem procedimentos caros e demorados (Gurr *et al.*, 1992) e/ou não disponíveis. Embora baixos níveis de inoculação de *Xf* possam melhor diferenciar a resposta de genótipos resistentes e suscetíveis baseados em estudos de multiplicação da bactéria, tendo em vista a existência de período de incubação da *Xf* nessa hospedeira (Fry & Milholland, 1990), pode-se adotar novos experimentos de inoculação artificial com maiores concentrações de inóculo da bactéria.

Avaliações da população-mapa, empregada nesse estudo sob infecção de *Xf*, em condições de campo, obtidas de plantas com diferentes idades, poderão gerar informações a cerca da presença ou não de alterações ontogênicas da resistência

quantitativa de citros à *Xf*, conforme se apresentam em mecanismos de resistência de plantas a outros fitopatógenos (Schaad *et al.*, 1999; Freymark *et al.*, 1993).

Dissecação genética de resistência quantitativa de plantas a fitopatógenos bacterianos vem sendo relatada na literatura. Progenie F₂ de tomate, composta de 71 indivíduos e genotipada com 79 marcadores de DNA, revelou três QRLs à *Pseudomonas solanacearum*, causadora da murcha bacteriana (Danesh *et al.*, 1994). Um conjunto de 70 famílias F₃, derivadas de progenie F₂ de feijoeiro, genotipado com 152 marcadores RFLPs permitiu a identificação de quatro QRLs à *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, responsável pela murcha bacteriana do feijoeiro (Nodari *et al.*, 1993).

Identificação de QTLs relacionados a parâmetros fisiológicos vinculados à resistência a fatores abióticos, como seca e frio, vem sendo descrita. QTLs foram identificados para aumento da pressão osmótica celular sob déficit hídrico dentro de folhas de arroz submetidas à seca (Lilley *et al.*, 1996) e para condutância estomática de milho sob seca (Lebreton *et al.*, 1995). Recentemente, Fracheboud *et al.* (2002) identificaram QTLs para tolerância do processo da fotossíntese ao frio, em milho.

O que podem ser, funcionalmente, QRLs de citros à *Xf*?

A identificação de QRLs, incluindo aqui os identificados no presente estudo, é baseada somente em termos de probabilidade calculada pelas funções de mapeamento adotadas, não se determinando que tipo de expressão gênica (constitutiva, induzida) e que produto gênico (enzima, proteína, glicoproteína, etc) é codificado.

A partir dos resultados do presente trabalho, pode-se inferir que determinadas plantas da população-mapa mantiveram a capacidade fotossintética a mais altos níveis e a carga bacteriana a baixos níveis nos híbridos resistentes do que nos suscetíveis, indicando que híbridos resistentes mantêm, de alguma forma, o sistema de transporte do caule funcionando adequadamente, mesmo infectadas com a *Xf*.

Seguindo a lógica das interações entre planta e patógeno, descritas por Staskavicz (1995), podemos entender que a interação entre *Xf* e citros é do tipo de interação compatível, onde o patógeno é virulento (ausência de genes *avr*) e as plantas hospedeiras, com ou sem genes de resistência, apresentam uma lenta ativação de mecanismo de defesa.

A resistência de um hospedeiro, dentro do contexto da fisiologia do parasitismo, pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos e é caracterizada por sua natureza dinâmica e coordenada, em que a efetividade depende da expressão dos seus mecanismos em uma sequência lógica, após o contato do patógeno com o hospedeiro em potencial (Pascholati & Leite, 1994).

Os indícios obtidos no presente trabalho sinalizam que a resistência de citros à *Xf* seja conferida poligenicamente, face ao número de QRLs (2) e PQRLs (6) detectados. Pode-se inferir, ainda, adotando-se a classificação sugerida por Camargo (2000) de que os QRLs identificados no presente estudo sejam do tipo horizontal, tendo em vista que se determinou que essa bactéria não contém sistema excretor de proteínas do tipo III (Simpson *et al.*, 2000), o que impossibilitaria a planta de reconhecer o patógeno e agir via sistema de defesa gene-a-gene.

Para o patossistema *Xylella*-videira, por exemplo, há relatos de que plantas resistentes ou tolerantes à *Xf* apresentam barreiras estruturais e substâncias inibidoras que inibem a multiplicação e translocação da bactéria (Mollenhauer *et al.*, 1976). Essa restrição à colonização da bactéria seria feita por tiloses e gomas, produzidas pelo hospedeiro (Fry & Milholland, 1990). Cultivares suscetíveis de videiras não conseguem restringir a colonização sistêmica. Por sua vez, videiras suscetíveis à *Xf* apresentam grande produção de gel e de pectina, o que poderia explicar o desenvolvimento dos sintomas em videiras suscetíveis (Fry & Milholland, 1990). Alguns estudos envolvendo o mecanismo de resistência a *Xf* de plantas de videira vêm sendo feitos. Fry & Milholland (1990) estudaram, através de cortes histológicos e técnicas de coloração, três cultivares tomando como sinais de resistência o percentual de vasos obstruídos por bactérias, tiloses, substâncias pécicas, gomas e tanino. Observaram que a cultivar suscetível aparentemente não consegue localizar a bactéria com tiloses e gomas, não prevenindo sua movimentação sistêmica ascendente (Fry & Milholland, 1990).

Pode-se supor que alguns dos QRLs identificados no presente estudo estejam, relacionados à resistência bioquímica da planta à *Xf*. Para o patossistema *Xylella*-citros, formação de cristais no lúmen de vasos do xilema do pecíolo infectado com a bactéria foi observada e microanálises de raios X sugerem que esses cristais sejam de hesperidina

(Alves, 2003), glicosídeo rico em vitamina P, que está relacionado ao mecanismo de defesa de plantas de citros e de café (Machado, E.C., comunic. pessoal, 2003). Recentemente, caracterização funcional de genes diferencialmente expressos de plantas de laranja doce infectadas com *Xf* usando EST, tendo por base as plantas da população-mapa infectadas com *Xf*, demonstrou a presença de quatro subconjuntos de seqüências exclusivamente encontradas em plantas infectadas com *Xf*. O maior subconjunto inclui diferentes proteínas que podem ser relacionadas à resposta de estresse biótico e abiótico. Um segundo subconjunto contém proteínas associadas à resistência (Astua-Monge *et al.*, 2002).

Além de refletir, hipoteticamente, um mecanismo bioquímico da planta em resposta à infecção pela *Xf*, os QRLs de citros à *Xf* identificados no presente estudo podem, em tese, estar relacionados a algum evento fisiológico intrínseco da planta que a torna mais eficiente quanto ao uso de água, por exemplo. Trabalho recente da fisiologia de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’ revela que a eficiência do uso de água (EUA) da primeira variedade é maior que a da segunda (Medina, C.L., comunicação pessoal, 2003), o que pode tornar plantas de tangor ‘Murcott’ mais resistentes ao estresse hídrico de natureza abiótica e biótica, como o provocado pela multiplicação de *Xf* no interior de vasos xilemáticos.

Um componente morfológico da resistência de tangor ‘Murcott’ à *Xf*, pode ter sido transferida para a descendência. Menor colonização de vasos do xilema em plantas de citros, em relação à ameixeira e cafeeiro, pode ser dever a maior proporção de vasos pontuados (Alves, 2003). Desse modo, pode-se especular que tangor ‘Murcott’ tenha uma frequência de vasos pontuados ainda maior que o detectado em laranja ‘Pêra’.

7.7. Perspectivas

Esse é o primeiro trabalho que relata QRLs à *Xf* em qualquer dos patossistemas em que esta bactéria está envolvida. Esta pesquisa revela os primeiros passos em direção à identificação de QRLs à *Xf* em citros. Embora limitados, os QRLs relacionados à assimilação líquida de CO₂, transpiração e carga bacteriana fornecem importantes informações a respeito da resistência de citros a esse patógeno. A ampliação do tamanho da população-mapa e a inclusão de novos marcadores moleculares contribuirão para a

saturação do mapa de ligação existente e aumentarão a consistência e a precisão de QRLs mapeados.

A melhor aferição do impacto de doenças sobre uma planta é a redução de sua capacidade produtiva, em condições de campo (Flament *et al.*, 2001). Desse modo, é necessário que estudos sejam feitos quanto à correlação entre as variáveis mensuradas neste trabalho e à performance de produção de frutos, para essa ou outras populações híbridas de citros. A detecção de forte correlação positiva entre eventos de expressão de resistência precoce e de campo de plantas cítricas à *Xf* permitiria com que marcadores moleculares ligados a esses QRLs precoces de citros à *Xf* possam ser empregados em programas de seleção assistida por marcador. As mudas da população-mapa desse experimento foram transferidas da casa-de-vegetação para o campo e serão avaliadas quanto à expressão de sintomas da CVC, para a validação dos resultados relatados neste trabalho.

7.8. Referências Bibliográficas:

- AGRIANUAL *Anuário estatístico da Agricultura Brasileira*. São Paulo. FNP - Consultoria e Comércio, 1999. 481p
- ALMEIDA, B. S. V. *Análise do proteoma do fluido intercelular de folhas de laranjeiras infectadas com Xylella fastidiosa*. Piracicaba, ESALQ, 2001. 59 p. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'.
- ALTHAUS, R. A; CANTERI, M. G. & GIGLIOTI, E. A. *SASM-Agri*: versão 3.21. Ponta Grossa: Editora da Universidade Federal de Ponta Grossa, 2002.
- ALVES, E. *Xylella fastidiosa: adesão e colonização em vasos do xilema de laranjeira doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno*. Piracicaba, ESALQ, 2003. 213 p, Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'.

- AMARO, A. A.; MAIA, M. L. & GONZALEZ, M. A. Efeitos econômicos decorrentes da clorose variegada dos citros. In: DONADIO, L. C. & MOREIRA, C. S. (eds) *Clorose Variegada dos Citros*. Bebedouro: EECB, 1997. 162 p.
- ARAÚJO, E. F. *Filogenia de citrus e gêneros afins*. Campinas, UNICAMP, 2002. 120 p. Tese (Doutorado) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- ASTUA-MONGE, G. *et al.* Functional characterization of differentially expressed genes from sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa* using EST. *Fitopatol bras*, v. 27(supl.), p. 220, 2002.
- AYRES, A.J. Clorose variegada dos citros em pomares comerciais do estado de São Paulo e sul do triângulo mineiro. *Fitopatol bras*, v.26, n. Suplem, p.247, 2001.
- AYRES, M. *et al.* BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Publicações Avulsas Mamirauá. 272p. Belém/PA: Sociedade Civil Mamirauá. 2000.
- BACKES G., A. *et al.* Localization of quantitative trait loci (QTL) for agronomic important characters by the use of a RFLP map in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet*, v. 90, p. 294-302, 1995.
- BASSANEZI, R. B. *et al.* Efeito da antracnose na eficiência fotossintética do feijoeiro. *Fitopatol bras*, v. 22, p. 520-524, 1997.
- BASTEN, C. J.; WEIR, B. S. & ZENG, Z. B. *QTL Cartographer. A reference manual and tutorial for QTL mapping*. Version 1.14, Raleigh, Department of Statistics, North Caroline State University, 2000.
- BEAVIS, W. D. QTL analyses: power, precision, and accuracy. In: PATERSON, AH (ed.) *Molecular Dissection of Complex Traits*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 145-162, 1998.
- BEIGUELMAN, B. *Curso Prático de Bioestatística*. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética, 1994.

- BOVÉ, J.M. & GARNIER, M. Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. *Plant Science*, v. 163, p. 1083-1098, 2002.
- BRESSAN-SMITH, R. E. *Mapeamento de locos de características quantitativas associados com a morfologia, a fotossíntese e o rendimento do feijão (Phaseolus vulgaris L.)*. Campos dos Goytacazes, UENF, 1998. 99 p, Tese (Doutorado), Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- BUBECK, D. M. *et al.* Quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot in maize. *Crop Sci*, v. 33, p. 838-847, 1993.
- BYRNE, P. F. *et al.* Quantative trait loci and metabolic pathways: Genetic control the concentration of maysin, a corn earworm resistance fator, in maize silks. *Proc Natl Acad Sci. USA*, v. 93, p. 8820-8825, 1996.
- CALEGARI, M. & CASTRO, M. Proteção contra *Xylella fastidiosa* Wells em laranjeira 'Pêra' através da aplicação do ativador de plantas acibenzolar-S-Methyl. *Fitopatol bras* v. 25, p. 329, 2000.
- CAMARGO, L. E. A. Mapeamento de QRL's: contribuições e perspectivas. (In: PINHEIRO, J.B. & CARNEIRO, I.F.; Análise de QTL no melhoramento de plantas.) p. 49-62. UFG, 2000.
- CAMARGO, L. E. A.; WILLIAMS, P. H. & OSBORN, T. C. Mapping of Quantitative Trait Loci Controlling Resistance of *Brassica oleracea* to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the Field and Greenhouse. *Phytopatology*, v. 85, p. 1296-1300, 1995.
- CARVALHO, S. A. & LARANJEIRA, F. F. Protótipo de viveiro de mudas certificadas e borbulheiras sob telado à prova de afídeos do Centro de Citricultura - IAC. *Laranja*, v. 15, p. 213-220, 1994.
- CHANG C.J. *et al.* Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Curr Microbiol*, v. 27, p. 137-142, 1993.

- CHURCHIL, G. A. & DOERGE, W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, v. 138, p. 963-971, 1994.
- COHEN, M. Hydraulic conductivity of wood of trees with citrus blight. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, v. 92, p. 68-70, 1979.
- DANESH, D. *et al.* Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. *Mol Plant-Microbe Interact*, v. 7, p. 464-471, 1994.
- DAVIES, F. & ALBRIGO, L.G. *Citrus*. Walingford: CAB International, 1994, 245p.
- DE VICENTE, M. C. & TANKSLEY, S. D. QTL analysis of transgressive segregation in a interspecific tomato cross. *Genetics*, v. 134, p. 585-596, 1993.
- DIRLEWANGER E. *et al.* Mapping QTLs controlling fruit quality in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch. *Theor Appl Genet*, v. 98, p.18-31, 1999.
- DOEBLEY, J. *et al.* Genetic and morphological análisis of a maize-teosinte F₂ population implications for the origin of maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 87, 9888-9892.
- EDWARDS, M. D.; STUBER, C. W. & WENDEL, J. F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. 1. Numbers, genomic distribution and types of gene action. *Genetics*, v. 116, p. 113-125, 1987.
- FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G.W. & GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H. *et al.* (eds) *Manual de Fitopatologia*. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v. 2, 1997, 919.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: Luma, 1996, p. 220.
- FIGUEIREDO, J.O. *et al.* Produção inicial do tangor ‘Murcote’ sobre dezesseis porta-enxertos em São Paulo. *Laranja*, v. 18, p. 165-173, 1997.
- FLAMENT, M. H. *et al.* Genetic mapping of resistance factors to *Phytophthora palmivora* in cocoa. *Genome*, v. 44, p. 79-85, 2001.

- FLOR, H.H. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv Genet*, v. 8, p. 29-54, 1956.
- FRACHEBOUD, Y. *et al.* Identification of quantitative trait loci for cold-tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). *J Exp Botany*, v. 53, p. 1967-1977, 2002.
- FREYMARK P. J. *et al.* Quantitative and qualitative trait loci affecting host-plant response to *Exserohilum turcicum* in maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet*, v. 87, p. 537-544, 1993.
- FRY, S. M. & MILHOLLAND, R. D. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevines resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. *Phytopathol*, v.80, p.61-65, 1990.
- FULTON, T. M. *et al.* Advanced backcross QTL analysis of *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon parviflorum* cross. *Theor Appl Genet*, v. 100, p. 1025-1042, 2000.
- FURLANI, P. R. Instruções para o cultivo de hortaliças de folhas pela técnica de hidroponia. Instituto Agrônômico, Campinas Boletim Técnico número 168. 30 p. 1997.
- GARCÍA, M. R. *et al.* Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. *Theor Appl Genet*, v. 99, p. 511-518, 1999.
- _____; ASÍNS, M.J. & CARBONELL. QTL analysis of yield and seed number in Citrus. *Theor Appl Genet*, v. 101, p. 487-493, 2000.
- GERMANÀ, C.; CONTINELLA, A & SARDO, V. Biotic and abiotic factors influencing Carbon exchange rate in Citrus. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, USA, 2000 (in press).
- GOMES, M. M. A. *Relações hídricas, trocas gasosas e conteúdo de ácido abscísico e ácido 3-indol acético em laranjeiras 'Pêra' com clorose variegada dos citros.* Campinas, UNICAMP, 2001. 133 p., Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas.

- GONZÁLES, A. *et al.* Characters related to leaf photosynthesis in wild populations and landraces in common bean. *Crop Sci*, v.35, p. 1468-1476, 1995.
- GOODMAN, R.; KIRALY, Z. & WOOD, K. R. The biochemistry and physiology of plant disease. Columbia, Missouri: University of Missouri Press, 1986.
- GOODWIN P.H.; DEVAY, J.E. & MEREDITH, C.P. Physiological responses of *Vitis vinifera* cv. "Chardonnay" to infection by the Pierce's disease bacterium. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 32, p. 17-32, 1988.
- GRATTAPAGLIA, D. *et al.* Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using a maternal half-sib family and RAPD markers. *Genetics*, v. 144, p. 1205-1214, 1996.
- GRAVENA, S. *et al.* The *Xylella fastidiosa* vectors. Citrus Variegated Chlorosis. Bebedouro: EECB. p.36-53, 1997.
- GURR, S. J.; McPHERSON, M. J. & BOWLES, D. J. *Molecular plant pathology*. Oxford University Press, 1992.
- HABERMANN, G. *Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras-doce (Citrus sinensis L. Osb. cv Pêra) com clorose variegada dos citros (CVC)*. Botucatu, UNESP, 1999. 79 p., Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista.
- HEARN, C. J.; HUTCHISON, D. J. & BARRETT, H.C. Breeding citrus rootstocks. *HortScience*, v. 9, n.4, p.357-358, 1974.
- HILL, B. L. & PURCELL, A. H. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. *Phytopathol*, v. 85, p. 1368-1372, 1995.
- HOPKINS, D. L. Production of diagnostic symptoms of blight in citrus inoculated with *Xylella fastidiosa*. *Plant Dis*, v. 72, p. 432-435, 1988.
- JUENGER, T.; PURUGGANAN, M. & MACKAY, T. F. C. Quantitative trait Loci for floral morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, v. 156, p. 1379-1392, 2000.

- LANDER, E. S & BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, v. 121, p. 185-199, 1989.
- LANDRY, B. S. *et al.* A genetic map of *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping resistance genes to race 2 of *Plasmodiophora brassicae* (Woronin). *Genome*, v. 35, p. 409-419, 1992.
- LARANJEIRA, F.F. Dez anos de clorose variegada dos citros: o que sabemos? *Laranja*, v. 18, p. 123-141, 1997.
- _____. *et al.* Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo. *Fitopatologia bras*, v. 23, n. 2, p.147-154, 1998.
- LEBRETON, C. *et al.* Identification of QTL for drought responses in maize and their use in testing causal relationships between traits. *J Exp Botany*, v. 46, p.853-865, 1995.
- LEE, R. F. *et al.* Citrus Variegated Chorois confirmation of a *Xylella fastidiosa* as the causal agent. *Summa Phytopathologica*, v. 19, p. 123-125, 1993.
- LEITE Jr., R. P.; LEITE, R. M. V. B. C. & CERESINI, P. C. Ausência de patogenicidade de *Xylella fastidiosa* da escaldadura da folha da ameixeira na cultivar de pessegueiro flordasun. *Pesq Agrop Bras*, v.33, p. 1653-1660, 1998.
- LESPINASSE, D. *et al.* A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea spp.*) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. *Theor Appl Genet*, v. 100, p. 127-138, 2000.
- LI, W. *Avaliação do comportamento de variedades de copas e porta-enxertos à Clorose variegada dos Citros*. Jaboticabal, UNESP, 1997. 103p., Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista.
- LILLEY, J.M. *et al.* Locating QTL for osmotic adjustment and dehydration tolerance in rice. *J Exp Botany*, v. 47, p. 1427-1436, 1996.

- LIMA, J. E. O. A pesquisa sobre amarelinho no FUNDECITRUS. *Laranja*, v. 16, n.2, p.137-144, 1995.
- LING, P. *et al.* Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. *Theor Appl Genet*, v. 100, p. 1010-1017, 2000.
- LOPES, M. T. V. C. *et al.* Optimum inoculum concentration for needle inoculation of citrus seedlings with *Xylella fastidiosa* in pathogenicity assays. *I Simpósio Genoma Funcional da Xylella fastidiosa*. Serra Negra, 2001. p. 51
- LOPES, S. A. & SOUZA, V. Colonização de plantas de fumo pela *Xylella fastidiosa* dos citros e transmissão do patógeno por cigarrinhas (*Ferrariana trivittata*). *Fitopatol bras*, v. 26, p. 305, 2001.
- LORETO, F.; BURDSALL, JR., H. H. & TIRRO, A. *Armillaria* infection and water stress influence gas-exchange properties of Mediterranean trees. *HortScience*, v. 28, p. 222-224, 1993.
- MACHADO, E. C. *et al.* Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com Clorose Variegada dos Citros. *R Bras Fisiol Veg*, v. 6, p. 53-57, 1994.
- MACHADO, M. A. *et al.* Avaliação de transmissão e seleção de variedades à clorose variegada dos citros (CVC). *Laranja*, v. 13, p. 515-531, 1992.
- MACHADO, M. A. *et al.* Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. *Euphytica*, v. 92, p. 321-326, 1996.
- MACHADO, M. A. *et al.* Genome and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*. *Molecular Biology Today*, v. 2, p. 33-43, 2001.
- MAHON, J. D. & HOBBS, L. A. Selection of peas for photosynthetic CO₂ exchange rate under field conditions. *Crop Sci*, v. 21, p. 616-621, 1981.
- MARKS, S. & CLAY, K. Physiological responses of *Festuca arundinacea* to fungal endophyte infection. *New Phytologist*, v. 133, p. 727-733, 1996.

- MEDINA, C. L. *Fotossíntese, relações hídricas e alterações bioquímicas em laranjeira 'Pêra' com CVC e submetida à deficiência hídrica*. Campinas, UNICAMP, 2002. 147 p., Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas.
- MIKLAS, P. N. *et al.* Seletive Mapping of QTL conditioning Disease resistance in common bean. *Crop Sci*, v. 36, p. 1344-1351, 1996.
- MILACH, S. C. K. Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre, UFRGS, p. 141, 1998.
- MINSAVAGE, G. V. *et al.* Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathol*, v. 84, p. 456-461, 1994.
- MOREIRA, C. & MOREIRA, S. História da Citricultura no Brasil. In: RODRIGUEZ, O.; *et al.* Citricultura brasileira. Fundação Cargill, p.1-22, 1991.
- MORESHET, S. *et al.* Water relations of citrus exocortis viroid-infected grapefruit trees in the field. *J Exp Botany*, v. 49, p. 1421-1430, 1998.
- MOURÃO FILHO, F. A. A. *et al.* Melhoramento dos citros para resistência à CVC. In: DONADIO, L.C. & MOREIRA, C.S. (eds) *Clorose Variegada dos Citros*. Bebedouro: EECB, 1997, 162p.
- NODARI R. O. *et al.* Toward an integrated map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. *Genetics*, v. 134, p. 341-350, 1993.
- NUNES, W. M. C. *Epidemiologia da clorose variegada dos citros (CVC) avaliada por sintomas e diagnóstico serológico e molecular de Xylella fastidiosa*. Botucatu, UNESP, 1999. 144 p., Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista.
- OLIVEIRA, A. C. *et al.* Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. *Euphytica*, v. 128, p. 397-403, 2002.
- _____. Identification of sexual and nucellar Citrus seedlings through single and duplex PCR of simple sequence repeat locus. *Proc. Intl. Soc. Citriculture IX Congress*, v. 1, p. 138-141, 2000a.

- _____. Adaptation of minipreps-SDS and single-step in the extraction of citrus DNA for PCR analyses. *Proc. Intl. Society Citriculture* v. 1, p. 105-107, 2000b.
- PASCHOLATI, S. F. & LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. *Rev Anu Patol Plant*, v. 2, p. 1-47, 1994.
- PATERSON A. H. L. *et al.* Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature*, v. 335, p.721-726, 1988.
- PINTO, L. S. R. C. *et al.* Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency. *New Phytol*, v. 147, p. 609-615, 2000.
- POMPEU Jr, J. *et al.* Detecção de sintomas de CVC e *Xylella fastidiosa* em plantas cítricas infectadas em condições de campo. *Laranja*, v.19, p.321-330, 1998.
- POOLER, M. R. & HARTUNG, J. S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Curr Microbio*, v. 31, p. 377-38, 1995.
- PRIOUL, J.-L. *et al.* Dissecting complex physiological functions through the use of molecular quantitative genetics. *J Exp Bot*, v. 48, p. 1151-1163, 1997.
- QUARRIE, S. A. *et al.* QTL analysis to study the association between leaf size and abscisic acid accumulation in droughted rice leaves and comparisons across cereals. *Plant Mol Biol*, v. 35, p. 155-165, 1997.
- RAVA, C. A. & SARTORATO, A. Conceitos básicos sobre doenças de plantas. In: SARTORATO, A.; RAVA, C.A. (eds.) *Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle*. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994.
- RIBEIRO, R. V. *Influência da temperatura na fotossíntese de laranjeira 'Pêra' com clorose variegada dos citros*, Piracicaba, ESALQ, 2002. 73 p., Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'.

- RICHARDSON, M. D.; HOVELAND, C. S. & BACON, C. W. Photosynthesis and stomatal conductance of symbiotic and non-symbiotic tall fescue. *Crop Science*, v. 33, p. 149, 1993.
- RODAS, V. Z. Convivência com a clorose variegada dos citros. *Laranja*, v. 15, p. 129-133, 1994.
- ROUPPE van der VOORT, J. *et al.* Two additive QTLs conferring broad-spectrum resistance in potato to *Globodera pallida* are localized on resistance gene clusters. *Theor Appl Genet*, v. 101, p. 1122-1130, 2000.
- SAEED, I. A. M.; McGUIDWIN, A. E. & ROUSE, D. I. Disease Progress Based on Effects of *Verticillium dahliae* and *Pratylenchus penetrans* on Gas Exchange in Russet Burbank Potato. *Phytopathol*, v. 87, p. 440-445, 1997.
- SALIBE, A. B. *Reação de plantas cítricas à bactéria Xylella fastidiosa em função de diferentes métodos de inoculação*. Piracicaba, ESALQ, 2001. 75 p., Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'.
- SALVA, R. A.; ROBERTO, S. R. & CARLOS, E. F. Situação da clorose variegada dos citros no estado de São Paulo. *Laranja*, v. 16, n. 2, p. 145-154, 1995.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. E. & MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- SCARPARI, L. M. *Modulação da expressão de genes de patogenicidade em Xylella fastidiosa sob condições de baixa e alta densidade celular*. Piracicaba, ESALQ, 2001. 85p., Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".
- SCHAAD, N. W. & FREDERICK, R. D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Can J Plant Pathol*, v. 24, p. 250-258, 2002.
- SCHAAD, N. W. *et al.* Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and automated realtime fluorescence detection system. *Plant Dis*, v. 83, p.1095-1100, 1999.

- SILVA, F. R. *et al.* Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *FEMS Micro-Biol lett*, v. 203, p. 165-171, 2001.
- SIMPSON, A. J. G., *et al.* The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, v. 406, n. 6792, p. 151-159, 2000.
- SIVIERO, A. *Avaliação de métodos de inoculação de Phytophthora parasítica e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de Citrus sunki vs. Poncirus trifoliata à gomose*. Botucatu, UNESP, 2001. 117 p., Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista.
- SOLLER, M.; BRODY, T. & GENIZI, A. On the power of experimental designs for detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. *Theor Appl Genet*, v. 47, p. 35-39, 1976.
- SPANER, D. *et al.* Mapping of disease resistance loci in barley on the basis of visual assessment of naturally occurring symptoms. *Crop Sci*, v. 38, p. 843-850, 1998.
- STASKAWICZ, B. J. *et al.* Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, v. 268, p. 661-667, 1995.
- SYVERTSEN, J. P. Light acclimation in citrus leaves. II. CO₂ assimilation and light, water, and nitrogen use efficiency. *J Amer Soc Hort Sci*, v. 109, p. 812-817, 1984.
- TANKSLEY, S. D. Mapping polygenes. *Ann Rev Genet*, v. 27, p. 205-233, 1993.
- TANKSLEY, S. D.; MEDINA-FILHO, H & RICK, C.M. Use of naturally-occurring enzyme variation to detect and map gene controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. *Heredity*, v. 49, p. 11-25, 1982.
- THUMMA, B. R. *et al.* Identification of causal relationships among traits related to drought resistance in *Stylosanthes scabra* using QTL analysis. *J Exp Botany*, v. 52, n. 355, p. 203-214, 2001.

- TOZLU, I.; GUY, C. L. & MOORE, G. A. QTL analysis of morphological traits in an intergeneric BC1 progeny of *Citrus* and *Poncirus* under saline and nonsaline environments. *Genome*, v.42, p. 1020-9, 1999a.
-
- _____. QTL analysis of Na⁺ and Cl⁻ accumulation related traits in an intergeneric BC1 progeny of *Citrus* and *Poncirus* under saline and nonsaline environments. *Genome*, v.42, p. 692-705, 1999b.
- VALE, F. X. R.; PARLEVLIET, J. E. & ZAMBOLIN, L. Concepts in plant disease resistance. *Fitopatol bras*, v. 26, p. 577-589, 2001.
- VELDBOOM, L. R., LEE, M. & WOODMAN, W. L. Molecular-marker-facilitated studies in an elite maize population. I. Linkage analysis and determination of QTL for morphological traits. *Theor Appl Genet*, v. 88, p. 7-16, 1994.
- VU, J. C. V.; YELENOSKY, G. & BAUSHER, M. G. CO₂ exchange rate, stomatal conductance, and transpiration in attached leaves of Valencia orange. *HortSci*, v. 21, p. 143-144, 1986.
- WELLS, J. M. *et al.* *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 37, p. 136-143, 1987.
- ZENG, Z. B. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, v. 136, p. 1457-1468, 1994.
- ZENG, Z. B. Theoretical basis of separation of multiple linked gene effects on mapping quantitative trait loci. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 90, p. 10972-10976, 1993.
- ZIMNOCH-GUZOWSKA, E. *et al.* QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* spp. *Atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP, and resistance-gene-like markers. *Crop Sci*, v. 40, p. 1156-1167, 2000.
- ZONTA, E. P. & MACHADO, A. A. SANEST. Sistema de análise estatística para microcomputadores. UFPel-RS, 1986.

7.9. Tabelas

Tabela 1. Probabilidade da estatística F e coeficiente de variação (CV%) obtida de análise de variância de dados *per se* das variáveis assimilação líquida de CO₂ (*A*), condutância estomática (*g_s*), concentração de CO₂ interno (*C_i*) e transpiração (*E*), referentes à população de 87 híbridos BC₁ derivados do cruzamento entre tangor ‘Murcott’ e laranja doce ‘Pêra’.

Causas de Variação:	<i>A</i> ^[1]	<i>g_s</i> ^[2]	<i>C_i</i> ^[3]	<i>E</i> ^[4]
Estado sanitário (ES) ^[5]	0,00001	0,00005	0,799	0,00001
Genótipo (G)	0,00001	0,00001	0,0567	0,00001
Interação ES x G	0,00055	0,00153	0,009	0,00110
CV% (genótipo)	37,04%	42,53%	9,23%	37,04%
CV% (sanidade)	36,51%	44,07%	10,27%	36,51%

Obs.: ^[1] medida em mmol CO₂ m⁻².s⁻¹; ^[2 e 4] medida em mmol H₂O m⁻².s⁻¹; ^[3] medida em mmol CO₂ mol⁻¹; ^[5] refere-se à condição inoculada (plantas-teste) e sadia (plantas-controle).

Tabela 2. Valores mínimo, máximo e médio das variáveis assimilação líquida de CO₂ (*A*), condutância estomática (*g*s), concentração de CO₂ interno (*C*_i) e transpiração (*E*) apresentados pelas plantas da população-mapa sadias e inoculadas com a *Xf*.

Variável	<i>A</i> ^[1]	<i>g</i> ^[2]	<i>E</i> ^[3]
Plantas controle (sadias)			
Mínima	2,48	0,023	0,53
Máxima	9,07	0,135	2,95
Média	5,45	0,074	1,58
‘Murcott’	5,59	0,072	1,66
‘Pêra’	6,71	0,096	2,22
Plantas teste (inoculadas)			
Mínima	1,78	0,023	0,47
Máxima	7,88	0,155	2,74
Média	4,52	0,063	1,34
‘Murcott’	4,15	0,074	1,51
‘Pêra’	3,27	0,037	0,90

Obs.: ^[1] medida em mmol CO₂ m⁻².s⁻¹; ^[2 e 3] medida em mmol H₂O m⁻².s⁻¹).

Tabela 3. Probabilidade da estatística F e coeficiente de variação (CV%) obtidos de análise de variância de dados *per se* e transformados [$\log n + 1$] da variável quantidade de *Xylella fastidiosa* (QXF) mensurada na população-mapa de tangor Murcott e laranja doce 'Pêra' inoculadas com a *X. fastidiosa*.

Causas de Variação	dados não transformados	dados transformados
Bloco	0,58	0,71
Genótipo (G)	0,006	0,006
CV%	67,04	11,05

Tabela 4. Valores mínimo, máximo e médio da quantidade de *Xylella fastidiosa* detectada na população-mapa de tangor 'Murcott' e laranja doce 'Pêra' inoculadas com a *X. fastidiosa*.

	QXF ^[1]
Mínima	0,2
Máxima	2302,9
Média	321,2
'Murcott'	0,65
'Pêra'	1757,1

Observações: ^[1]: Número de UFC/mg de tecido vegetal amostrado.

Tabela 5. Resultados médios obtidos da mensuração das variáveis assimilação fotossintética líquida de CO₂ (A), condutância estomática (gs), transpiração (E) e quantidade de *Xylella fastidiosa* (QXF) em quatro mudas das plantas da população-mapa artificialmente infectadas com a *X. fastidiosa*.

Híb./Par.	A ^[1]	Híb./Par.	gs ^[2]	Híb./Par.	E ^[2]	Híb./Par.	QXF ^[3]
H 6	7,88 a	H 40	0,155 a	H 27	2,74 a	H 20	0,2a
H 27	7,46 a	H 27	0,154 a	H 59	2,52 a	H 25	0,41a
H 17	7,19 a	H 6	0,135 a	H 5	2,43 a	H 41	0,41a
H 74	7,05 a	H 59	0,128 a	H 40	2,23 a	H 50	0,41a
H 59	7,03 a	H 87	0,117 a	H 87	2,13 a	H 72	0,41a
H 33	6,92 a	H 26	0,111 b	H 26	2,12 a	Murc.	0,65a
H 36	6,77 a	H 5	0,103 b	H 33	2,12 a	H 51	0,89a
H 34	6,41 a	H 17	0,098 b	H 6	2,11 a	H 53	1,24a
H 40	6,20 a	H 33	0,097 b	H 17	2,04 a	H 89	2,53a
H 28	6,16 a	H 34	0,093 b	H 34	1,95 a	H 80	4,81a
H 26	6,08 a	H 74	0,090 b	H 12	1,95 a	H 30	5,28a
H 20	6,06 a	H 78	0,088 b	H 20	1,87 b	H 84	6,84a
H 68	5,91 b	H 48	0,086 b	H 74	1,86 b	H 85	7,14a
H 16	5,86 b	H 28	0,085 b	H 48	1,85 b	H 76	7,52a
H 12	5,80 b	H 12	0,085 b	H 28	1,83 b	H 16	7,58a
H 87	5,61 b	H 20	0,085 b	H 78	1,77 b	H 34	7,70a
H 86	5,48 b	H 49	0,081 b	H 25	1,67 b	H 35	7,74a
H 71	5,46 b	H 82	0,080 b	H 71	1,66 b	H 73	9,29a
H 52	5,42 b	H 69	0,079 b	H 69	1,64 b	H 12	9,84a
H 48	5,38 b	H 36	0,077 b	H 49	1,62 b	H 87	10,25a
H 82	5,35 b	H 85	0,077 b	H 82	1,61 b	H 7	10,64a
H 78	5,30 b	H 19	0,076 b	H 36	1,58 b	H 8	12,2a
H 72	5,22 b	H 7	0,075 b	H 52	1,57 b	H 28	12,96a
H 70	5,22 b	H 25	0,074 c	H 31	1,54 b	H 52	17,94a
H 24	5,18 b	Murc.	0,073 c	H 68	1,54 b	H 18	31,97a
H 9	5,18 b	H 16	0,072 c	H 85	1,53 b	H 36	32,76a
H 79	5,14 b	H 54	0,072 c	H 7	1,53 b	H 10	37,54a
H 31	5,13 b	H 68	0,071 c	H 80	1,51 b	H 17	44,86a
H 25	5,09 b	H 80	0,070 c	Murc.	1,51 b	H 76	47,77a
H 51	5,07 b	H 60	0,068 c	H 19	1,50 b	H 44	63,06a
H 7	5,06 b	H 53	0,068 c	H 16	1,49 b	H 70	64,44a
H 5	4,98 b	H 71	0,068 c	H 54	1,48 b	H 71	67,14a
H 35	4,97 b	H 29	0,067 c	H 24	1,46 b	H 78	67,49a
H 54	4,88 b	H 31	0,067 c	H 70	1,46 b	H 43	67,89a
H19	4,85 b	H72	0,067 c	H9	1,41 c	H6	72,16a
H 39	4,83 b	H 52	0,065 c	H 53	1,39 c	H 49	84,12a
H 76	4,75 b	H 9	0,064 c	H 62	1,39 c	H 57	85,98a
H 8	4,74 b	H 39	0,064 c	H 76	1,39 c	H 69	92,86a
H 53	4,68 b	H 11	0,064 c	H 79	1,38 c	H 37	97,25a
H 41	4,64 b	H 62	0,063 c	H 11	1,37 c	H 86	100,32a
H 73	4,61 b	H 24	0,061 c	H 86	1,36 c	H 38	132,34a
H 65	4,60 b	H 86	0,060 c	H 60	1,34 c	H 83	136,64a
H 29	4,55 c	H 65	0,059 c	H 72	1,30 c	H 39	138,84a
H 80	4,45 c	H 79	0,059 c	H 39	1,29 c	H 59	140,76a
H 89	4,43 c	H 73	0,058 c	H 73	1,28 c	H 24	142,33a
H 15	4,42 c	H 70	0,058 c	H 51	1,27 c	H 15	149,57a

Híb./Par.	$A^{[1]}$	Híb./Par.	$gs^{[2]}$	Híb./Par.	$E^{[2]}$	Híb./Par.	$QXF^{[3]}$
H 49	4,39 c	H 35	0,058 c	H 4	1,26 c	H 23	152,2a
H 30	4,33 c	H 76	0,057 c	H 41	1,25 c	H 40	154,48a
H 37	4,30 c	H 41	0,057 c	H 35	1,24 c	H 22	165,65a
H 18	4,18 c	H 84	0,056 c	H 84	1,23 c	H 88	172,32a
Murc.	4,15 c	H 18	0,055 c	H 45	1,20 c	H 14	184,25a
H 60	4,14 c	H 50	0,055 c	H 14	1,15 c	H 42	210,61a
H 50	4,10 c	H 15	0,054 c	H 32	1,13 c	H 55	223,18a
H 62	4,08 c	H 51	0,054 c	H 15	1,13 c	H 26	224,2a
H 3	4,08 c	H 8	0,053 c	H 8	1,11 c	H 31	239,26b
H 32	4,02 c	H 45	0,053 c	H 50	1,11 c	H 45	251,65b
H 11	4,00 c	H 3	0,052 c	H 89	1,10 c	H 48	259,82b
H 81	3,93 c	H 14	0,052 c	H 18	1,10 c	H 61	297,6b
H 45	3,92 c	H 89	0,048 d	H 3	1,09 c	H 75	317,38b
H 69	3,91 c	H 75	0,047 d	H 63	1,06 c	H 13	324,34b
H 10	3,88 c	H 30	0,047 d	H 30	1,06 c	H 66	325,38b
H 75	3,85 c	H 88	0,045 d	H 38	1,05 c	H 68	331,49b
H 14	3,85 c	H 37	0,045 d	H 44	1,05 c	H 64	351,54b
H 46	3,82 c	H 38	0,044 d	H 88	1,04 c	H 47	387,85b
H 84	3,77 c	H 81	0,043 d	H 65	1,02 c	H 82	444,65b
H 85	3,66 c	H 63	0,043 d	H 81	1,01 c	H 54	480,06b
H 66	3,55 c	H 56	0,043 d	H 75	0,99 c	H 29	484,76b
H 77	3,52 c	H 77	0,043 d	H 37	0,99 c	H 21	513,46b
H 63	3,44 d	H 44	0,043 d	H 10	0,99 c	H 74	529,64b
H 13	3,42 d	H 66	0,043 d	H 77	0,97 c	H 67	547,69b
H 38	3,39 d	H 10	0,042 d	H 66	0,96 c	H 27	567,93b
H 55	3,28 d	H 4	0,040 d	H 55	0,96 c	H 63	582,74b
H 56	3,27 d	H 46	0,039 d	H 29	0,91 c	H 60	694,93c
Pêra	3,27 d	H 32	0,039 d	Pêra	0,90 c	H 58	697,13c
H 44	3,26 d	H 13	0,039 d	H 13	0,90 c	H 62	723,42c
H 21	3,26 d	H 55	0,039 d	H 56	0,89 c	H 4	725,05c
H 67	3,26 d	Pêra	0,037 d	H 21	0,88 c	H 46	749,36c
H 88	3,17 d	H 47	0,036 d	H 46	0,87 c	H 56	779,28c
H 57	3,05 d	H 21	0,035 d	H 47	0,87 c	H 19	799,26c
H 47	2,91 d	H 67	0,034 d	H 57	0,84 c	H 77	832,73c
H 43	2,90 d	H 57	0,034 d	H 61	0,78 c	H 65	840,76c
H 22	2,80 d	H 61	0,033 d	H 67	0,75 c	H 32	904,78c
H 64	2,76 d	H 43	0,031 d	H 43	0,71 c	H 3	909,88c
H 61	2,58 d	H 83	0,030 d	H 22	0,71 c	H 33	935,22c
H 4	2,44 d	H 22	0,030 d	H 83	0,66 c	H 5	935,41c
H 83	2,44 d	H 58	0,029 d	H 42	0,63 c	H 81	1454,68d
H 23	2,12 d	H 23	0,027 d	H 23	0,59 c	Pêra	1757,06d
H 42	2,00 d	H 42	0,026 d	H 64	0,57 c	H 9	1782,84d
H 58	1,78 d	H 64	0,023 d	H 58	0,47 c	H 11	2302,90e

Observações: ^[1] mensurada em mmol CO₂ m⁻².s⁻¹; ^[2, 3] mensurada em mmol H₂O m⁻².s⁻¹; ^[3] UFC/mg de tecido amostrado.

Tabela 6. Tabela de valores da correlação linear de Pearson entre as variáveis mensuradas em mudas de plantas da progênie segregante infectadas com a *Xylella fastidiosa* e empregadas na identificação de QRLs de citros à *X. fastidiosa*.

Variável ^[1]	<i>A</i>	<i>gs</i>	<i>E</i>	QXF
A	--	0,84 (<i>p</i> < 0,001)	0,86 (<i>p</i> < 0,001)	-0,15 (<i>p</i> = 0,17)
<i>gs</i>	--		0,42 (<i>p</i> < 0,001)	-0,10 (<i>p</i> = 33)
<i>E</i>	--	--	--	-0,12 (<i>p</i> = 0,27)
QXF	--	--	--	--

Observações: ^[1] *A* = assimilação fotossintética líquida de CO₂ (mmol CO₂ m⁻².s⁻¹); *gs* = condutância estomática (mmol H₂O m⁻².s⁻¹); *E*: transpiração (mmol H₂O m⁻².s⁻¹).

Tabela 7. Identificação de marcadores fAFLPs de segregação 1:1 ligados ao locus de resistência quantitativa de citros à *Xylella fastidiosa*, identificados por mapeamento por intervalo composto a partir do mapa genético de tangor ‘Murcott’ referentes aos 87 híbridos BC₁ resultantes do cruzamento entre tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’, descrito por Oliveira *et al.* (dados não publicados).

Variável ^[1]	Par de marcadores flaqueadores ^[2]	Grupo de ligação	Comprimento do intervalo ^[3] (cM)	Identificação do QRL	Posição absoluta do QRL ^[4]	Posição relativa do QRL ^[5]	R ² ^[6] (p)
<i>A</i>	CAG/ACC53 CAA/AGG77	V	25	<i>Xf-A1</i> (GL5)	35,8	17	13,53%
<i>QXF</i>	CTA/ACA210 CTA/AAG216	IV	10	<i>Xf-QXF</i> (GL4)	90	40	11,66%

Observações: ^[1] Variáveis *A*: assimilação fotossintética líquida de CO₂ (μmol CO₂ m⁻².s⁻¹) e *QXF*: quantidade de *Xylella fastidiosa* (UFC/mg de tecido) em folhas de mudas de plantas de híbridos artificialmente inoculados com a *X. fastidiosa*; ^[2] fAFLPs são identificados com os dois *primers* *EcoRI/MseI* usados na amplificação seletiva do DNA, seguida do tamanho molecular do *amplicon*, em pb; ^[3] comprimento em cM entre os dois marcadores moleculares flaqueadores do QRL; ^[4] posição do QTL a partir do telômero esquerdo, em cM; ^[5] posição mais provável do QRL correspondendo ao pico LOD Score, distância em cM a partir do marcador a esquerda do intervalo; ^[6] coeficiente de determinação, calculado via QTL Cartographer, que expressa a porcentagem da variação explicada pelo QRL identificado.

Tabela 8. Identificação de marcadores fAFLPs 1:1 e 3:1 ligados a locus de resistência quantitativa de citros à *Xylella fastidiosa*, identificados por análise pontual de marcadores (testes *t* bilateral e de permutação) em 87 híbridos BC₁ da população-mapa de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’.

Variável ^[1]	Marcador ^[2]	Configuração parental do locus fAFLP ^[3]	Identificação/Origem do QRL	Média e desvio-padrão da progênie sem amplicon (aa)	Média e desvio-padrão da progênie com amplicon (Aa)	Número de híbridos ^[4]	Teste F ^[5]	Teste <i>t</i> bilateral	Teste permutação ^[6]	R ² ^[7] (<i>p</i>)	Status do marcador
<i>A</i>	CAC/AAG69	Aa x Aa	Xf-A(GL3M1/3) ambos os parentais	3,80 ± 0,98	4,77 ± 1,32	76	0,18	0,006	0,009	8,34% (<i>p</i> = 0,0066)	ligado ^[8]
<i>A</i>	CAC/ACA311	Aa x Aa	Xf-A _{nl} 1 ambos os parentais	3,76 ± 1,05	4,83 ± 1,35	71	0,30	0,006	0,007	9,11% (<i>p</i> = 0,0062)	não ligado ^[9]
<i>E</i>	CAC/AGG203	Aa x Aa	Xf-E _{nl} 1 Tangor ‘Murcott’	1,58 ± 0,48	1,23 ± 0,44	76	0,53	0,002	0,003	10,56% (<i>p</i> = 0,0028)	não ligado ^[9]
<i>A</i>	CAG/ACG148	Aa x Aa	Xf-A _{nl} 2 Tangor ‘Murcott’	5,09 ± 1,55	4,28 ± 1,10	87	0,03	0,018	0,007	7,33% (<i>p</i> = 0,0065)	não ligado ^[9]
<i>QXF</i>	CTT/ACG171	Aa x Aa	Xf-QXF _{nl} 1 ambos os parentais	4482 ± 4933	1636 ± 1915	69	2,4E-7	0,038	<0,0001	8,80% (<i>p</i> = 0,0080)	não ligado ^[9]
<i>A</i>	CTA/ACA79	aa x Aa	Xf-A _{nl} 3 Tangor ‘Murcott’	4,93 ± 1,41	4,12 ± 1,17	74	0,28	0,010	0,010	7,49% (<i>p</i> = 0,0102)	não ligado ^[10]

Observações: ^[1] Variáveis *A*: assimilação fotossintética líquida de CO₂ (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹), *E*: transpiração (μmol H₂O m⁻² s⁻¹) e *QXF*: quantidade de *Xylella fastidiosa* (UFC/mg de tecido vegetal) em folhas de mudas de plantas de híbridos artificialmente inoculados com a *X. fastidiosa*; ^[2] fAFLPs são identificados com os dois primers *EcoRI/MseI* usados na amplificação seletiva do DNA, seguida do tamanho molecular do amplicon, em pb; ^[3] Aa x Aa: geração de *amplicon* de um locus fAFLP em ambos os parentais e aa x Aa: geração de *amplicon* de um locus fAFLP somente no parental masculino; ^[4] número de plantas para os quais dados genotípicos e fenotípicos foram gerados; ^[5] empregado com vistas a se testar a condição homo ou heterocedástica dos tratamentos; ^[6] referente a 5000 permutações; ^[7] coeficiente de determinação ajustado, calculado via análise de regressão linear simples; ^[8] e ^[9] marcadores localizados no grupo de ligação III e não ligados, respectivamente, ao mapa de tangor ‘Murcott’ M1/3 (Oliveira *et al.*, dados não publicados) e ^[10] marcador não ligado ao mapa de ‘Pêra’ (Oliveira *et al.*, dados não publicados).

7.9. Figuras

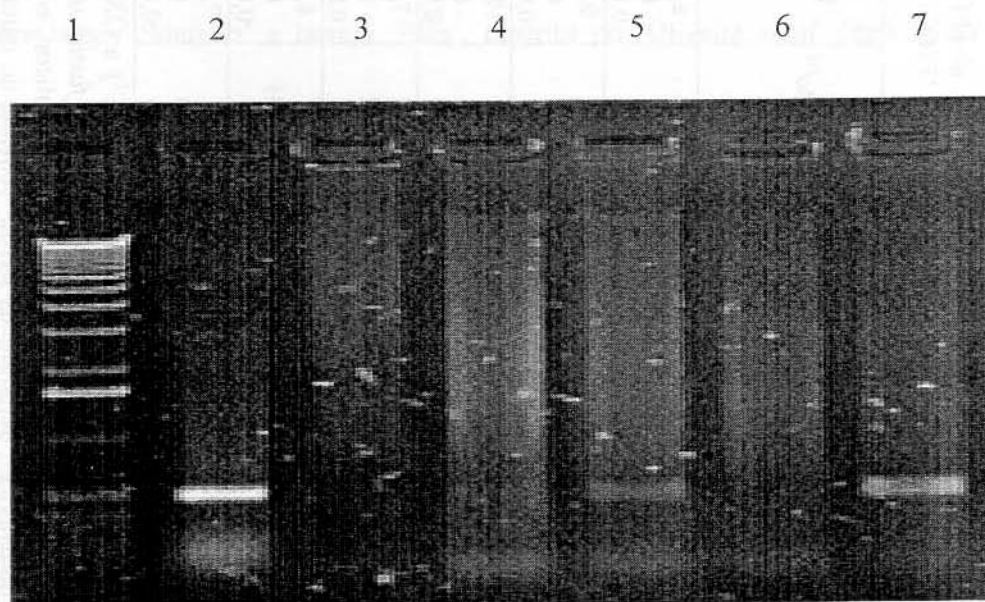


Figura 1. Detecção da multiplicação de *X. fastidiosa* nos híbridos de citros. 1 = ladder 1 kb; 2 = controle positivo; 3 = controle negativo; 4 e 6 = indivíduos com ausência de multiplicação e 5 e 7 = indivíduos com presença de multiplicação da *X. fastidiosa*.

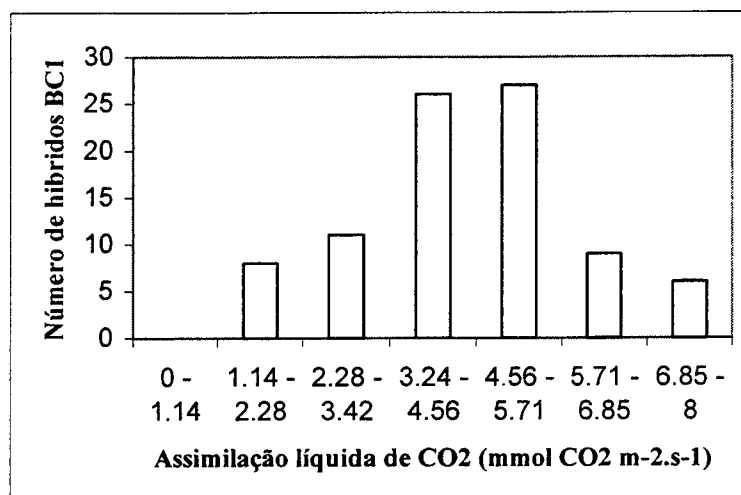


Figura 2. Histograma da distribuição de frequência da variável assimilação líquida de CO₂ (mmol CO₂ m⁻².s⁻¹). A aderência da distribuição das médias à normalidade foi constatada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($D_{\text{máx.}} = 0,0486$; valor crítico bilateral = 0,1458), a $p > 0,05$.

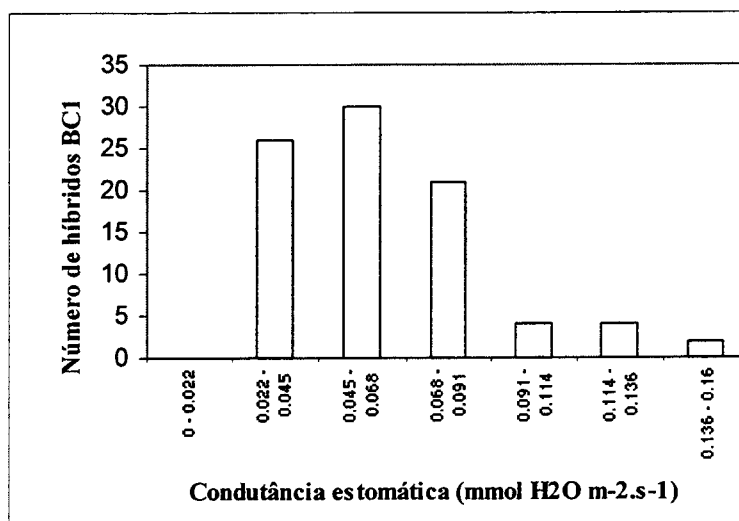


Figura 3. Histograma da distribuição de frequência da variável condutância estomática (mmol H₂O m⁻².s⁻¹). A aderência da distribuição das médias à normalidade foi constatada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($D_{\text{máx.}} = 0,1036$; valor crítico bilateral = 0,1458), a $p > 0,05$.

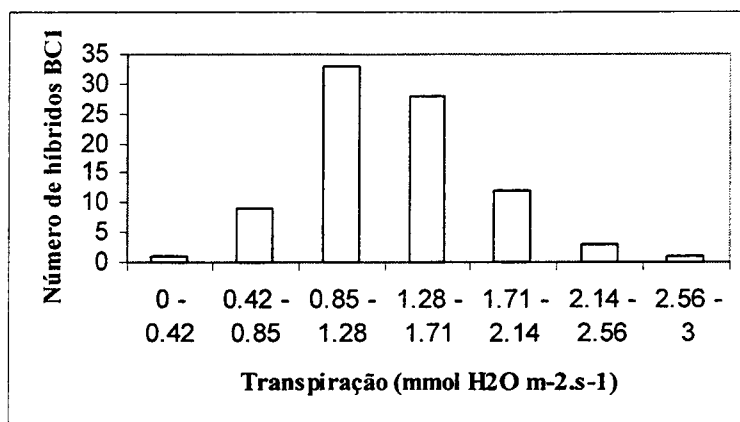


Figura 4. Histograma da distribuição de frequência da variável transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). A aderência da distribuição das médias à normalidade foi constatada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($D_{\text{máx.}} = 0,0856$; valor crítico bilateral = $0,1458$), a $p > 0,05$.

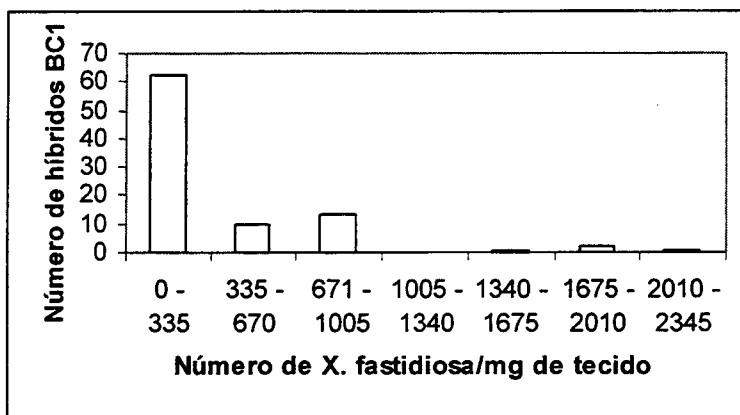


Figura 5. Histograma da distribuição de frequência da variável quantidade de *Xylella fastidiosa* (número de *X. fastidiosa* por mg de tecido). A aderência da distribuição das médias à normalidade não foi constatada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($D_{\text{máx.}} = 0,2269$; valor crítico bilateral = $0,1458$), a $p < 0,05$.

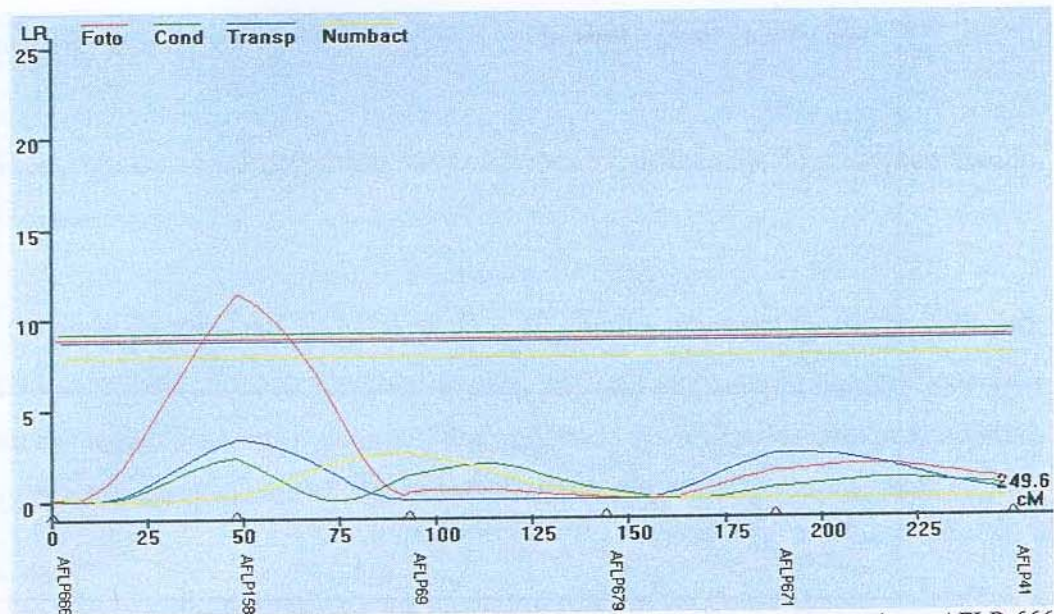


Figura 6. Identificação do QRL XFr-1 no grupo de ligação V, entre os marcadores AFLP 666 (CAG/ACC 53) e AFLP 158 (CAG/ACA 59), do mapa genético de tangor 'Murcott'. No eixo da abscissa são dispostos os marcadores fALPs e a distância em cM entre eles. No eixo da ordenada, é disposta uma escala LR. A linha ondulada indica a análise realizada, utilizando-se o mapeamento por intervalo composto. A linha horizontal indica o limite de significância para a detecção de QRLs. A região que possui a linha ondulada acima desse limite é considerada QRL. Calculado pelo QTL Cartographer.

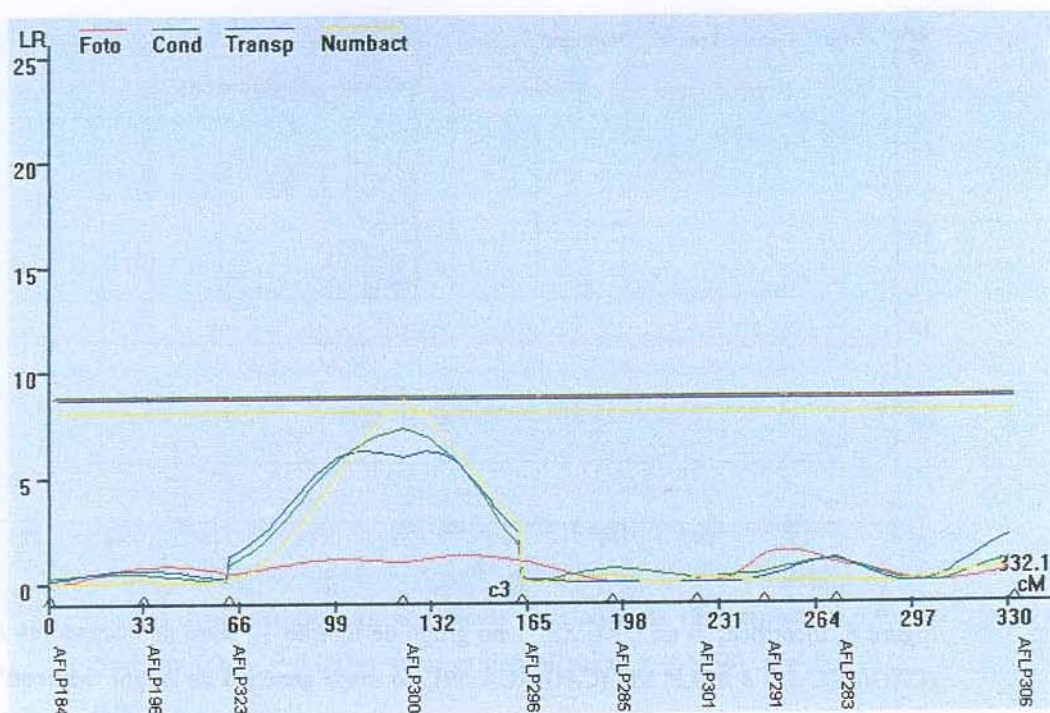


Figura 7. Identificação do QRL XFr-2 no grupo de ligação IV, entre os marcadores AFLP 323 (CTA/ACA210) e AFLP 296 (CTA/AAG189), do mapa genético de tangor ‘Murcott’. No eixo da abscissa são dispostos os marcadores fAFLPs e a distância em cM entre eles. No eixo da ordenada, é disposta uma escala LR. A linha ondulada indica a análise realizada, utilizando-se o mapeamento por intervalo composto. A linha horizontal indica o limite de significância para a detecção de QRLs. A região que possui a linha ondulada acima desse limite é considerada QRL. Calculado pelo QTL Cartographer.

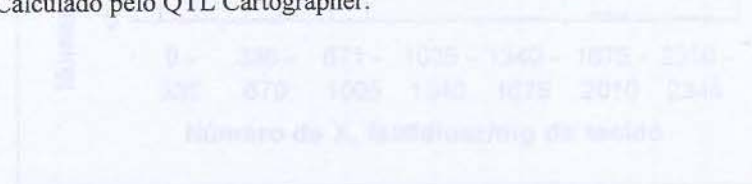


Figura 8. Histograma da distribuição da frequência de traços com QTLs significativos (número de QTLs significativos por traço). A distribuição da frequência dos traços é aproximadamente normal, conforme teste de Kolmogorov-Smirnov ($D_{max} = 0.2724$; valor crítico = 0.2421; $\alpha = 0.05$).

7. CONCLUSÕES GERAIS:

Frente aos objetivos propostos e as condições experimentais do presente trabalho, pode-se concluir que:

- Os pares de primers CCSM -4, 6, 12 e 19 amplificaram polimorfismo SSR útil, tanto em PCR monoplex quanto duplex, para a identificação dos híbridos BC₁ entre tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’, podendo ser utilizados com esse objetivo para a seleção de novos híbridos desse cruzamento;
- Foi identificado um índice morfométrico, referente a conformação morfológica da região apical das folhas de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’, que foi empregado na seleção visual de plântulas híbridas do referido cruzamento;
- Identificação de híbridos de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’ através do uso combinado de seleção visual e por meio de genotipagem molecular, baseado no índice de conformação do ápice foliar e fingerprinting SSR, respectivamente, mostrou-se mais eficiente do que qualquer uma dessas duas estratégias adotadas isoladamente;
- A adoção de resgate *in vitro* de pequenos embriões de híbridos de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’ resultou na identificação de maior quantidade de plântulas de morfologia foliar similar à tangor ‘Murcott’;
- Qualidade e quantidade de DNA extraídos a partir dos protocolos de extração ‘single step’ e ‘miniprep de DNA via SDS’, descritos nesse trabalho, permitem execução de análises de PCR; reduzindo custos e tempo dispendidos na distinção de plântulas híbridas de citros e diagnóstico da *Xylella fastidiosa*;
- O ensaio de RTQ-PCR quantificou com precisão a concentração de células de *X. fastidiosa* em plantas natural ou artificialmente inoculadas com a bactéria;

- Evidências experimentais originadas do ensaio de RTQ-PCR sugere um padrão de distribuição espacial e temporal de células de *X. fastidiosa* no interior das folhas de citros;
- Marcadores fAFLPs mostraram-se aplicáveis para a construção de mapas genéticos de citros;
- O aumento do conteúdo relativo de CpG nas extensões seletivas dos primers *EcoRI* e *MseI* reduz a quantidade de taxas multiplex (total, efetiva e mapeada) de fAFLPs em citros;
- Maior seleção gamética exercida sobre o parental masculino foi constatada, possivelmente devida a acentuada competição entre os pólems, durante a formação do tubo polínico;
- Evidências experimentais desse trabalho sugerem possível efeito de depressão de endogamia, possivelmente pós-zigótico; relacionado à mortes de alguns híbridos BC₁ obtidos do cruzamento entre tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’;
- O emprego de estratégias de mapeamento, considerando a progênie segregante entre tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’ como resultante de back-crossing e de cross pollinator, permitiu a construção de mapas de ligação para ambas as variedades cítricas;
- Os dois mapas genéticos construídos pelo Mapmaker requerem a inserção de novos marcadores moleculares para se alcançar saturação gênômica ideal para estudos de mapeamento de características quantitativas;
- Método de inoculação artificial das plantas da população-mapa mostrou-se eficiente para a geração de plantas infectadas com amplo leque de

comprometimento de atividades fotossintéticas e que apresentam diferença quanto à quantidade de carga bacteriana;

- Todas as variáveis mensuradas apresentaram-se com segregação transgressiva, inclusive com desvio de normalidade (variável QXF);
- Foram identificados altos valores significativos de correlação entre as variáveis de natureza fotossintética e baixa correlação entre as mesmas e a carga bacteriana de *X. fastidiosa*;
- Oito regiões genômicas de citros foram identificadas como QRLs/PQRLs à *Xf*, referente às variáveis taxa de fotoassimilação líquida de CO₂, transpiração e à carga bacteriana de *X. fastidiosa*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABECITRUS <http://www.abecitrus.com.br> 2003.

AGRIANUAL *Anuário estatístico da Agricultura Brasileira*. São Paulo. FNP - Consultoria e Comércio, 1999. 481p.

AJMONE MARSAN, P. *et al.* Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. *Theor Appl Genet*, v. 96, p. 219-227, 1998.

ALONSO-BLANCO, C. *et al.* Development of an AFLP based linkage map of Ler, Col and Cvi *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a Ler/Cvi recombinant inbred line population. *Plant J.*, v.14, n. 2 p. 259-71, 1998.

ALVES, E. *et al.* *Xylella fastidiosa* coloniza preferencialmente os elementos pontuados do xilema. *Fitopatol. bras*, v. 26, n. suplemento, p. 271, 2001.

AMARO, A. A. Citricultura. *Informações Econômicas*, v.29, p.65-74, 1999.

AMARO, A. A.; MAIA, M. L. & GONZALEZ, M. A. Efeitos econômicos decorrentes da clorose variegada dos citros. In: DONADIO, L. C. & MOREIRA, C. S. (eds) *Clorose Variegada dos Citros*. Bebedouro: EECB, 1997. 162 p.

AMORIM, L. *et al.* Clorose Variegada dos Citros: uma escala diagramática para avaliação da severidade da doença. *Fitopatol bras*, v. 18, p. 174-80, 1993.

ANDERSON, P. C. & FRENCH, W. J. Biophysical characteristics of peach trees infected with phony peach disease. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, v. 31, p. 25-40, 1987.

ARAÚJO W. L. *et al.* Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. *Appl Environ Microbiol*, v.68, n. 10, p.4906-4914, 2002.

- ARAÚJO, E. F. *Filogenia de citrus e gêneros afins*. Campinas, UNICAMP, 2002. 120 p. Tese (Doutorado) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- ARNOLD, C. *et al.* Predictive modelling of fluorescent AFLP: a new approach to the molecular epidemiology of *E. coli*. *Res Microbio*, v. 150, n.1, p.33-44, 1999.
- AYRES, A.J. Clorose variegada dos citros em pomares comerciais do estado de São Paulo e sul do triângulo mineiro. *Fitopatol. bras*, v.26, n. Suplem, p.247, 2001.
- _____. Intensidade da clorose variegada dos citros em pomares comerciais de laranja do Estado de São Paulo e sul do triângulo mineiro. Jaboticabal, UNESP, 2000. 59 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2000.
- BALLVORA, A. *et al.* Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene. *Grol. Mol Gen Genet*, v. 249, p. 82-90, 1995.
- BARCACCIA, G. *et al.* AFLP fingerprinting in *Medicago spp.*: Its development and application in linkage mapping. *Plant Breedin*, v. 118, p. 335-340, 1999.
- BASTEN, C.J.; WEIR, B.S. & ZENG, Z.B. *QTL Cartographer. A reference manual and tutorial for QTL mapping*. Version 1.14, Raleigh, Department of Statistics, North Caroline State University, 2000.
- BEAVIS, W.D. *et al.* Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their associations with qualitative genetic loci. *Theor Appl Genet*, v. 83, p.141-145, 1991.
- BECKER, J. *et al.* Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol Gen Genet*, v. 249, p. 65-73, 1995.
- BECKMAN, C.H. Host responses to vascular infection. *Annu. Rev. Phytopathol*, v. 2, p. 231-252, 1964.

- BERETTA, M. J. G. *et al.* A survey for strains of *Xylella fastidiosa* in citrus affected by citrus variegated chlorosis and citrus blight in Brazil. *Plant Dis.*, v. 81, p. 1196-1198, 1997.
- _____. *et al.* Constatação de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil. *Summa Phytopathologica*, v. 23, n. 1, p. 46-49, 1997.
- _____. *et al.* Tahiti lime is tolerant to citrus variegated chlorosis. *Fitopatol. brasileira*, v.18, p. 277, 1993.
- _____. *et al.* Serological comparison of citrus blight from Florida with declinio and citrus variegation chlorosis in Brazil. *Summa Phytopathologica*, v. 17, n. 1, p. 51, 1991.
- BERT, P.F. *et al.* A high-density molecular map for ryegrass (*Lolium perenne*) using AFLP markers. *Theor Appl Genet*, v. 99, p.445-452, 1999.
- BHATTACHARYYA, A. *et al.* Whole-genome comparative analysis of three phytopathogenic *Xylella fastidiosa* strains. *PNAS*, v. 99, p. 12403-12408, 2002.
- BOUKHATEM, N. *et al.* Quantitative trait loci for resistance against Wellow rust in two wheat-derived recombinant onbred line populations. *Theor Appl Genet*, v. 104, p.111-118, 2002.
- BOVÉ, J.M. & GARNIER, M. Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. *Plant Science*, v. 163, p.1083-1098, 2002.
- BOWLES, D.J. Defense-related proteins in higher plants. *Annu Rev Biochem*, v. 59, p. 873-907, 1990.
- BRIGNETI, G.; GARCIMAS, J. & BAULCOMBE, D.C. Molecular mapping of the potato virus Y resistance gene Ry (Sto) in potato. *Theor Appl Genet*, v. 94, p. 198-203, 1997.

- BRLANSKY, R. H. *et al.* Colonization of the sharpshooter vectors, *Oncometopia nigricans* and *Homalodisca coagulata*, by xylem-limited bacteria. *Phytopathology*, v. 37, p. 530-535, 1983.
- BUBECK, D. M. *et al.* Quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot in maize. *Crop Sci*, v. 33, p. 838-847, 1993.
- BUETOW, K.H. & CHAKRAVARTI, A. Multipoint gene mapping using seriation. I. General methods. *American Journal Human Genetics*, v.41, p. 180-188, 1987.
- BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.29, p. 23-39, 2002.
- CAI, Q.; GUY, C.L. & MOORE, G.A. Detection of cytosine methylation and mapping of a gene influencing cytosine methylation in the genome of Citrus. *Genome*, v. 39, n. 2, p. 235-42, 1996.
- CAI, Q.; GUY, C.L.; & MOORE, G.A. Extension of the linkage map in Citrus using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. *Theor Appl Genet* v. 89, p.606-614, 1994.
- CAMARGO, L.E.A. Interações patógeno-hospedeiro: contribuições da genômica. *Fitopatol. bras*, v. 27, n. suplemento, p. 12, 2002.
- CAMARGO, L.E.A. Mapeamento de QTL's: contribuições e perspectivas. In: PINHEIRO, J.B. & CARNEIRO, I.F. (orgs.) *Análise de QTL no melhoramento de plantas*. Goiânia: Funape, 2000. p.49-62.
- CARNEIRO, M.S. *Mapas de ligação de maracujá amarelo (Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.) baseados em marcadores RAPD*. Piracicaba, USP, 2001. 92p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade Estadual da São Paulo, 2001.

- CARVALHO, M.L.V.; ROSSETTI, V. & POMPEU Jr., J. Evolução da sintomatologia de clorose variegada dos citros em laranja doce (*Citrus sinensis*). *Fitopatologia bras*, v.20, p. 351, 1995.
- CASTIGLIONI, P. *et al.* AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution. *Theor Appl Genet*, v. 99, p.425-431, 1999.
- CASTRO, C. Aspectos moleculares e bioquímicos de interações planta-patógeno. *Rev. Anual de Patologia de Plantas*, v. 7, p. 299-368, 1995.
- CERVERA, M.T. *et al.* Application of AFLPTM-based molecular markers to breeding of *Populus spp.* *Plant Growth Regulation*, v. 20, p. 47-52, 1996.
- CHAGAS, C.M.; ROSSETI, V. & BERETTA, M.J.G. Electron microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. *J. Phytopathol*, v. 134, p. 306-312, 1992.
- CHALHOUB, B.A. Silver staining and recovery of AFLP amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. *Biotechniques*, v. 22, n. 2, p. 216-8, 220, 1997.
- CHANG C.J. *et al.* Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Curr Microbiol*, v. 27, p. 137-142, 1993.
- _____. & DONALDSON, R.C. *Xylella fastidiosa*: cultivation in chemically defined medium. *Phytopathology*, v. 83, n. 2, p. 192-194, 1993.
- CHEN, J. *et al.* 16S rDNA sequence analysis of *Xylella fastidiosa* strains. *Syst Appl Microbiol*, v. 23, n. 3 p. 349-354, 2000.
- _____. *et al.* An Evolutionary Perspective of Pierce's Disease of Grapevine, Citrus Variegated Chlorosis, and Mulberry Leaf Scorch Diseases. v. 45, n. 6, p. 423-8, 2002.

- CHENG, F.S. & ROOSE, M.L. Origin and inheritance of dwarfing by the citrus rootstock *Poncirus trifoliata* 'Flying Dragon'. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, v. 120, n. 2, p. 286-291, 1995.
- CHO, Y.G. *et al.* Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels. *Genome*, v. 39, p. 373-378, 1996.
- CHURCHILL, G. A., & DOERGE, R. W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, v. 138, p. 963-971, 1994.
- COELHO, A.S.G. *Construção de mapas genéticos & Mapeamento de QTL's*. Piracicaba, USP, 2002. p.66. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade Estadual de São Paulo, 2002.
- CAMARGO, L.E.A. Mapeamento de QTL's: contribuições e perspectivas. In: PINHEIRO, J.B. & CARNEIRO, I.F. (orgs) *Análise de QTL no melhoramento de plantas*. Goiânia: Funape, 2000. p.1-20.
- COLETTA-FILHO, H.D. & MACHADO, M.A. Evaluation of the Genetic Structure of *Xylella fastidiosa* Populations from Different *Citrus sinensis* Varieties. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 8, p. 3731-3736, 2002.
- _____.; BORGES, K. M. & MACHADO, M. A. Ocorrência de *Xylella fastidiosa* em plantas candidatas a matrizes de laranja-doce, e transmissão por borbulhas contaminadas. *Laranja*, v.21, n.2, p. 327- 334, 2000.
- _____. *et al.* Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis. *Appl Environ Microbiol*, v. 67, p. 4091-4095, 2001.
- CONTRERAS, J. Pecosita ou 'Falsa mancha grascienta' na Argentina. *Laranja & Cia*, v. 31, n. 6, p.10, 1992.

- COSTA, A.S. *et al.* Sintomas da deficiência de molibdênio podem ser parte da resposta da planta infestada à clorose variegada dos citros. *Fitopatol bras*, v. 17, n. 2, p. 10, 1992.
- COSTA, P.I. *et al.* Strains of *Xylella fastidiosa* rapidly distinguished by arbitrarily primed-PCR. *Current Microbiology*, v.40, n. 4 p. 279-282, 2000.
- COSTERTON, J. W. & IRWIN, R. T. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol*, v. 35, p. 299-324, 1981.
- CREELAN, J.L. & MCCULLOUGH, S.J. Evaluation of strain-specific primer sequences from an abortifacient strain of ovine *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci*) for the detection of EAE by PCR. *FEMS Microbiology Letters*, v. 190, p. 103-108, 2000.
- CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. *Euphytica*, v. 109, p. 25-32, 1999.
- CUBERO, J.; GRAHAM, J. H. & GOTTWALD, T. R. Quantitative PCR Method for Diagnosis of Citrus Bacterial Canker. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 6, p. 2849–2852, 2001.
- DAL BOSCO, A. *Fluxo de seiva em laranjeira (Citrus sinensis L. Osb.) infectada com Xylella fastidiosa Wells*. Piracicaba, USP, 2001. 53p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade Estadual de São Paulo, 2001.
- DAVIES, F., ALBRIGO, L.G. *Citrus*. Walingford: CAB International, 1994, 245p.
- _____.; PURCELL, A.H. & THOMSON, S.V. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. *Science*, v. 199, p. 75-77, 1978.
- DE NEGRI J.D. & GARCIA JÚNIOR, A. Sugestões para o manejo de pomares com clorose variegada de citros. *Laranja*, v. 14, n. 1, p. 255-67, 1993.

- _____. *Clorose variegada dos citros: nova anomalia afetando pomares em São Paulo e Minas Gerais*. Campinas: CATI, v. 82, p. 6, 1990. (Comunicado Técnico).
- DE SIMONE, M.D. *et al.* Construction of genetic maps for *Citrus aurantium* and *C. latipes* based on AFLP, RAPD and RFLP markers. *Fruits*, v.53, p.383-390, 1998.
- DENG, Z. *et al.* Development and characterization of SCAR markers linked to the citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata*. *Genome*, v. 40, p. 697-704, 1997.
- DENNY, T.P. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol*, v. 33, p. 173-197, 1995.
- DEVEY, M.E. *et al.* A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers. *Theor Appl Genet*, v. 92, p. 673-679, 1996.
- DIDENKO, V.D. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *BioTechniques*, v. 31, p. 1106-1120, 2001.
- DOERGE, R. W. Constructing genetic maps by rapid chain delineation. *Journal of Quantitative Trait Loci*, v. 2, p. 121-132, 1996.
- _____. & REBAÏ, A. Significance thresholds for QTL interval mapping tests. *Heredity*, v. 76, p. 459-464, 1996.
- DONADIO, L. C.; MOREIRA C.S. *Clorose Variegada dos Citros*. Bebedouro: EECB, 1997, 162p.
- DOOLITTLE, R.F. Microbial genomes multiply. *Nature*, v. 416, p. 697-700, 2002.
- DOW, J.M. & DANIELS, M.J. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yeast*, v. 17, n. 4, p. 263-271, 2000.
- DURHAM, R. E. *et al.* Linkage of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in *Citrus*. *Theor Appl Genet*, v. 84, p. 39-48, 1992.

- DURHAM, R. E. *Mapping genes involved in freezing tolerance in a backcross of Citrus and Poncirus using a linkage map of isozymes and restriction fragment length polymorphisms*. Florida, University of Florida, 1990. 114 p. Dissertation - University of Florida, 1990.
- EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W. & WENDEL, J.F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. 1. Numbers, genomic distribution and types of gene action. *Genetics*, v. 116, p. 113-125, 1987.
- EI TASSA, S.O.M.; TAUNOUS, I.D. & DUARTE, V. Clorose variegada dos citros no RS e método alternativo para diagnose. *Fitopatol bras.*, v. 22, n. Suplem. p. 238, 1997.
- ELGERSMA, D.M. Tylose formation in elms after inoculation with *Ceratocystis ulmi*, a possible resistance mechanism. *Neth J. Plant Pathol*, v. 79, p. 218-220, 1973.
- ELLIS, R. *et al.* Mapping physiological traits in barley. *New Phytol*, v. 137, p. 149-157, 1997a.
- ELLIS, R.P. *et al.* The use of AFLPs to examine genetic relatedness in barley. *Mol Breed*, v. 3, p. 359-369, 1997b.
- EMEBIRI, L.C. *et al.* Linkage of RAPD markers to nestur, a stem growth index in radiata pine seedlings. *Theor Appl Genet*, v. 95, p. 119-124, 1997.
- EREZ, A. Dwarfing peaches by pruning and by paclobutrazol. *Acta Horti*, v. 146, p. 235-241, 1984.
- ESAU, K. Anatomic effects of the viruses of Pierce's disease and phony peach. *Hilgardia*, v. 18, p. 423-482, 1948.
- EVERSON, E.H. & SCHALLER, C.W. The genetics of yield differences associated with awn barbing in the barley hybrid (Lion x Atlas¹⁰). *Atlas Agron J*, v. 47, p. 276-280, 1955.

- EVERT, D.R. Influence of phony disease of peach on stem hydraulic conductivity and leaf xylem pressure potential. *J Am Soc Hort Sci*, v. 112, p. 1032-1036, 1987.
- FALCONER, D.D. & MACKAY, T.F.C. *Introduction to quantitative genetics*. London: Longman, 1996. 464 p.
- FANG, D.Q. & ROOSE, M.L. Inheritance of intersimple sequence repeat markers in Citrus. *J Hered*, v. 90, p. 247-249, 1999.
- _____.; FEDERICI, C.T. & ROOSE, M.L. A high-resolution linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genetics*, v. 150, n. 2, p. 883-90, 1998.
- _____. Development of molecular markers linked to a gene controlling fruit acidity in citrus. *Genome*, v. 40, p. 841-849, 1997.
- FAO QUARTERLY BULLETIM OF STATISTICS. Rome, v.12, n.3/4, p. 152, 1999.
- FARAH, S.B. *DNA: Segredos e Mistérios*. São Paulo: Editora Sarvier, 1997. 276p.
- FARIS, J.D. *et al.* Candidate gene analysis of quantitative disease resistance in wheat. *Theor Appl Genet*, v. 98, p. 219-225, 1999.
- FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G.W. & GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H. *et al.* (eds) *Manual de Fitopatologia*. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v. 2, 1997, 919.
- FERREIRA, H. *et al.* A simplified subtractive hybridization protocol used to isolate DNA sequence specific to *Xylella fastidiosa*. *Microbiol. Reading*, v. 145 n. 8, p. 1967-1975, 1999.
- FERREIRA, H. *et al.* Primers specific for *Xylella fastidiosa* based on RAPD differential fragments. *Summa Phytopathol*, v. 26, p. 15-21, 2000.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: Luma, 1996, p. 220.

- FERREIRA, M.E. *et al.* Mapping loci controlling *Brassica napus* resistance to *Leptosphaeria maculans* under different screening conditions. *Phytopathology*, v. 85, p. 213-217, 1995.
- FIGUEIRA, A. Progresso na caracterização molecular de plantas resistentes: genes e marcadores. *Fitopatol bras*, v. 25, n. Suplem, p. 254, 2000.
- FIGUEIREDO, J.O. *et al.* Produção inicial do tangor 'Murcote' sobre dezesseis porta-enxertos em São Paulo. *Laranja*, v. 18, p. 165-173, 1997.
- FISHER, R.A. The correlations between relatives on the supposition of mendelian inheritance. *Trans. R. Soc. Edinb.* v.52, p.399-433, 1918.
- FLAMENT, M.H. *et al.* Genetic mapping of resistance factors to *Phytophthora palmivora* in cocoa. *Genome*, v. 44, p. 79-85, 2001.
- FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev. Phytopathol*, v. 9, p. 275-296, 1971.
- _____. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv Genet*, v. 8, p. 29-54, 1956.
- FONSECA, H.S. *et al.* Seringueira, um novo hospedeiro de *Xylella fastidiosa* no Brasil. *Fitopatol bras*, v. 26, n. Suplem, p. 275, 2001.
- FREITAG, J.H. Host range of Pierce's disease virus of grape as determined by insects transmission. *Phytopathology*, v. 41, p. 920-934, 1951.
- FRENCH, W. J. & KITAJIMA, E. W. Occurrence of plum leaf scald in Brazil and Paraguay. *Plant Dis Repr*, v. 62, p. 1035-1038, 1978.
- _____. & STASSI, D.L. Response of phony-infected peach trees to gibberellic acid. *HortScience*, v. 13, p. 158-159, 1978.
- FRY, S.M.; HUANG, J.S. & MILHOLLAND, RD: Isolation and preliminary characterization of extracellular proteases produced by strains of *Xylella fastidiosa* from grapevines. *Phytopathology*, v. 84, p. 357-363, 1994.

- _____. & MILHOLLAND, R.D. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevines resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. *Phytopathology*, v.80, p.61-65, 1990a.
- _____. Response of resistant, tolerant, and susceptible grapevine tissues to invasion by the Pierce's disease bacterium, *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology*, v. 80, n. 1, p. 66-69, 1990b.
- FUNDECITRUS. *Clorose variegada dos citros (CVC)*. <http://www.fundecitrus.com.br> (03/08/2001)
- FUQUA, C.; WINANS, S.C. & GREENBERG, E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR/LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, v.176, n.2, p.269-275, 1994.
- GABRIEL, D.W. & ROLFE, B.G. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Ann. Rev. Phytopathol*, v. 28, p. 365-391, 1990.
- GALAN J.E. & COLLMER, A. *Type III secretion machines*: Bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, v. 284, p 1322-1328, 1999.
- GARCIA JÚNIOR, A. *et al.* Como conviver com a CVC em São Paulo. *Laranja*, v.16, p.145-54, 1995.
- GARCÍA, M.R.; ASÍNS, M.J. & CARBONELL. QTL analysis of yield and seed number in Citrus. *Theor Appl Genet*. v. 101, p. 487-493, 2000.
- _____. *et al.* Genetic análisis of apomixis in Citrus and Poncirus by molecular markers. *Theor Appl Genet*, v. 99, p. 511-518, 1999.
- GARNIER, M. *et al.* Citrus variegated chlorosis: serological detection of *Xylella fastidiosa*, the bacterium associated with the disease. *Proceeding 12th Conference IOCV*. IOCV, Riverside, 1993, p. 301-305.

- GAZZOLA, R. *et al.* Correlação entre características químicas e físicas nos frutos de laranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbesck cv. Natal). *Ciência e Prática*, v. 15, p. 154-158, 1991.
- GEES, R. & HOHL, H.R. Cytological comparison of specific (*R3*) and general resistance to late blight in potato leaf tissue. *Phytopathology*, v. 78, p. :350-357, 1988.
- GEFFROY, V. *et al.* Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-localization of quantitative trait loci with genes involved in specific resistance. *Molecular Plant-Microbe interactions* v. 13, n. 3, p 287-296, 2000.
- GEIGER, H.H. & HEUN, M. Genetics of quantitative resistance genes. *Annu Rev Plant Pathol*, v. 27, p. 317-341, 1989.
- GIESE, H. *et al.* Localization of the Laevigatum powdery mildew resistance gene to barley chromosome 2 by the use of RFLP markers. *Theor Appl Genet*, v. 85, p. 897-900, 1993.
- GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, v. 30, p. 503-512, 2002.
- GMITTER J.R. *et al.* A localized linkage map of the citrus virus resistance gene region. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 92, p. 688-695, 1996.
- GOES, A. *et al.* Ocorrência de CVC (clorose variegada dos citros) em pomares citrícolas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Fitopatol bras*, v. 18, n. supl., p.:312, 1993.
- GOHEEN, A.C.; NYLAND, G. & LOWE, S.K. Association of a rickettsia-like organism with Pierce's disease for grapevine and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. *Phytopathology*, v. 63, p. 341-345, 1973.
- GOMES, M.M.A. *Relações hídricas, trocas gasosas e conteúdo de ácido abscísico e ácido 3-indol acético em laranjeiras 'Pêra' com clorose variegada dos citros.*

Campinas, UNICAMP, 2001. 133p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

GOODMAN, R.N.; KIRÁLY, A. & WOOD, K.R. *The biochemistry and physiology of plant disease*. Columbia: University of Missouri press, 1986, 433 p.

GOODWIN P.H.; DEVAY, J.E. & MEREDITH, C.P. Physiological responses of *Vitis vinifera* cv. “Chardonnay” to infection by the Pierce’s disease bacterium. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 32, p. 17-32, 1988.

_____. & LOWE, S.K. Roles of water stress and phytotoxins in the development of Pierce’s disease of the grapevine. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 32, p. 1-15, 1973.

GOTTWALD, T.R. *et al.* Preliminary spatial and temporal analysis of citrus variegated chlorosis in Brazil. In: *Proceeding. 12th Conference International Organization Citrus Virology* MORENO, P., Da Graça, J.V. and Timmer, L.W., eds. IOCV, Riverside, CA, 1993.

GOULD, A.B. *et al.* Rootstock influence on occurrence of *Homalodisca coagulata*, peach xylem fluid amino acids, and concentration of *Xylella fastidiosa*. *Plant Disease*, v. 75, p 767-770, 1991.

GRATTAPAGLIA, D. *et al.* Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using a maternal half-sib family and RAPD markers. *Genetics*, v. 144, p. 1205-1214, 1996.

_____. & SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalipytus grandis* and *eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*, v. 137, p. 170-177, 1994.

GRAVENA, S. *et al.* The *Xylella fastidiosa* vectors. Citrus Variegated Chlorosis. Bebedouro: EECB. p.36-53, 1998.

- _____. Manejo de cigarrinhas e CVC no pomar. In: DONADIO, L.C. & MOREIRA, C.S. (eds) *Clorose Variegada dos Citros*. Bebedouro: EECB, 1997, p. 162.
- GROSSER, J. W. & GMITTER JR., F. G. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives form germoplasm enhancement and cultivar developments. *HortScience*, v. 25, p. 147-51, 1990.
- GRÜNTZIG, V. *et al.* *Pseudomonas stutzeri* Nitrite Reductase Gene Abundance in Environmental Samples Measured by Real-Time PCR. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 67, n. 2, p. 760-768, 2001.
- GUERRA, M. *Cytogenetics of rutaceae II*. Nuclear DNA content. *Caryologia*, v. 37, p. 219-226, 1984.
- HABERMANN, G. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras-doce (*Citrus sinensis* L. Osb. cv Pêra) com clorose variegada dos citrtos (CVC). Botucatu, UNESP, 79p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, 1999.
- HALDANE, J. B. S. The combination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linked factors. *Journal of Genetics*, v. 8, p. 299-309, 1919.
- HALEY C. S, KNOTT A. S. A simple regression method for mapping quantitative trait loci by using molecular markers. *Heredity*, v. 69, p. 315-324, 1992.
- HALLDÉN, C. *et al.* Competition as a source of errors in RAPD analysis. *Theor Appl Genet*, v. 93, p. 1185-1192, 1996.
- HAMMOND-KOSACK, K. E. & JONES, J. D. G. Plant disease resistance genes. *Ann Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol*, v. 48, p. 575-607, 1997.
- HANSEN M. *et al.* Evaluation of AFLP in *Beta*. *Theor Appl Genet*, v. 98, p. 845-852, 1999.
- HARAKAWA, R. *et al.* Detection of *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus variegated chlorosis, by western-blotting. *Summa Phytopathologica*, v. 20, p. 591-597, 1994.

- HARAKAWA, R.; BERETTA, M. J. G. Obtenção de anticorpos para *Xylella fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros, a partir de ovos postos por galinhas poedeiras imunizadas. *Laranja*, v. 15, p.87-95, 1994.
- HARTL, L. & SEEFELDER, S. Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. *Theoretical and applied genetics*, v. 96, n. 1, p. 112-116, 1998.
- HARTMAN, J. R. & JARLFORS, U.E. First report of bacterial leaf scorch caused by *Xylella fastidiosa* on sugar maple and sweetgum. *Plant Disease*, v, 80, n. 11, p. 1302, 1996.
- HARTUNG, J. S.; *et al.* Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology*, v. 84, p. 591-597, 1994.
- HAYWARD, A. C. & MARIANO, R. L. R. Mecanismos de virulência e patogenicidade de procariotos em plantas. *RAPP*, v.5, p. 199-233, 1997.
- HE, C. X. *et al.* ERIC-PCR for early detection of bacterium (*Xylella fastidiosa*) of citrus variegated chlorosis. In: *Annual Meeting Int. Soc. for Tropical Hort*, v. 42, p. 20-25, 1996.
- HE, C. X. *et al.* Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural root grafts. *Plant Disease*, v. 84, n. 6, p. 622-626, 2000.
- HEARN, C. J.; HUTCHISON, D. J. & BARRETT, H.C. Breeding citrus rootstocks. *HortScience*, v. 9, n.4, p.357-358, 1974.
- HEARON, S. S.; SHERALD, J. L. & KOSTKA, S. J. Association of xylem-limited bacteria with elm, sycamore, and oak leaf scorch. *Canadian Journal of Botany*, v. 58, p. 1986-1993, 1980.
- HEID C. A. *et al.* Real time quantitative PCR. *Genome Res*, v. 6, p. 986-994, 1996.

- HEIN, I. *et al.* Comparison of Different Approaches to Quantify *Staphylococcus aureus* Cells by Real-Time Quantitative PCR and Application of This Technique for Examination of Cheese. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 67, n. 7, p. 3122–3126, 2001.
- HENSON, J. M. & FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol*, v.31, p 81–109, 1993.
- HERBERGS J. *et al.* Multicolour fluorescent detection and mapping of AFLP markers in chicken (*Gallus domesticus*). *Anim Genet*, v. 30, n. 4, p. 274-285, 1999.
- HIGUCHI R. *et al.* Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, v. 11, p. 1026-1030, 1993.
- HIGUCHI R. *et al.* Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, v. 10, p. 413-417, 1992.
- HILL, B. L. & PURCELL, A. H. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. *Phytopathology*, v. 85, p. 1368-1372, 1995.
- HODGSON, R. W. Horticultural varieties of *Citrus*. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J. & BATCHELOR, L. B. (eds) *The Citrus Industry*. v. 1, Berkeley: University of California, 1969, p. 431-591.
- HOPKINS, D. L. *Xylella fastidiosa*. In: SINGH, U. S.; SINGH, K. P. & KOHMOTO, K. (ed.) *Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases*. v. 1. Prokaryotes. Oxford: Elsevier Science, p. 185–197, 1995.
- _____. *Xylella fastidiosa*: a xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Ann. Rev. Phytopathol*, v. 27, p. 271-290, 1989.
- _____. & ADLERZ, W. C. Natural hosts of *Xylella fastidiosa* in Florida. *Plant Disease*, v. 72, p. 429-431. 1988.

- _____. Water stress in grapevines with Pierce's disease. *Phytopathology*, v. p. 75:500, 1985a.
- _____. Effects of plant growth regulators on development of Pierce's disease symptoms in grapevine. *Phytopathology*, v. 69, p. 944-946, 1985b.
- _____. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. *Phytopathology*, v. 75, p. 713-717, 1985c.
- _____. & THOMPSON, C. M. Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in 'Carlo' and 'Welder' muscadine grapes compared with 'Schuyler' bunch grape. *HortScience*, v. 19, p. 419-420, 1984.
- _____. Multiplication of virulent and avirulent Pierce's disease bacterial isolates in grapevine tissue. In: *Proc. Int. Conf. Plant Pathol. Bacteriol*, 5th. Cali, 1981, p. 225-234.
- HUANG, J. & SUN, M. A modified AFLP with fluorescence-labelled primers and automated DNA sequencer detection for efficient fingerprinting analysis in plants. *Biotechnology Techniques*, v. 13, p. 277-278, 1999.
- HUTCHESON, S. W. The molecular biology of hypersensitivity to plant pathogenic bacteria. *Journal of Plant Pathology*, v. 83, n. 3, p. 151-172, 2001.
- HYMAN, L. J. *et al.* A competitive PCR-based method for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Lett. Appl. Microbiol*, v. 30, p. 330-335, 2000.
- JACOMINO, A. P. *et al.* Transmissão controlada da clorose variegada dos citros (CVC). *Fitopatologia bras*, v.18, n, suplemento, p. 265, 1993.
- JANSEN, R. C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics*, v. 135, p. 205-211, 1993.

- JANSEN, R. C. & STAM, P. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics*, v. 136, p. 1447-1455, 1994.
- JARRELL, D. C. *et al.* A genetic maps of *Citrus* based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross. *Theor. Appl. Genet*, v. 84, p. 49-56, 1992.
- JIANG, C. & ZENG, Z.B. Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. *Genetics*, v. 140, p. 1111-1127, 1995.
- JONES, C. J. *et al.* Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol Breed*, v. 3, p. 381-390, 1997.
- JULIAN, M.C. *et al.* Mating type-correlated molecular markers and demonstration of heterokaryosis in the phytopathogenic fungus *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) AG 1-IC by AFLP DNA fingerprinting analysis. *J Biotechnol*, v. 67, n. 1, p. 49-56, 1999.
- KALOSHIAN, I. *et al.* Genetic and physical localization of the root-knot nematode resistance locus *mi* in tomato. *Mol Gen Genet*, v. 257, n. 3, p. 376-85, 1998.
- KAO, C. H.; ZENG, Z. B. & TEASDALE, R. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics*, v. 152, p. 1203-1216, 1999.
- KARDOLUS, J. P.; VAN ECK, H. J. & VAN DEN BERG, R. G. The potential of AFLPs in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy. *Plant Syst Evol*, v. 210, p. 87-103, 1998.
- KEARSEY, M. J. & FARQUHAR, G. L. QTL analysis in plants; where are we now? *Heredity*, v. 80, p. 137-142, 1998.
- KEEN, N. T. *et al.* From rags to riches: insights from the first genomic sequence of a plant pathogenic bacterium. *Genome Biology*, v. 1, n.3, p; 1019.1-1019.4, 2000.
- KIJAS, J. M. H. *et al.* Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of *Citrus*. *Theoretical Applied Genetics*, v. 94, p. 701-706, 1997.

- KIRKPATRICK, S.; GELATT, C. D. & VECCHI, M. P. Optimization by simulated annealing. *Science*, v. 220, p. 671-680, 1983.
- KITAJIMA, E. W.; BAKARCIC, M. & FERNANDEZ-VALIELA, M. V. Association of rickettsia-like bacteria with plum leaf scald disease. *Phytopathology*, v. 65, p. 476-479, 1975.
- KITAJIMA, E. W. *et al.* Escaldadura das folhas em *Hibiscus schizopetalus* associada à infecção por *Xylella fastidiosa* em Brasília, DF. *Fitopatol. bras.*, v. 25, n. Suplemento, p. 323, 2000.
- KNORR, C.; CHENG, H. H. & DODGSON, J. B. Application of AFLP markers to genome mapping in poultry. *Anim Genet*, 1999, v. 30, n. 1, p. 28-35.
- KOMBRINK, E. & SOMSSICH, I. E. "Defense responses of plants to pathogens" in *Advanced in Botanical Research*. v. 21, Academic Press, p.2-34, 1995.
- KONG DM, GU L, SHEN HX, MI HF. A modified molecular beacon combining the properties of TaqMan probe. *Chem Commun (Camb)* 2002 Apr 21;(8):854-5.
- KOOMAN-GERSMANN, M. *et al.* Correlation between binding affinity and necrosis-inducing activity of mutant AVR9 peptide elicitors. In: KOOMAN-GERSMANN, M. (ed) *The AVR9 elicitor peptide of the tomato pathogen Cladosporium fulvum: molecular aspects os recognition*. The Netherlands: Thesis Agricultural University Wageningen, 1998, pp. 53-72.
- KOSAMBI, D. D. *The estimation of map distance from recombination values*. v. 12. *Ann. Eugen*, 1944, p. 172-175.
- KOSTKA, S. J. *et al.* Mulberry leaf scorch, new disease caused by a fastidious, xylem-inhabiting bacterium. *Plant Disease*, v. 70, p. 690-693, 1986.
- KRÜGNER, R. *et al.* Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* to citrus by sharpshooters and identification of two new vector species. *Fourteenth IOCV Conference*, 2000, p. 423.

- LACAVA P. T. *et al.* RAPD profile and antibiotic susceptibility of *Xylella fastidiosa*. Causal agent of citrus variegated chlorosis. *Lett Appl Microbiol*, v. 33, n. 4, p. 302-306, 2001.
- LAMBAIS, M. R. *et al.* A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. *Current Opinion in Microbiology*, v. 3, n. 5, p. 459-462, 2000.
- LANDER, E. S & BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, v. 121, p. 185-199, 1989.
- _____. & KRUGLYAK, L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genetics*, v. 11, p. 241-247, 1995.
- LARANJEIRA, F.F. Controle de doenças causadas por *Xylella fastidiosa*. *Fitopatol bras*, v. 22, p. 224, 1997a.
- _____. Dez anos de clorose variegada dos citros: o que sabemos? *Laranja*, v. 18, p. 123-141, 1997b.
- _____. Dinâmica espacial e temporal da clorose variegada dos citros. Piracicaba, 1997. 144p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1997c.
- _____.; AMORIM, L. & BERGAMIN FILHO, A. Epidemiologia da clorose variegada dos citros. *Anais do 3º Encontro de Fitopatologia*. Viçosa, 1999, p. 19-24.
- _____. *et al.* Porta-enxertos não influenciam na expressão da clorose variegada dos citros (CVC) em laranjas-doces. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v. 23, n. 1, p. 212-214, 2001.
- _____. Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo. *Fitopatologia bras*, v. 23, n. 2, p.147-154, 1998a.
- _____. Epidemiologia da CVC. *Laranja*, n. 14 , p. 79-83, 1998b.

- _____. Constatação da clorose variegada dos citros (CVC) no Estado do Sergipe. *Fitopatol bras*, v.21, n. suplemento, p. 521, 1996.
- _____. & PALAZZO, D.A. Danos qualitativos à produção de laranja 'Natal' causados pela clorose variegada dos citros. *Laranja*, v. 20, p. 77-91, 1999.
- _____. Determinação preliminar dos efeitos da clorose variegada dos citros em características físico-químicas de frutos de laranja Natal. *Fitopatol bras*, p. 309, 1994.
- _____. & POMPEU JR., J. Modeling of yield damage of 15 sweet orange varieties, caused by citrus variegated chlorosis. In: Programme & Abstracts of the Conference of IOCV, 14. Campinas: 1998, p.86.
- _____. & HARAKAVA, R. Seleção de variedades de citros tolerantes e/ou resistentes à clorose variegada dos citros. *Fitopatol bras*, v. 20, n. Suplemento, p. 304, 1995.
- LEE, R. F.; BERETTA, M. J. G. & DERRICK, K. S. Development of a dot immunobinding assay for citrus variegated chlorosis disease in Brazil. *Fitopatologia* v. 26, p. 46-47, 1991.
- _____. *et al.* Development of a serological assay for citrus variegated chlorosis: a new disease of citrus in Brazil. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, v. 105, p. 32-35, 1992.
- _____. Citrus Variegated Chlorosis confirmation of a *Xylella fastidiosa* as the causal agent. *Summa Phytopathologica*, v. 19, p. 123-125, 1993.
- _____. Citrus variegated chlorosis: a new destructive disease of citrus in Brazil. *Citrus Industry*, v. 72, p. 10-13, 1991.
- LEIGH, J. A. & COPLIN, D. L. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 46, p. 307-46, 1992.

- LEITE, B. *et al.* Genomics and X-ray microanalysis indicate that Ca^{2+} and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. *Braz J Med Biol Res*, v. 35, n. 6, p. 645-50, 2002.
- _____. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. *RAPP*, v. 9, p. 119-157, 2001.
- LEITE JR, R. P. *et al.* Genetic diversity of Brazilian strains of *Xylella fastidiosa* associated with citrus and coffee. XIV Conference of IOCV p. 156, Campinas: 1998.
- _____.; HUANG, G. F. & UENO, B. Ocorrência da clorose variegada dos citros no estado de Santa Catarina. *Fitopatol bras*, v. 22, n. 2, p. 214, 1997.
- _____.; & LEITE, R. M. V. B. Associação de *Xylella fastidiosa* com clorose variegada dos citros. *Summa Phytopathol.* v. 17, p. 7, 1991.
- _____. & CERESINI, P. C. Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* entre plantas invasoras de pomares de ameixeira com escaldadura da folha. *Fitopatol bras*, v. 22, n. 1, p. 54-57, 1997.
- _____.; & JACOMINO, A. P. Ocorrência de clorose variegada dos citros no estado do Paraná. *Summa Phytopathologica*, v. 19, p. 35, 1993.
- LEONARDS-SCHIPPERS, C. *et al.* Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case of study for QTL mapping in an allogamous plant species. *Genetics*, v. 137, p. 67-77, 1994.
- LERCETEAU, E. & SZMIDT, A. E. Properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity studies of *pinus sylvestris* L. *Heredity*, v. 82, n. 3, p. 252-60, 1999.
- LESPINASSE, D. *et al.* A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea spp.*) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. *Theor Appl Genet*, v. 100, p. 127-138, 2000.

- LEU, L. S. Isolation, cultivation, and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. *Plant Disease*, v. 77, n. 6, p. 642-646, 1993.
- LI, W. B. *Avaliação do comportamento de variedades de copas e porta-enxertos à Clorose variegada dos Citros*. Jaboticabal, UNESP, 1997, 103p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de São Paulo, 1997.
- _____.; DONADIO, L. C.; HE, C. & SEMPIONATO, O. Métodos de avaliação de resistência à clorose variegada dos citros. *Laranja*, v. 17, p. 55-56, 1996.
- _____. *et al.* Coffee leaf scorch caused by a strain of *Xylella fastidiosa* from citrus. *Plant-dis*, v. 85, n 5, p. 501-505, 2001.
- _____.; ROSSETTI, V. & MACHADO, N. O. Victoria tangor – a natural hybrid tolerant to citrus variegated chlorosis. Fourteenth IOCV Conference (Graça, J.V.; Lee, R.F. & Yokomi, R.K. org.), 2000, pg 426.
- LI, W. L. *et al.* Genomic mapping of defense response genes in wheat. *Theor Appl Genet*, v. 98, p. 226-233, 1999.
- LIMA, J. E. O. A pesquisa sobre amarelinho no FUNDECITRUS. *Laranja*, v. 16, n.2, p.137-144, 1995.
- _____. *et al.* Coffee Leaf Scorch Bacterium: Axenic Culture, Pathogenicity, and Comparison with *Xylella fastidiosa* of Citrus. *Plant Dis*, v. 82, p. 94-97, 1998.
- _____. Diagnose da clorose variegada dos citros por microscopia ótica. *Fitopatol bras*, v. 22, n. 3, p. 370-374, 1997.
- _____.; ROBERTO, S. R. & COUTINHO, A. Clorose variegada dos citros - Cigarrinhas-do-xilema predominantes em plantas cítricas. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 13, Salvador, 1994. Resumos... Sociedade Brasileira de Fruticultura, p. 376, 1994.

- LING, P. *et al.* Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. *Theor. Appl. Genet*, v. 100, p. 1010-1017, 2000.
- LIU, P. C. A molecular study of the citrus genome through restriction fragment length polymorphism and isozyme mapping. Florida, University of Florida, 1990, 143p, Dissertation - University of Florida, 1990.
- LIU, B. H. & KNAPP, S. J. GMEDEL: A program for Mendelian segregation and linkage analysis of individual or multiple progeny populations using log-likelihood ratios. *J. Hered*, v. 81, p. 407, 1990.
- LIU, B. H. *Statistical genomics*. Linkage, Mapping, and QTL Analysis. Boca Raton: CRC Press, 1998. 854p.
- LOPES, J. R. S. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. *Laranja*, v. 20, n. 2, p. 329-344, 1999.
- _____. Mecanismos de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas. *Fitopatol bras*, v. 21, n. Suplemento, p. 328-329, 1996.
- LOPES, S. A. *et al.* Plantas invasoras hospedeiras de *Xylella fastidiosa*. *Fitopatol bras*. v.27, n. Suplemento, p. 62, 2002.
- _____. ROBERTO, P. G. & SUZELEI, C. F. Hospedeiros alternativos da *Xylella fastidiosa* dos citros. *Fitopatol bras*, v. 24, n. Suplemento, p. :250, 1999.
- LOPEZ, M. M. & CAMBRTA, M. Diagnóstico y detección de bacterias fitopatógenas. In: YACER, G.; LÓPEZ, M. M.; TRAPERO, A.; BELLO, A. (org) *Patología Vegetal*. Madrid: Sociedade Española de Fitopatologia, 1996, p. 587-625
- LU, Z. X. *et al.* Construction of a genetic linkage map and identification of AFLP markers for resistência to root-knot nematodes in peach rootstocks. *Genome*, v. 41, p. 199-207, 1998.

- LURO, F. *et al.* Citrus genome mapping with molecular markers: two maps obtained by segregation analysis of progeny of one intergeneric cross. In: *Proceedings International Citrus Congress*, 8, Sun City: 1996. v.2, p. 862-866.
- _____. Genetic mapping of an intergeneric citrus hybrids using molecular markers. *Fruits*, v. 49 n. 5-6, p. 404-408, 1994.
- LYNCH, M. & WALSH, B. *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sunderland: Sinauer Associates, 1997, 978p.
- LYONS, S. R.; GRIFFEN, A. L. & LEYS, E. J. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, v.68, p. 2362-2365, 2000.
- MACHADO, E. C. *et al.* Physiological aspects of sweet orange 'Natal' with CVC under field conditions. I Simpósio Genoma Funcional da *Xylella fastidiosa*. Serra Negra: 2001a, p. 22-23.
- MACHADO, E. C. *et al.* Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* v. 6, n. 1, p. 53-57, 1994a.
- MACHADO, M. A. Programa de biotecnologia em citros do laboratório da estação experimental Sylvio Moreira do IAC. *Laranja*, v. 13, p. :307-27, 1992.
- _____. *et al.* Genome and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*. *Molecular Biology Today*, v. 2, n. 3, p. 33-43, 2001b.
- _____. *et al.* O projeto genoma da *Xylella fastidiosa*. *RAPP*, v. 19, p. 63-77, 2001c.
- _____. Detecção de *Xylella fastidiosa* em espécies e variedades de citros sobre-enxertadas em laranja 'pêra' com clorose variegada de citros (CVC). *Fitopatol bras.* v. 22, n. 1, p. 30-33, 1997.
- _____. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. *Euphytica*, v. 92, p. 321-326, 1996.

- _____. Transmissão da clorose variegada dos citros (III) e seleção de espécies e variedades. *Laranja*, v.15, n.1, p. 97-107, 1994b.
- _____. Avaliação de transmissão e seleção de variedades à clorose variegada dos citros (CVC). *Laranja*, v. 13, p. 515-531, 1992.
- _____. Avaliação de transmissão e seleção de variedades à clorose variegada dos citros (II). *Laranja*, Cordeirópolis, v.14, n.1, p.167-176, 1993.
- MACKILL, D.J, ZHANG, Z. & REDONA, E. D, Colowit PM. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome*, v. 39, n. 5, p. 969-77, 1996
- MALAVOLTA, E. *et al.* Nova anomalia dos citros: estudos preliminares. *Laranja*, v. 11, p. 15-38, 1990.
- _____. & PRATES, H. S. Alterações na composição mineral das folhas de pomares afetados pela anomalia “amarelinho” ou clorose variegada. *Laranja*, v.12, p. 315-329, 1991.
- _____. Em discussão, as causas da nova anomalia dos citros. *Informativo Coopercitrus*, n. 43, ano V, p. 19-22, 1990.
- _____. & PINTO, W. B. S. Levantamento e observações sobre o “amarelinho” ou “clorose variegada” dos citros. *Laranja*, v. 13, n. 2, p. 503-513, 1992.
- MANLY, K. F. & ELLIOTT, R. W. RI manager, a microcomputer program for analysis of data from recombinant inbred strains. *Mammal Genome*, v. 1, p.123-126, 1993.
- MARQUES, C. M. *et al.* AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. *Theor. Appl Genet*, v. 96, p.727-737, 1998.
- MARQUES, L. L. R. *et al.* Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* in vitro. *Plant disease*, v. 86, n. 6, p. 633-638, 2002.
- _____. *Xylella fastidiosa* are biofilm-forming phytopathogenic bacteria. *Phytopathology*, v. 91 n. 6, p. S58, 2001a.

- MARQUES, M. V.; SILVA, A. M. & GOMES, S.L. Genetic organization of plasmid pXF51 from the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Plasmid*, v. 45, n. 3, p. 184-189, 2001b.
- MAUGHAN, P. J. *et al.* Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybeans: species diversity, inheritance and near-isogenic line analysis. *Theor Appl Genet*, v. 93, p. 392-401, 1996.
- MCCOY, R. E. *et al.* Periwinkle wilt, a new disease associated with xylem delimited rickettsialike bacteria transmitted by a sharpshooter. *Plant Dis Rep*, v. 62, p. 1022-1026, 1978.
- McELRONE A. J.; SHERALD, J. L. & FORSETH, I.N. Effects of water stress on symptomatology and growth of *Parthenocissus quinquefolia* infected by *Xylella fastidiosa*. *Plant Disease*, v. 85, p. 1160-1164, 2001.
-
- _____. Interactive effects of water stress and xylem-limited bacterial infection on the water relations of a host vine. *Journal of Experimental Botany*, v. 54, n. 381, p. 419-430, 2003.
- MEDINA, C. L. *Fotossíntese, relações hídricas e alterações bioquímicas em laranjeira 'Pêra' com CVC e submetida à deficiência hídrica*. Campinas, UNICAMP, 2002, 147p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- MEHTA, A.; LEITE, R. P. & ROSATO, Y. B. Assessment of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from citrus in Brazil by PCR-RFLP of the 16S rDNA and 16S-23S intergenic spacer and rep-PCR fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 79, n. 1, p. 53-59, 2001.
-
- _____. Polymorphism of *Xylella fastidiosa* strains by RAPD-PCR and SDS-PAGE of proteins. *Fitopatol bras*, v. 25, n. 4, p. 651-656, 2000.

- _____. & ROSATO, Y. B. Phylogenetic relationships of *Xylella fastidiosa* strains from different hosts, based on 16S rDNA and 16S-23S intergenic spacer sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, n. 2, p. 311-318, 2001.
- MEKSEM, K. *et al.* A high-resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol Gen Genet*, v. 249, p. 74-81, 1995.
- MENEGUCCI, A. *et al.* Alterações físico-químicas de frutos de laranjeira Valência com sintomas de clorose variegada dos citros. *Rev Bras Fruticultura*, v. 17, n. 1, p. 153-155, 1995.
- MESTRE, P. F. *et al.* Molecular markers flanking citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Theor Appl Genet*, v. 94, p. 458-464, 1997.
- MICHELMORE, R. W, PARAN, I, KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 88, p. 9828-9832, 1991.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. *Mapeamento da fruticultura brasileira*. Brasília: 2000, 110p.
- MINSAVAGE, G. V. *et al.* Development of a Polymerase Chain Reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology*, v. 84, n. 5, p. 456-461, 1994.
- MIRCETICH, S. M. *et al.* Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. *Phytopathology*, v. 66, p. 17-24, 1976.
- MIZUBUTI, E. S. G.; MATSUOKA, K. & PARIZZI, P. Associação de bactéria do tipo *Xylella* em laranjeiras com sintomas de clorose variegada na região da Zona da Mata de Minas Gerais. *Fitopatol bras*, v.19, p.241-4, 1994.

- MOLLENHAUER, H. H. & HOPKINS, D. L. Xylem morphology of Pierce's disease-infected grapevines with different levels of tolerance. *Physiol Plant Pathol*, v. 9, p. 95-100, 1976.
- MONTEIRO, P. B. *et al.* *Catharanthus roseus*, an experimental host plant for the citrus strain of *Xylella fastidiosa*. *Plant disease*. v. 85, p. 246-251, 2001.
- MORAES, M. G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. *RAPP*, v. 6, p. 261-284, 1998.
- MOREIRA, C. & MOREIRA, S. História da Citricultura no Brasil. In: O. Rodriguez, F. Viégas, J. Pompeu Jr.; A.S. Amaro (ed.). *Citricultura brasileira*. Campinas, SP, Fundação Cargill, 1991. p.1-22.
- MOREIRA, C.S. & PIO, R.M. 1991. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O. *et al.* (ed) *Citricultura Brasileira*. Campinas: Fundação Cargill, v. 1, p. 116-152, 1991.
- MORTENSEN, J. A.; STOVER, L. H. & BALERDI, C. F. Sources of resistance to Pierce's disease in *Vitis*. *Journal of American Society of Horticultural Science* v. 102, p. 695-697, 1977.
- MOURÃO FILHO, F. A. A. *et al.* Melhoramento dos citros para resistência à CVC. In: DONADIO, L.C. & MOREIRA, C.S. (eds) *Clorose Variegada dos Citros*. Bebedouro: EECB, 1997, 162p.
- MUTTON, M. A. & SENHORINI, J. C. O. Fundecitrus e a Citricultura. *Laranja*, v. 14, n. 1, p. 119-126, 1993.
- NANDI, S. *et al.* Mapping QTL's for submergence tolerance in rice by AFLP analysis and selective genotyping. *Mol Gen Genet*, v. 255, p. 1-8, 1997.
- NELSON, J. C. Qgene software for marker-based genomic analysis and breeding. *Mol Breed*, v. 3, p. 239-245, 1997.
- NIENHUIS, J. *et al.* Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with insect resistance in tomato. *Cro Science*, v. 27, p.797-803, 1987.

- NIKAIDO A. *et al.* Segregation distortion for AFLP markers in *Cryptomeria japonica*. *Genes Genes Systems*, v. 74, p. 55-59, 1999.
- NIKAIDO, A. *et al.* AFLP and CAPS linkage maps of *Cryptomeria japonica*. *Theor Appl Genet*, v. 100, n. 6, p. 825-831, 2000.
- NIKS, R. E. Nonhost plant species as donors for resistance to pathogens with narrow host range. II. Concepts and evidence on the genetic basis of nonhost resistance. *Euphytica*, v. 37, p. 89-99, 1988.
- NOGVA, H. K. & LILLEHAUG, D. Detection and quantification of *Salmonella* in pure cultures using 5'-nuclease polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*, v. 51, p. 191-196, 1999.
- NORTON, J. D. Resistance to leaf scald in plum. *Hortscience*, v. 21, p. 938, 1986.
- OBERST, R. D. *et al.* PCR-Based DNA Amplification and Presumptive Detection of *Escherichia coli* O157:H7 with an Internal Fluorogenic Probe and the 5' Nuclease (TaqMan) Assay. *Appl Envir Microbiol*, v. 64, p. 3389-3396, 1998.
- OLIVEIRA, A. C. *et al.* Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. *Euphytica*, v. 128, n. 3, p. 397-403, 2002.
- _____. Identification of sexual and nucellar Citrus seedlings through single and duplex PCR of simple sequence repeat locus. *Proc. Intl. Soc. Citriculture IX Congress*, v. 1, p. 138-141, 2000a
- OLIVEIRA, R.F. *et al.* Sap flow rates and stomatal conductance of sweet orange 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osb.) infected by *Xylella fastidiosa*. In: *Abstracts IX International Society of Citriculture Congress*, Florida: 2000b. p. 161.
- OLIVEIRA, R. P. *Mapeamento de laranja 'Pêra' [Citrus sinensis (L.) Osbeck] e tangerina 'Cravo' (C. reticulata Blanco) por pseudo-testcross*. Piracicaba: USP, 2001, 181p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2001.

- ORLANDO, C.; PINZANI, P. & PAZZAGLI, M. Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med*, v. 36, p. 255-269, 1998.
- PAILLARD, M.; LASHERMES, P. & PETIARD, V. Construction of a molecular linkage map in coffee. *Theor Appl Genet*, v. 93, p. 41-47, 1996.
- PAIVA, P. E. B. *et al.* Cigarrinhas de xilema em pomares de laranja do Estado de São Paulo. *Laranja*, v. 17, p. 41-54, 1996.
- PALAZZO, D. A. & CARVALHO, M. L. V. Desenvolvimento e progresso da clorose variegada dos citros (CVC) em pomares de Colina, SP. *Laranja*, v. 13, n. 2, p.489-502, 1992.
- PARADELA FILHO, O. *et al.* Primeira constatação em cafeeiro da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. *Laranja*, v. 16, p. 135, 1995.
- _____. Constatação de *Xylella fastidiosa* em cafeeiro no Brasil. *Summa Phytopathologica*, v. 23, n. 1, p. 46-49, 1997.
- PARAN, I.; AFTERGOOT, E. & SHIFRISS, C. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica*, v. 99, p. :167-173, 1998.
- PARK Y. H. *et al.* A genetic map of cucumber composed of RAPDs, RFLPs, AFLPs, and loci conditioning resistance to papaya.
- PARLEVLIET, J. E. & ZADOKS, J. C. The integrated concept of disease resistance: a new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica*, v. 26, p. 5-21, 1977.
- PASCHOLATI, S. F. Fitopatógenos: fitotoxinas e hormônios. In BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. & AMORIM, L. (eds) *Manual de fitopatologia*. Piracicaba: Editora Ceres, 1995 365-392p. (Parte I).
- PASCHOLATI, S. F. *et al.* Vasos do xilema colonizados por *Xylella fastidiosa* em ameixeira, cafeeiro e citros e a sintomatologia. *Fitopatol bras*, v. 27, n. Suplemento, p. 68, 2002.

- PATERSON, A.H. *et al.* Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature*, v. 335, p.721-726, 1988.
- PAUL, S. *et al.* Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. *Theor Appl Genet*, v. 94, p. 255-263, 1997.
- PAZQUET, J. *et al.* Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene *Run1* in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. *Theor Appl Genet*, v. 103, p. 1201-1210, 2001.
- PEJIC, I. *et al.* Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. *Theor Appl Genet*, v. 97, p. 1248-1255, 1998.
- PEREIRA, E. F. Estudo de fatores sazonais relacionados à transmissão de *Xylella fastidiosa* em pomares de citros. Piracicaba, USP, 2000, 82 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade Estadual de São Paulo, 2000.
- PIERCE, N. B. The California Vine Disease. Division of Vegetal. *Pathology Bulletin*, n. 2, Department of Agriculture, 1892.
- PINHEIRO, J. B. & CARNEIRO, I. F. Análise de QTL no melhoramento de plantas. Goiânia:UFG, 2000, 224 p.
- POMPEU JR, J. *et al.* Primeira constatação de sintomas foliares de clorose variegada dos citros e tangerinas e híbridos de tangerina. *Fitopatol bras*, v. 19, n. suplemento, p. 123, 1994.
- POOLER, M. R. *et al.* Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, v. 25, p. 123-126, 1997.

- _____. & HARTUNG, J. S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Curr Microbio*, v. 31, p. 377-381, 1995a
- _____. Genetic relationships among strains of *Xylella fastidiosa* from RAPD-PCR data. *Curr Microbiol*, v. 31, n. 2 p. 134-137, 1995b.
- POWELL, W. *et al.* Analysis of quantitative traits in barley by the use of amplified fragment length polymorphisms. *Heredity*, v. 79, p. 48-59, 1997.
- _____. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germoplasm analysis. *Mol Breed*, v.2, p. 225-238, 1996.
- PRADO, E. E. *Desenvolvimento de mapas de ligação das espécies Citrus grandis (L.) Osbeck (1757) e Citrus aurantifolia Swingle (1913), baseados em marcadores RAPD*. Botucatu, UNESP, 1997, 94p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de São Paulo, 1997.
- PRIA, JR, W. D. *et al.* *Xylella fastidiosa* em frutos e sementes de laranja-doce afetados pela clorose variegada dos citros. *Laranja*, v. 23, n. 1, p.183-202, 2002.
- _____. Clorose variegada dos citros diminui tamanho de sementes de laranja doce e afeta sua germinação. In: *Programas e resumos do Congresso Paulista de Fitopatologia*. Campinas: Brasil, 2000. p. 285.
- PRIOUL, J. L. *et al.* Dissecting complex physiological functions through the use of molecular quantitative genetics. *J Exp Bot*, v.48, n. 311, p.1151-1163, 1997.
- PROSEN, D. *et al.* Direct detection of the halo blight pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed by DNA amplification. *Phytopathology*, v. 81, p.1159.
- PURCELL, A. H. *Xylella fastidiosa*, a regional problem or global threat? *Journal of Plant Pathology*, v. 79, v. 2, p. 99-105, 1997.
- _____. Cigarrinhas na cultura dos citros. In: *Anais do 3º Seminário Internacional de Citros*. Bebedouro: 1994, p. 195-209.

- _____. Homopteran transmission of xylem-limited bacteria. In: HARRIS, K. F. (ed) *Advances in vector research*, v.6, New York: Springer-verlag, 1990, p. 243-266.
- _____.; FINLAY, A. H. & McCLEAN, D. L. Pierce's disease bacterium: Mechanism of transmission by leafhopper vectors. *Science*, v. 206, p. 839-841, 1979.
- _____.; & HOPKINS, D. L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogen. *Annu. Rev. Phytopathol*, v. 34, p. 131-51, 1996.
- PUSTERLA, N. *et al.* Detection and quantification of Ehrlichia risticii genomic DNA in infected horses and snails by real-time PCR. *Veterinary Parasitology*, v. 90, n. 129-135, 2000.
- QI, X.; STAM, P. & LINDHOUT, P. Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. *Theor Appl Genet*, v. 96, p. 376-384, 1998.
- QIN, X. *et al.* An evaluation of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from disease citrus and coffee in Sao Paulo, Brazil. *Phytopathology*. v. 91, n. 6, p. 599-605, 2001.
- QUARRIE, S. A. Absciscic acid and drought resistance in crop plants. *BPGRG News Bull*, v. 7, p. 1-15, 1984.
- _____. *et al.* QTL analysis to study the association between leaf size and absciscic acid accumulation in droughted rice leaves and comparisons across cereals. *Plant Mol Biol*, v. 35, p. 155-165, 1997.
- QUEIROZ-VOLTAN, R. B. *et al.* Aspectos estruturais do cafeeiro infectado com *Xylella fastidiosa*. *Bragantia*, v. 57, p. 23-33, 1998.
- _____. & PARADELA FILHO, O. Caracterização de estruturas anatômicas de citros infectados com *Xylella fastidiosa*, *Laranja*, v. 20, p. 55-76, 1999.

- RAEYMAEKERS, L. Quantitative PCR: Theoretical Considerations with Practical Implications. *Analytical Biochemistry*, v. 214, n. 2, p. 582-585, 1993.
- RAJU, B. C. & WELLS, J. M. Diseases caused by fastidious xylem-limited bacteria. *Plant Dis*, v. 70, p. 182-186, 1986.
- RASMUSSEN, O. F., & WULFF, B. S. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* using PCR. In: DURBIN, R.D.; SURICO, G. AND MUGNAI, L. (eds). *Proceedings 4th International Working Group on Pseudomonas syringae Pathovars. Stamperia Granducale*, Florence: 1990, p. 369-376.
- RASMUSSEN, J. M. A contribution to the theory of quantitative character inheritance. *Hereditas*, v. 18, p. 245-261, 1933.
- RAVA, C.A. & SARTORATO, A. Conceitos básicos sobre doenças de plantas. In: SARTORATO, A. & RAVA, C.A. (eds) Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994.
- REAMON-BÜTTNER, S. M. & JUNG, C. AFLP-derived STS markers for the identification of sex in *Asparagus officinalis* L. *Theor Appl Genet*, v. 100, p. 432-438, 2000.
- REIFSCHNEIDER, F. J. B. & LOPES, C. A. Melhoramento genético para resistência a doenças de plantas. *RAPP*, v. 6, p. 329-366, 1998.
- REMINGTON D. L. *et al.* Construction of a genetic map with nearly complete genome coverage in *Pinus taeda*. *Theor Appl Genet*, v. 98, p. 1279-1292, 1999.
- RIBEIRO, R. V. Influência da temperatura na fotossíntese de laranjeira ‘Pêra’ com clorose variegada dos citros. Piracicaba, USP, 2002, 73p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2002.
- RICCI, A. P. *et al.* Detecção de *Xylella fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros, por “Tissue Blots”. *Fitopatol bras*, v. 22, n. Suplemento, p. 239, 1997.

- RIDOUT, M. S. *et al.* Three-point linkage analysis in crosses of allogamous plant species. *Genet Res*, v. 72, p. 111-121, 1998.
- RITTER, E.; GEBHARDT, C. & SALAMINI, F. Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. *Genetics*, v. 125, p. 645-654, 1990.
- ROBERTO, S. R.; CARLOS, E. F. Efeito da poda de ramos afetados e do controle de plantas daninhas na incidência de CVC em pomares de Laranja 'Valência'. In: 1º *Simpósio Internacional de Fruticultura*. Botucatu: 1999, 35.
- _____. *et al.* Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facilis* em citros. *Fitopatol. bras*, v. 21, n. 4, p. 517-518, 1996.
- ROBERTSON, D. S. Understanding the relationship between qualitative and quantitative genetics. In: HELENTJARIS, T. & BURR, B. (eds) *Development and Application of molecular markers to problems in plant genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, p. 81-87.
- RODAS, V. Z. Convivência com a clorose variegada dos citros. *Laranja*, v. 15, p. 129-133, 1994.
- ROMAN, B.L. *et al.* Non-radioisotopic AFLP method using PCR primers fluorescently labeled with Cy5. *Biotechniques*, v.26, n. 2, p. 236-238, 1999.
- ROMEIRO, R. S. Fundamentos de fisiologia do parasitismo em fitopatologia. Boletim n. 253, Imprensa Universitária, UFV, Viçosa, 31 p.
- ROOSE, M. L. *et al.* Mapping the Citrus genome. In: GOREN, R. & GOLDSCHMIDT, E.E (eds). *Acta Horticulturae*, v.535, p. 25-32, 2000.
- ROOSE, M. L.; JARRELL, D.C. & KUPPER, R. S. Genetic mapping in a *Citrus* x *Poncirus* F₂ population. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, p. 210-213, 1992.

- ROSATO, Y. B. *et al.* Diversity of a *Xylella fastidiosa* population isolated from *Citrus sinensis* affected by citrus variegated chlorosis in Brazil. *Syst appl microbial*, v. 21, n. 4, p. 593-598, 1998.
- ROSSETTI, V.; CARVALHO, M. L. & CHAGAS, C. M. Ensaaios de transmissão de clorose variegada dos citros (CVC) em campo. *Fitopatol bras*, v. 20, n. suplemento, p. 67, 1995.
- _____. & De NEGRI, J. D. Clorose variegada dos citros (CVC). *Laranja*, 15:1-14, 1990.
- _____. *et al.* Occurrence of xylem-restricted bacteria in sweet orange trees affected by chlorotic variegation, a new citrus disease in Brazil. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*, v. 310, n. 8, p. 345-350, 1990a. (Serie III Sciences de la Vie)
- _____. Resultados preliminares de estudos sobre uma nova anormalidade dos citros observada no estado de São Paulo e Minas Gerais. *Summa Phytopathologia*, v. 16, p. 13, 1990b.
- _____.; GONZALES, M. A. & DONADIO, L. C. - History of CVC in Brazil. Citrus Variegated Chlorosis. Bebedouro-SP, 162, p.1-22, 1998.
- _____. Histórico. In: DONADIO, L.C. & MOREIRA, C.S. *Clorose Variegada dos Citros*. Bebedouro: Fundecitrus, 1997. p. 1-21.
- ROSSETTO, E. A. & DUARTE, V. Epidemiological aspects of citrus variegated chlorosis at Rio Grande do Sul State, Brazil. In: Abstracts of Joint Meeting of APS, MSA, and SON. v. 91. Saint Paul: APS PRESS, 2001. p. S77-S77.
- ROUPPE van der VOORT, J. N. A. M. *et al.* Two additive QTLs conferring broad-spectrum resistance in potato to *Globodera pallida* are localized on resistance gene clusters. *Theor Appl Genet*, v. 101, p. 1122-1130, 2000.

- _____. Use of allele specificity of comigrating AFLP markers used to align genetic maps from different potato genotypes. *Mol Gen Genet*, v. 255, p.438-447, 1997.
- SABADIN, P. K. & GARCIA, A. A. F. Estudo utilizando simulação do mapeamento de QTL's através de análise de marcadores individuais para caracteres quantitativos com diferentes herdabilidades. Anais (CD-ROOM) do Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia: 2001.
- SAIKI, R. K. *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 230, p. 1350-1354, 1985.
- _____. Primer-directed enzymatic amplification with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v. 239, p. 487-491, 1988.
- SALIBA-COLOMBANI, V. *et al.* Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. *Genome*, v. 43, p. 29-40, 2000.
- SALIBE, A. B. *Reação de plantas cítricas à bactéria Xylella fastidiosa em função de diferentes métodos de inoculação*. Piracicaba, USP, 2001, 75p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2001.
- SALVA, R. A.; ROBERTO, S. R. & CARLOS, E. F. Situação da clorose variegada dos citros no estado de São Paulo. *Laranja*, v. 16, n. 2, p. 145-154, 1995.
- SANKAR, A. A. & MOORE, G. A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of the linkage map. *Theor. Appl Genet*, v. 102, p. 206-214, 2001.
- SANTOS FILHO, H. P. *et al.* Identification of citrus variegation chlorosis in the state of Bahia, Brazil. *Fitopatol bras*, v. 24, n. 2, p. 190, 1999.

- _____. Ocorrência da clorose variegada dos citros em pomares do Estado da Bahia. *Fitopatol bras*, v.22, p.234-235, 1997.
- SATAGOPAN, J. M. *et al.* A bayesian approach to detect quantitative trait loci using markov Chain monte Carlo. *Genetics*, v. 144, p. 805-815, 1996.
- SAX, K. The association of size differences with seed coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics*, v.8, p. 552-560, 1923.
- SCARPARI, L. M. *Modulação da expressão de genes de patogenicidade em Xylella fastidiosa sob condições de baixa e alta densidade celular*. Piracicaba, USP, 2001, 85p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2001.
- SCHAAD, N. W. Serological identification of plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, v. 17, p. 123-147, 1979.
- _____. *et al.* Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and automated realtime fluorescence detection system. *Plant Dis*, v. 83, p.1095-1100, 1999.
- _____. & FREDERICK, R. D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Can. J. Plant Pathol.*v. 24, p. 250–258, 2002.
- _____.; JONES, J. B. & CHUN, W. (eds). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 3 ed. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 2001.
- _____.; OPPENORTH, D. & GAUSH, P. Real-time polymerase chain reaction for one-hour on-site diagnosis of Pierce’s disease of grape in early season asymptomatic vines. *Phytopathology*, v. 92, n. 7, 721-728, 2002.
- SCHEFFER, R. P. Toxins as chemical determinants of plant disease. In DALY, J. M. & DEVERALL, B. J. (eds.) *Toxins and Plant Pathogenesis*. Sydney: Academic Press, 1983, p. 1-40.

- SCHERER, M. C. *et al.* Avaliação da presença de *Xylella fastidiosa* em frutos, sementes e plântulas de citros por PCR. *Fitopatol bras*, v.25, n. Suplemento, p. 330, 2000.
- SCHOEN, C. D.; KNOOR, D. & LEONE, G. Detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers by immunocapture and fluorogenic 5' Nuclease RT-PCR assay. *Phytopathology*, v. 86, p. 993-999, 1996.
- SCHWARZ, G. *et al.* Application of fluorescence-based semi-automated AFLP analysis in barley and wheat. *Theor Appl Genet*, v. 100, p. 545-551, 2000.
- SEAL, S. E.; JACKSON, L. A.; DANIELS, M. J. Isolation of *Pseudomonas solanacearum*-specific DNA probe by subtractive hybridisation and construction of species-specific oligonucleotide primers for sensitive detection by the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, v. 58, p. 3759-3761, 1992.
- SEGNANA, L. R. *et al.* First report of *Xylella fastidiosa* causing citrus variegated chlorosis (CVC), in Paraguay. *Fitopatol bras*, v. 23 n. suplemento, p. 216, 1998.
- SENTELHAS, P. C. & ARAUJO, J. P. C. Distribuição das chuvas no interior paulista. *Citricultura Atual*, n. 21, p. 10, 2001.
- SHAPIRO, J. A. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol*, v. 52, p. 81-104, 1998.
- SHERALD, J. L. *et al.* Sycamore leaf scorch: culture and pathogenicity of fastidious xylem-limited bacteria from scorch-affected trees. *Plant dis*, v. 67, p. 849-852, 1983.
- _____. Association of fastidious xylem-inhabiting bacteria with leaf scorch in red maple. *Plant Dis*, v. 71, p. 930-933, 1987.
- SHIELDS, D. C. *et al.* Error filtration, interference, and the human linkage map. *Proc. Natl Acad Sci*, v. 88, p. 6501-6505, 1991.
- SIGEE, D. C. *Bacterial Plant Pathology*. Cambridge: University Press, 1993.

- SILVA, D. S. & RODRIGUEZ, A. P. M. Detecção de fimbrias produzidas por *Xylella fastidiosa* no sistema vascular de folhas de citrus, através de microscopia eletrônica de varredura. *Fitopatol bras*, v. 25, n. suplemento, p. 330, 2000.
- SILVA, F. R. *et al.* Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *FEMS micro-biol lett*, v. 203, n. 2, p. 165-171, 2001.
- SILVA, H. D. Aspectos Biométricos da Detecção de QTL's (Quantitative Trait Loci") em Espécies Cultivadas. Piracicaba, USP, 2001, 147p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2001.
- SIMONS, G. *et al.* AFLP-based fine mapping of the *Mlo* gene to a 30-kb DNA segment of the barley genome. *Genomics*, v. 44, p. 61-70, 1997.
- SIMPSON, A. J. G. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, v. 406, n. 6792, p. 151-159, 1997.
- SIVIERO, A. *Avaliação de métodos de inoculação de Phytophthora parasítica e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de Citrus sunki vs. Poncirus trifoliata à gomose*. Botucatu, UNESP, 2001, 117. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de São Paulo, 2001.
- SMITH, C. J. Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. *New Phytol.* v. 132, p. 1-45, 1996.
- SMOLKA, M. B. *et al.* Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. *Proteomics*, v. 3, n. 2, p. 224-37, 2003.
- SOOST, R. K. & CAMERON, J. W. Citrus. In: JANICK J. & MOORE, J. N. (eds.) *Advances in Fruit Breeding*. Purdue: Purdue Univ. Press, 1975, p. 507-540.
- SOTO, G E & HULTGREN, S. J. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol*, v. 181, p. 1059-1071, 1999.

- SOUZA, P. S.; DONADIO, L. C. & JAIMEZ, E. P. G. Avaliação de alguns genótipos de citros em relação à clorose variegada dos citros (CVC). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 22, n. 2, p. 148-152, 2000.
- SOUZA, L. C. A. *Produção e caracterização de mutantes do operon gum de Xylella fastidiosa*. Piracicaba, USP, 2002, 96p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2002.
- SRIPONGPANGKUL, K. *et al.* Genes/QTLs affecting flood tolerance in rice. *Theor Appl Genet*, v. 101, p. 1074-1081, 2000.
- STASKAWICZ, B. J. *et al.* Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* v. 268, p. 661-667, 1995.
- STAUB, J. E.; SERQUEN, F. C. & GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hortscience*, v. 31, n. 5, 729-741, 1996.
- STUBER, C.W. Biochemical and molecular markers in plant breeding. In JANICK, J. (ed) *Plant Breeding Reviews*, v. 9, p.37-61, 1992.
- SUAZO, A. & HALL, H.G. Modification of the AFLP protocol applied to honey bee (*Apis mellifera* L.) DNA. *Biotechniques*, v. 26, n. 4 p. 704-5/ 708-9, 1999.
- SUGIMORI, M. H. *et al.* Estudo de transmissão do agente da CVC. *Summa Phytopathologica*, v. 21, n. 1, p. 58-59, 1995.
- SUITER, K.A.; WENDEL, J.F. & CASE, J.S. Linkage-1: a Pascal computer program for the detection and analysis of genetic linkage. *The Journal of Heredity*, v. 74, p. 203-204, 1983.
- TAIZ, L. & ZEIGER, R. *Plant Physiology*. Redwood City: Benjamin/Cummings Publishing, 1991, 249p.
- TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. *Ann Rev Genet*, v. 27, p.:205-233.
- THODAY, J.M. Location of polygenes. *Nature*, v. 191, p. 368-370.

- THOMAS, C. M. *et al.* Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf-9* genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Plant Journal*, v. 8, p. 785-794, 1995.
- THOMPSON, E. A. Crossover counts and likelihood in multipoint linkage analysis. *IMA Journal Mathematical Applied Medicine Biology*, v. 4, p. 93-108, 1987.
- TIMMER, L. W. *et al.* A fastidious, xylem-limited bacterium infecting ragweed. *Phytopathology*, v. 73, p. 975-979, 1983.
- TIMMER, L. W.; GARNSEY, S. M., & GRAHAM, J. H. *Compendium of citrus diseases*. 2. ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2000. 92 p.
- TORRES, A. M. *et al.* Segregation distortion and linkage of *Citrus* and *Poncirus* isozyme genes. *The Journal of Heredity*, v. 76, p. 289-294, 1985.
- TOTH, I. K.; AVROVA, A. O. & HYMAN, L. J. Rapid identification and differentiation of the soft rot erwinias by 16S-23S intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. *Appl Environ Microbiol.* v. 67, n. 9 p. 4070-6, 2001.
- TOZLU, I., GUY, C. L., MOORE, G. A. QTL analysis of morphological traits in an intergeneric BC₁ progeny of *Citrus* and *Poncirus* under saline and nonsaline environments. *Genome*, v.42, p. 1020-9, 1999a.
- _____. QTL analysis of Na⁺ and Cl⁻ accumulation related traits in an intergeneric BC₁ progeny of *Citrus* and *Poncirus* under saline and nonsaline environments. *Genome*, v. 42, p.692-705, 1999b.
- TRAVENSOLO, R. F. & LEITE JR., R. P. Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* entre plantas invasoras de pomares de citros com clorose variegada. *Fitopatol bras*, n. 21, n. Suplemento, p. 336, 1996.
- _____.; LEMOS, E. G. M. & LEITE, JR., R.P. Detecção de *Xylella fastidiosa* em plantas invasoras de pomares de citros através dos métodos DAS-ELISA e PCR. 22º Congresso Paulista de Fitopatologia, Jaboticabal: 1999, p. 80.

- TRIGALE, T. A.; SAMSON, R. & COLENO, A. Problems related to the use of serology in phytobacteriology. *Proceedings of the Fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Angers: 271-288. 1978.
- TUBELIS, A.; BERETTA, M. J. G. & NETO, J. *et al.* Primeira constatação da clorose variegada dos citros-CVC, no Distrito Federal. *Fitopatol Bras*, v. 18, p. 312, 1993a.
- TUBELIS, A.; RODRIGUES NETO, J. & BERETTA, M.J.G. Primeira constatação da anomalia clorose variegada dos citros no estado de Goiás. *Summa Phytopathologica*, v.19, p.46, 1993b.
- TYAGI, S. & KRAMER, F.R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*,; v. 14, p. 303-308, 1996.
- UENO, C.; FUNADA, K. & YORINORI, M. A. First report of *Xylella fastidiosa* on *Catharanthus roseus* in Brazil. *Plant Dis*. v. 82, p. 712, 1998.
- UMAERUS, V. & UMAERUS, M. Inheritance of resistance to late blight. In: BRADSHAW, J. E. & MACKAY, G. R. (eds) *Potato Genetics*. Oxon: CAB International, 1994, p.365-401.
- VALE, F. X. R.; PARLEVLIET, J.E. & ZAMBOLIN, L. Concepts in plant disease resistance. *Fitopatol bras*, v. 26, n. 3, p. 577-589, 2001.
- Van BECKHOVEN, J. R. C. M.; STEAD, D. E. & van der WOLF, J. M. Detection of *Clavinacter michiganensis* subsp. sepedonic by amplidet RNA, a new rechnology based on real time monitoring of NASBA amplicons with a molecular beacon. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 840-849, 2002.
- Van den ACKERVEKEN, G. F. J. M.; Van KAN J. A. L. & De WIT, P. J.G. M. Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene-hypothesis. *Plant J*, v. 2, p. 359-366, 1992.

- van der WOLF, J. M. *et al.* Immunomagnetic separation of *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica from potato peel extracts to improve detection sensitivity on a crystal violet pectate medium or by PCR. *J Appl Bacteriol*, v. 80, n. 5, p. 487-95, 1996.
- Van ECK, H. J. *et al.* The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol Breed*, v. 1, p. 397-410, 1995.
- Van HEUSDEN, A. W. *et al.* A genetic map of an interspecific cross in *Allium* based on amplified fragment length polymorphism (AFLP™) markers. *Theor Appl Genet*, v. 100, p. 118-126, 2000.
- van OOIJEN, J. W. Draw Map: a computer program for drawing genetic linkage maps. *J hered*, v. 85, p. 66, 1994.
- Van OOIJEN, J. W. & VOORRIPS, R. E. *JoinMap^R versión 3.0; software for the calculation of genetic linkage maps*. Wageningen: Plant Research International, 2001. 51 p.
- Van SLUYS, M. A. *et al.*, Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, v. 40, p. 169-89, 2002.
- _____. Comparative Analyses of the Complete Genome Sequences of Pierce's Disease and Citrus Variegated Chlorosis Strains of *Xylella fastidiosa*. *J Bacteriol*, v. 185, n. 3, p. 1018-1026, 2003.
- VANDER MOLEN, G. E.; BECKMAN, C. H. & RODEHORST, E. Vascular gelation: a general response phenomenon following infection. *Physiol Plant Pathol*, v. 11, p. 95-100, 1977.
- VANDERPLANK, J. E. *Disease resistance in plants*. New York: Academic Press, 1968.
- _____. *Plant diseases: epidemics and control*. New York: Academic Press, 1963, 349 p.
- VIVIAN, A. & GIBBON, M. J. Avirulence genes in plant-pathogenic bacteria: signals or weapons? *Microbiology*, v. 143, p. 693-704, 1997.

- VOS, P. *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, v. v. 23, n. 21, p. 4407-14, 1995.
- VUYLSTEKE, M. *et al.* Two high-density AFLP linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. *Theor Appl Genet*, v. 99, p. 921-935, 1999.
- WALKER, N. J. A Technique Whose Time Has Come. *Science*, v. 296, p. 557-559, 2002.
- WANG, G. *et al.* RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. *Genetics*, v. 136, p. 1421-1434, 1994.
- WANG, Z. *et al.* Rice ESTs with disease-resistance gene- or defense-response gene-like sequences mapped to regions containing major resistance genes or QTLs. *Mol Genet Genomics*, v. 265, p. 302-310, 2001.
- WASTIE. R. L. Breeding for resistance. In: INGRAM D. S., WILLIAMS, P. H. (eds) *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. *Advances in Plant Pathology*, v.7, p. 193-223, 1991.
- WEBBER, C. A. Mapping cold tolerance quantitative trait loci (QTL) in a *Citrus grandis* x *Poncirus trifoliata* F₁ pseudo-testcross population using molecular markers and evaluation of homology with a related population map. Dissertation PhD. University of Florida, 1999, 91 p.
- WELLER, J. L. Maximum likelihood techniques for the mapping and analysis of quantitative trait loci with the aid of genetic markers. *Biometrics*, v.42, p.627-640, 1986.
- WELLER, S. A. *et al.* Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol*, v. 66, p. 2853-8, 2000.
- WELLS, J. *et al.* *Xylella fastidiosa* gen nov., sp. nov. gramnegative, xylem limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 37, n. 6, p. 859-862, 1987.

- WENDLAND, A. Diversidade genética de *Xylella fastidiosa* em três regiões produtoras de citros (*Citrus sinensis*) do Estado de São Paulo. Piracicaba, USP, 2000. 75p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2000.
- WHITCOMBE, D. *et al.* Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnology*, v. 17, p. 804-807, 1999.
- WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S. M. & TIMMER, L. W. *Compendium of Citrus Diseases*. St. Paul: APS Press, 1996. 80p.
- WITTEWER, C. T. *et al.* Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, v. 22, n. 1, p. 130-1/ 134-8, 1997.
- WIXON, J. Pathogen special: *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Xylella fastidiosa*. *Yeast*, v. 17, p. 307-313, 2000.
- WULFF, N. A. *et al.* Celulases de *Xylella fastidiosa*: expressão heteróloga, atividade catalítica e colonização das células do xilema. *Fitopatol Bras* v. 26, n. Suplemento, p. 287, 2001.
- YAMAMOTO, P. T. *et al.* Tempo necessário para inoculação de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas em plantas cítricas. *Fitopatol bras*, v. 26, n. suplemento, p274, 2001.
- _____. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Homalodisca ignorata*, *Acrogonia virescens* e *Molomea cincta* (Hemíptera: Cicadellidae) em plantas cítricas. In: Anais 23º Congresso Paulista de Fitopatologia, Campinas: 2000, p.284-285.
- YOUNG, W. P.; SCHUPP, J.M. & KEIM, P. DNA methylation and AFLP marker distribution in the soybean genome. *Theor Appl Genet* , v. 99, p. 785-792, 1999.
- YOUNG, N. D. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathology*, v. 34, p. 479-501, 1996.

- ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. *European Patent Application*, n. 0534858 A1, 1993.
- ZAMIR, D. & TADMOR, Y. Unequal segregation of nuclear genes in plants. *Bot Gaz* v. 147, p. 355-358, 1986.
- ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetic*, v. 136, p. 1457-1468, 1994.
- ZHU, J. H. *et al.* Towards rice genome scanning by map-based AFLP fingerprinting. *Mol Gen Genet*, v. 261, n. 1, p. 184-95, 1999.
- ZIMMERMAN, K. & MANNHALTER, J. W. Technical aspects of quantitative competitive PCR. *BioTechniques*, v. 21, p. 268-279, 1996.
- ZIMNOCH-GUZOWSKA, E. *et al.* QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* spp. *Atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP, and resistance-gene-like markers. *Crop Sci*, v. 40, p. 1156-1167, 2000.

9. RELAÇÃO DE ATIVIDADES ACADÊMICO-CIENTÍFICAS DESENVOLVIDAS PELO CANDIDATO DURANTE O DOUTORADO

A. Artigos científicos completos publicados

1) OLIVEIRA, A. C. *et al.* Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by Real-Time Polymerase Chain Reaction assay. *Phytopathology* (USA) 92(10):1048-1054 (2002).

2) OLIVEIRA, A. C. *et al.* Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. *Euphytica* (The Netherlands) 128(3):397-403 (2002).

3) OLIVEIRA, A. C. *et al.* Identification of sexual and nucellar *Citrus* seedlings through single and duplex PCR of simple sequence repeat locus. *Proc. Intl. Society Citriculture* vol. I, pp. 138-141 (2000).

4) OLIVEIRA, A. C. *et al.* Adaptation of minipreps-SDS and single-step in the extraction of citrus DNA for PCR analyses. *Proc. Intl. Society Citriculture* vol. I, pp. 105-107 (2000).

5) OLIVEIRA, A. C. *et al.* Evidence of the gradient of distribution of *Xylella fastidiosa* within xylem of *Citrus* leaves. *Proc. Intl. Society Citriculture* vol. II, pp. 1043-1045 (2000).

6) OLIVEIRA, A. C. & MACHADO, M. A. *In vitro* rescue of embryos of *Citrus* and identification of hybrids through morphological and molecular markers. *Proc. Intl. Society Citriculture* vol. I, pp. 172-174 (2000).

7) OLIVEIRA, A. C.; GARCIA, A. N. & MACHADO, M. A. Taxa poliembriônica de sementes de tangor ‘Murcote’ x laranja ‘Pêra’ e identificação de tangores através de

marcadores microssatélites. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 22, n.3, p. 306-309, 2000.

B. Comunicações Científicas publicadas em Anais de Congressos, Encontros e Simpósios

1) OLIVEIRA, A. C. *et al.* Mapeamento genético de marcadores AFLP ligados a locos de resistência quantitativa de citros à *Xylella fastidiosa*. 48^o Congresso Nacional de Genética. 17 a 20 de setembro de 2002. Águas de Lindóia, São Paulo.

2) OLIVEIRA, A. C. *et al.* Mapeamento genético para resistência à clorose variegada dos citros. *Genetics and Molecular Biology*, v. 24 (3) pg 1411, 2001. CD ROM.

3) OLIVEIRA, A. C. *et al.* Trocas gasosas em híbridos de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’ infectados com a *Xylella fastidiosa*. *Fitopat. bras.*, v. 26 (Suplemento), p. 286, 2001.

4) OLIVEIRA, A. C. *et al.* PCR quantitativo em tempo real para detecção de *Xylella fastidiosa*. *Fitopat. bras.*, v. 26 (Suplemento), p. 285-286, 2001.

5) OLIVEIRA, A. C.; GARCIA, A. N. & MACHADO, M. A. Variabilidade fenotípica da poliembrionia entre sementes de tangor ‘Murcote’ (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis* (L.) Osb.) x laranja ‘Pêra’ (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) através da distribuição de Poisson. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, nº 3 (Supplement), p. 515-6, 2000.

6) OLIVEIRA, A. C. *et al.* Adaptação de rápidos miniprep de SDS e single-step na extração de DNA em citros para análises de PCR. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, nº 3 (Supplement), p. 516-7, 2000.

7) OLIVEIRA, A. C. & MACHADO, M. A. Resgate *in vitro* de embriões de tangor ‘Murcote’ (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis* (L.) Osb.) e laranja ‘Pêra’ (*Citrus*

sinensis (L.) Osb.) e identificação de híbridos através de marcadores morfológicos e moleculares. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, nº 3 (Supplement), p. 515, 2000.

8) OLIVEIRA, A. C.; GARCIA, A. N. & MACHADO, M. A. Método eficiente e rápido de purificação de DNA de folhas de Citros para detecção de *Xylella fastidiosa* através de PCR. *Fitopat. bras.*, v. 25 (Suplemento), p. 327, 2000.

9) OLIVEIRA, A. C. *et al.* Transmissão de *Xylella fastidiosa* para plântulas de tangor ‘Murcott’ e laranja ‘Pêra’ através de inoculação direta e encostia. *Fitopat. bras.*, v. 25 (Suplemento), p. 327, 2000.

10) OLIVEIRA, A. C. *et al.* Avaliação da correspondência entre a porcentagem esperada de embriões zigóticos/semente e a de plântulas híbridas identificadas em citros através de marcadores microssatélites. *II Simpósio Brasileiro de Melhoramento de Fruteiras*, p. 146, Viçosa-MG, 2000.

11) OLIVEIRA, A. C. *et al.* Identificação de híbridos em citros através de genotipagem multiplex de locus microssatélites. *II Simpósio Brasileiro de Melhoramento de Fruteiras*, p. 145, Viçosa-MG, 2000.

12) OLIVEIRA, A. C. *et al.* Uso de marcadores microssatélite na diferenciação de plântulas zigóticas e nucelares de *Citrus*. *Genetics and Molecular Biology*, v. 22, nº 3 (Supplement), p. 695-6, 1999.

13) OLIVEIRA, A. C.; GARCIA, A. N. & MACHADO, M. A. Descrição de marcador morfológico para seleção de plântulas híbridas entre tangor Murcote (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e laranja Pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Genetics and Molecular Biology*, v. 22, nº 3 (Supplement), p. 695, 1999.

14) OLIVEIRA, A. C.; CRISTOFANI, M. & MACHADO, M. A. Seleção de plântulas zigóticas de *Citrus* através de duplo marcador RAPD genótipo-específico. *Genetics and Molecular Biology*, v. 22, nº 3 (Supplement), p. 691, 1999.

- 15) OLIVEIRA, A. C. *et al.* Identificação de duplo marcador RAPD gerado por um único “primer” para seleção de híbridos de citros. *5º Encontro Científico dos Pós-Graduandos do CENA-USP*, p. 87, 1999.
- 16) OLIVEIRA, A. C. *et al.* Seleção de marcadores RAPD genótipo-específicos para cruzamentos interespecíficos de *Citrus* spp. *Genetics and Molecular Biology*, v. 21, nº 3 (Supplement), p. 222, 1998.
- 17) OLIVEIRA, A. C.; CRISTOFANI, M. & MACHADO, M. A. Avaliação de multiplicação de *Xylella fastidiosa* em uma progênie F₁ de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*. *Fitopatol. bras.*, v. 23 (Suplemento), p. 214, 1998.
- 18) OLIVEIRA, A. C. *et al.* Identification of sexual and nucellar *Citrus* seedlings through single and duplex PCR of simple sequence repeat locus. *9th International Society of Citriculture Conference*, Florida/USA, p. 115, 2000.
- 19) OLIVEIRA, A. C. *et al.* Adaptation of minipreps-SDS and single-step in the extraction of citrus DNA for PCR analyses. *9th International Society of Citriculture Conference*, Florida/USA, p. 93, 2000.
- 20) OLIVEIRA, A. C. *et al.* Evidence of the gradient of distribution of *Xylella fastidiosa* within xylem of *Citrus* leaves. *9th International Society of Citriculture Conference*, Florida/USA, p. 150, 2000.
- 21) OLIVEIRA, A. C. & MACHADO, M. A. *In vitro* rescue of embryos of *Citrus* and identification of hybrids through morphological and molecular markers. *9th International Society of Citriculture Conference*, Florida/USA, p. 121, 2000.

C. Textos publicados em veículos de divulgação

Título: Quantificação de *Xylella fastidiosa* em plantas de citros por meio de TaqMan quantitative PCR.

Veículo: Caderno do Workshop Applied Biosystems para PCR em Tempo Real

Local: São Paulo/SP

Data da publicação: 09/05/2002

D. Projeto elaborado e aprovado em agência financiadora de pesquisa

Título do Projeto: “Mapeamento genético tangor murcote [*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis* (L.) Osb.] e laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osb. var. Pêra] para resistência a clorose variegada de citros através de marcadores moleculares” (Projeto referente à Tese de Doutorado/UNICAMP);

- Período: agosto de 1998 a julho de 2001;

- Agência financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. nº 98/06217-0).

E. Bolsas de estudo obtidas

Bolsa 1

Bolsista de Doutorado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), de agosto de 1998 a agosto de 2001.

Bolsa 2

Bolsista de Doutorado da CAPES, de setembro de 1997 a julho de 1998.