

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTABILIDADE DE QTLs LIGADOS À RESISTÊNCIA DOS CITROS A
GOMOSE, CAUSADA POR *Phytophthora parasitica***

LEONARDO PIRES BOAVA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP- Campus
Botucatu, para obtenção do título de mestre
em Agronomia – Área de concentração
Proteção de planta

BOTUCATU –SP
Junho, 2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTABILIDADE DE QTLs LIGADOS À RESISTÊNCIA DOS CITROS A
GOMOSE, CAUSADA POR *Phytophthora parasitica***

LEONARDO PIRES BOAVA

Orientador: Edson Luiz Furtado

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP- Campus
Botucatu, para obtenção do título de mestre
em Agronomia – Área de concentração
Proteção de planta

BOTUCATU –SP
Junho, 2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
UNESP - FCA - LAGEADO - BOUCATU
(SP)

B662e Boava, Leonardo Pires , 1977 –
Estabilidade de QTLs ligados à resistência dos citros a gomose, causada por *Phytophthora parasitica* / Leonardo Pires Boava. – Botucatu : [s.n] , 2004
xi, 67 f. : il. Color., gráfis., tabs.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas.

Orientador: Edson Luiz Furtado.

Inclui bibliografia

1. Planta – Resistência. 2. *Phytophthora parasitica*.
3. Biologia molecular. I. Furtado, Edson Luiz. II.
Universidade Estadual Paulista “ Julio de Mesquita Filho”
(Campus Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas.
III Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO ESTABILIDADE DE QTLS LIGADOS À RESISTÊNCIA DOS CITROS A GOMOSE, CAUSADA
POR *Phytophthora parasítica*

AUTOR: LEONARDO PIRES BOAVA

ORIENTADOR: EDSON LUIZ FURTADO

Aprovado pela Comissão Examinadora:

PROF. DR EDSON LUIZ FURTADO

PROF DR NILTON LUIZ DE SOUZA

DR MARCOS ANTONIO MACHADO

Data de realização: 25 de junho de 2004

Aos meus queridos pais, Nelson e Luiza
pelo amor e apoio recebido ao longo da
minha vida

Aos meus irmãos Nelsinho e Alex, a
Gustavo Abrão, a Joice e todos meus
amigos pelos momentos compartilhados
e que virão

A meus avós,
Sebastião (in memoriam) e Maria
Sebastião e Olivia (in memoriam)
Meus Padrinhos Valter e Zélia
E todos meus familiares

Dedico e Ofereço

AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais Nelson e Luiza pela confiança depositada, pelo exemplo de dignidade, honestidade e por todos os esforços para poderem me proporcionar todas as oportunidades ao longo da minha vida;

Ao Prof. Dr Edson Luiz Furtado pela orientação, ensinamento, incentivo e confiança depositada para realização desse trabalho, a quem tenho grande admiração;

Ao Dr Marcos Antonio Machado, pela confiança e incentivo, pela disponibilização das estruturas do centro APTA citros 'Sylvio Moreira' em todos esses anos de pesquisa e pela realização desse trabalho

A Dr Mariangela Cristofani pela colaboração, dedicação e ao imenso apoio incondicional para realização desse trabalho;

Ao Prof Dr Antonio Augusto Franco Garcia do departamento de genética da USP/ESALQ, pela orientação nas análises estatísticas;

Ao Dr Amauri Siviero que em todos esses anos na pesquisa sempre me apoiou e incentivou, a quem tenho muita estima e consideração;

Ao Dr Yodiro Masuda, professor que na graduação me despertou o interesse pela Fitopatologia com orientações e estímulos, pelo exemplo no tratamento da ciência, e também pela amizade e confiança;

Aos Professores do Departamento de Defesa Fitossanitária do curso de Proteção de Planta da UNESP/Botucatu em especial ao Professor Dr Nilton Luiz de Souza pelos ensinamentos e contribuições;

A todos amigos da V turma de Eng^o Agronomica da UFSCar e outras turmas: em especial aos amigos: Erezil, Caio(Forgado), Adriano(Feijão), Cindy, Ricardo (Pacu), Fernando, Sazon, Danilo, Bruno, aos amigos: Elton, Tavinho, Fábio (Sapo), Vanderlei, Renata, Eliana, Aline, Paula, Dameto, Claudia, Pedro e o Amigão Gustavo Abrão por toda a amizade e grandes momentos.

Aos amigos de Botucatu: César, Cassiano, Rodrigo (Negão) e Rodrigo pela amizade e acolhida.
E todos os amigos de turma do curso Proteção de Planta;

A minha querida Joice por todo seu companheirismo nos momentos felizes e difíceis, por toda compreensão e por todo o amor

A todos os pesquisadores, estagiários e funcionários do centro APTA citros 'Sylvio Moreira' em especial aos funcionários Dona Francisca, Paulo, Luiz Fernando, Beti, Vanderlei, As responsáveis pela Clínica Fitopatológica Fabiana e Grazielle aos amigos Adriana e Flávio;

A FAPESP pela bolsa concedida para realização desse trabalho e de todos os outros desde a iniciação científica pelo valioso incentivo e apoio à pesquisa;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que se tornasse possível a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Importância da cultura dos citros	5
2.2 A gomose de <i>Phytophthora</i> dos citros	6
2.3 Morfologia e isolamento do patógeno	9
2.4 Controle da gomose dos citros	10
2.5 Resistência dos citros a gomose de <i>Phytophthora</i>	12
2.6 O melhoramento dos citros	16
2.7 O uso de marcadores moleculares	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Material vegetal	22
3.2 Multiplicação e manutenção do porta-enxerto utilizado	22
3.3 Manutenção do isolado de <i>Phytophthora parasitica</i>	23
3.3.1 Isolamento e preservação de <i>P. parasitica</i>	23
3.3.2 Agressividade do isolado após sucessivas repicagens.....	24
3.4 Inoculação de híbridos e parentais visando avaliação para resistência à gomose ..	26
3.5 Mapeamento genético de regiões associadas a resistência à gomose	27

3.5.1	Análise individual dos ensaios para detecção de QTLs	27
3.5.2	Análise conjunta dos três ensaios para detecção e mapeamento de QTLs	28
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
4.1	Agressividade do isolado após sucessivas repicagens	30
4.2	Avaliação da inoculação de <i>P parasitica</i> dos híbridos e parentais	32
4.2.1	Análise dos dados da primeira época de avaliação	34
4.2.2	Análise dos dados da segunda época de avaliação	35
4.2.3	Análise da interação reação dos híbridos x épocas de avaliações	36
4.3	Análise individual de cada ensaio para detecção de QTLs	36
4.4	Análise conjunta para detecção de QTLs ligados à resistência de <i>Phytophthora</i> ...	39
4.4.1	Mapa de <i>Poncirus trifoliata</i> ‘Rubidoux’	39
4.4.2	Mapa de <i>Citrus Sunki</i>	44
5.	CONCLUSÕES	46
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
7.	APÊNDICE	59

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1. Média das áreas das lesões causadas por inoculação de <i>Phytophthora parasitica</i> submetidos a repicagens sucessivas em limoeiro Cravo e limoeiro Volkameriano.....	31
Tabela 2. Análise estatística dos dados da primeira época de avaliação de inoculação de <i>Phytophthora parasitica</i>	34
Tabela 3. Análise estatística dos dados de inoculação de <i>Phytophthora parasitica</i> do segundo ensaio	35
Tabela 4. Análise estatística dos dados de inoculação de <i>Phytophthora parasitica</i> entre as duas épocas de avaliação	36
Tabela 5. Valores encontrados para QTLs ligados a resistência a gomose, mapeados em cada avaliação (1º e 2º avaliação).....	38
Tabela 6. Análise conjunta das médias de todos os experimentos, utilizando o processo Jzmapqtl para análise de caracteres correlacionados.....	41
Tabela 7. Valores encontrados para QTLs mapeados em cada avaliação (1º e 2º avaliação e Siviero, 2001)) utilizando-se a análise conjunta.....	42
Tabela 8. Valores dos efeitos aditivos encontrados para QTLs mapeados em cada avaliação (1º e 2º avaliação) utilizando-se a análise conjunta.....	43

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Inoculação de <i>Phytophthora parasitica</i> pelo método do disco com o auxílio do furador	25
Figura 2. Inserção de disco de micélio de <i>Phytophthora parasitica</i>	25
Figura 3. Proteção do local do ferimento causado pela inoculação de <i>Phytophthora. parasitica</i> com esparadrapo.....	26
Figura 4. Lesões causadas pela inoculação de <i>Phytophthora parasitica</i> em limoeiro Cravo.....	31
Figura 5. Distribuição das médias de lesões de <i>Phytophthora parasitica</i> de híbridos e parentais na primeira época avaliação.....	32
Figura 6. Distribuição das médias de lesões de <i>Phytophthora parasitica</i> de híbridos e parentais na segunda época de avaliação.....	33
Figura 7. Histograma obtido pelos testes Shapiro-Wilk , Lilliefors e K.S mostrando a distribuição do resíduo e a curva normal esperada.....	34
Figura 08. Análise do mapa de ligação de <i>Poncirus trifoliata</i> mostrando a presença de QTLs associados a resistência à gomose de <i>Phytophthora</i> nas duas avaliações.....	37
Figura 09. Análise do grupo de ligação II de <i>Poncirus trifoliata</i> mostrando a presença de QTL associados a resistência à gomose de <i>Phytophthora</i>	38
Figura 10. Detecção de QTLs associados à resistência à gomose em mapas de ligação de <i>Poncirus trifoliata</i> ‘Rubidoux’	40

Figura 11. Detecção de QTLs associados à resistência à gomose no grupo ligação II de <i>Poncirus trifoliata</i> ‘Rubidoux’	40
Figura 12. Detecção de QTLs associados à resistência à gomose em mapas de ligação de tangerina ‘Sunki’	45

RESUMO

Phytophthora parasitica, principal causador da gomose dos citros, é um importante patógeno dos citros provocando danos em viveiros e no campo. Programas de melhoramento visando obtenção de plantas resistentes a *P. parasitica* exigem informações detalhadas sobre o tipo de herança e a localização de genes de resistência no genoma. Fontes de resistência às doenças podem ser encontradas em gêneros correlatos a citros como *Poncirus* sp. O presente estudo teve como objetivos detectar e verificar a estabilidade de marcadores moleculares e locos controladores de características quantitativas (QTLs) ligados à resistência a gomose em uma progênie F₁ obtida do cruzamento entre *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* ‘Rubidoux’. As avaliações fenotípicas de três conjuntos de dados de 3 épocas de avaliação distintas foram incorporadas às informações dos mapas de ligação estabelecidos através de marcadores moleculares do tipo RAPD. Plantas jovens foram inoculadas com o patógeno, usando o método do disco e avaliadas medindo-se o comprimento da lesão. A estratégia do ‘pseudo-testcross’ foi adotada como delineamento genético. Os QTLs foram mapeados utilizando o método do mapeamento por intervalo composto (CIM) com o programa QTLCartographer v.1.25. A partir das médias de todos os experimentos, foram identificadas 5 posições nos grupos de ligação II, III e V de *P. trifoliata* associadas à gomose de *Phytophthora*. Em 2 posições

observou-se uma correlação na detecção de QTLs para as avaliações realizadas em duas das três épocas. Demonstrado desta forma a ocorrência da interação genótipo ambiente.

Palavras-chave: porta-enxerto, gomose, mapas de ligação, marcadores moleculares, resistência a doenças.

STABILITY OF THE QTLs LINKED TO *Phytophthora parasitica* RESISTANCE ON *CITRUS*.

Botucatu, 2004. 67p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: LEONARDO PIRES BOAVA

Adviser: EDSON LUIZ FURTADO

SUMMARY

P. parasitica, is the most important main causal agent of *Citrus Phytophthora* gummosis in Brazil and hve caused damage in nurseries and orchards. Improving resistence programs to get resistant to *P. parasitica* have been detailed information about the inheritance and gene localization resistance. Source of disease resistance can be found in correlated genera like *Poncirus trifoliata*. The present study had the objective of detecting molecular markers associated to quantitative trait loci (QTL) for resistance to *Citrus Phytophthora* gummosis using F₁ lineage obtained between *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* ‘Rubidoux’ cross. Phenotypical evaluations will be incorporated in linkage maps established through RAPD molecular markers. Young plants were inoculated with *P. parasitica*, using the disc method and evaluated after one month measuring lesions length. Pseudo-testcross strategy was be used for genetic outlining. All this information were evaluated in specific genetic-statistical programs. QTLs were mapped using the method of the maps for composed interval (CIM) with the program QTLCartographer v.1.25. CIM. Starting from the average of all of the experiments, they were identified 2 positions in the group of connection II of *P. trifoliata* associated with gomose of *Phytophthora*. In each area a correlation was observed in the detection of QTLs for the evaluations accomplished in two of the three times. Demonstrating the interaction genotype with environment conditions in the expressions

Key-words: *Citrus* rootstocks, gummosis, linkage maps, disease resistance, molecular markers.

1. INTRODUÇÃO

Estudos internacionais indicam que o agronegócio, em especial a fruticultura, representa, maior produtividade agrícola, pois cada hectare de fruticultura produz 5 a 20 vezes mais que as culturas tradicionais de grãos e cereais; maior renda, favorecendo os pequenos e médios produtores rurais por agregar a mão-de-obra feminina no campo ampliando a renda familiar; geração de emprego fora das capitais reduzindo o êxodo rural e maior aproveitamento do pessoal de baixa qualificação; reorganização do setor agrícola, através de programas de parceria visando atingir o conceito de agronegócio e expansão de cadeia produtiva e geração de receita tributária e divisas para o país (Meirelles, 1999).

A cadeia citrícola pode ser considerada como um dos segmentos mais globalizados do agronegócio brasileiro. Com grande parte de sua produção voltada para o mercado externo, a cadeia trouxe, em 2002, mais de 1 bilhão de dólares em divisas para o Brasil, sendo um dos principais produtos na pauta de exportação. A agroindústria brasileira detém a liderança mundial na produção de suco de laranja concentrado congelado, representando mais de 80% das exportações mundiais (Marino et al., 2003).

Apesar da grande variabilidade genética existente entre os citros e outros gêneros da família Rutaceae, o melhoramento genético tradicional tem apresentado limitações à obtenção de novas variedades de porta-enxerto e copa. As primeiras barreiras encontradas pelos melhoristas de citros estão relacionada à sua complexa biologia, podendo-se destacar a poliembrionia nucelar (apomixia), elevada heterozigose, auto e interincompatibilidade e longa juvenilidade (Mourão, 1996).

Segundo Cristofani & Machado (1998), sementes de citros são utilizadas para propagação clonal de porta-enxerto pois a maioria dos embriões se desenvolve através de embriões nucelar celular. A proporção de embriões zigóticos depende do cultivar e das condições de polinização. Para os trabalhos de melhoramento genético, a ocorrência de embriões zigóticos é fundamental, ao passo que para a produção de mudas de porta-enxerto, a produção de plantas uniformes idênticas a planta matriz é a condição desejada.

Os programas de melhoramento de citros têm como principais objetivos selecionar genótipos superiores associando características de interesse agrônomo, adaptação edafoclimática e incorporação de genes de resistência às pragas e doenças. Com relação ao cultivar porta-enxerto, além destas, a seleção de genótipos superiores é dirigida para resistência de doenças e pragas, haja visto que hoje existem descritas mais de 35 doenças de importância econômica na cultura de citros entre as quais se destaca a gomose de *Phytophthora*, causada por *Phytophthora* spp. (Whiteside et al., 1996). Estima-se que os danos provocados por organismos do gênero *Phytophthora*, em citros, seja de 10 a 30 % da produção citrícola mundial atingindo perdas avaliadas em US\$4 bilhões anualmente (Erwin & Ribeiro, 1996).

A gomose de *Phytophthora* ocorre em todas as regiões produtoras de citros do globo. No Brasil ela se constitui numa das mais importantes doenças dessa cultura. Atualmente 13 espécies de *Phytophthora* estão associadas aos citros, cinco das quais foram relatadas na América do Sul. De todas as espécies de *Phytophthora* relatadas em citros, apenas três, *P. parasitica*, *P. palmivora* e *P. citrophthora*, estão identificadas como causadoras da maioria de doenças do complexo *Citrus-Phytophthora* (Erwin & Ribeiro, 1996). *Phytophthora* spp. é capaz de infectar vários órgãos de planta cítrica, induzindo doenças que, dependendo do órgão da planta afetado ou de seu estado fenológico, recebem denominações distintas. Das várias manifestações da doença já descritas, a gomose de *Phytophthora* (podridão do pé, podridão de radículas/raízes, mal do pé e gomose) é uma das mais comuns. No Estado de São Paulo, *P. parasitica* é a espécie de *Phytophthora* de maior ocorrência, causadora de diversas doenças em citros em viveiros e pomares comerciais sendo a principal a gomose de *Phytophthora* (Feichtenberger, 1996).

As medidas preventivas como: plantio em solos bem drenados, evitar plantio fundo, evitar acúmulo de água no solo, evitar excesso de adubação nitrogenada e

matéria orgânica no solo, controle químico e promover boa aeração do solo são de fundamental importância para o controle da gomose de *Phytophthora*. No entanto, o emprego de genótipos resistentes/tolerantes é o método ideal de controle ao patógeno (Whiteside et al., 1996).

A diversificação de porta-enxertos na citricultura brasileira é uma necessidade, sendo que mais de 85% das plantas cítricas estão assentadas sobre o porta-enxerto de limoeiro ‘Cravo’ (*Citrus limonia*) (Pompeu Junior, 1991). Esta realidade é um risco aos citricultores quando se recorda a catástrofe dos anos quarenta com a chegada do vírus da tristeza dos citros (CTV) ao Brasil que dizimou milhões de plantas assentadas sobre o porta-enxerto laranja ‘Azeda’ (*Citrus aurantium*).

Com o advento dos marcadores moleculares tornou possível a construção de mapas genéticos para um grande número de espécies de plantas anuais e perenes. A construção de tais mapas é a base para estudos avançados de genéticas, além de possibilitar a localização de marcadores flanqueando genes de interesse agrônomico. Tais marcadores são potencialmente úteis aos programas de melhoramento pois permitem a identificação de características desejadas sem a necessidade de se empregar métodos clássicos de avaliação e seleção para resistência a doenças, por exemplo. Permitem também a seleção precoce de características que somente irão se expressar no estágio adulto das plantas (Tanksley et al., 1989).

O estudo de marcadores moleculares ligados a QTLs (Quantitative Trait Loci) associado ao uso de mapas genéticos permite identificar, mapear, quantificar o efeito dos QTLs e sua estabilidade. A eficiência na detecção de QTLs depende do número de QTLs, magnitude do seu efeito, herdabilidade da característica, interações entre os genes, tipo e tamanho da população segregante, tamanho do genoma, frequência de recombinação entre o QTL e o marcador e saturação de mapas genéticos (Tanksley, 1993; Young, 1996).

Siviero (2001) identificou quatro QTLs associados à resistência a gomose de *Phytophthora* dos citros, em uma progênie do cruzamento *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* ‘Rubidoux’, sendo três localizados em grupos de ligação I, II e V no mapa de *Poncirus trifoliata* ‘Rubidoux’ e um QTL no grupo de ligação II no mapa de *Citrus sunki*, indicando a natureza quantitativa da doença. Os QTLs detectados são responsáveis por 14, 60

e 17% da variação fenotípica de *Poncirus trifoliata* ‘Rubidoux’ a gomose dos citros, e 18% da variação fenotípica de *C. sunki* ao patógeno.

O ambiente exerce influência na avaliação fenotípica de características, principalmente, quando se tratam de caracteres quantitativos. As estratégias para eliminar este efeito seriam conduzir ensaios em diferentes ambientes tentando comprovar a estabilidade de expressão ou aumentar números de indivíduos da população segregante, ambas de alto custo. A detecção de QTLs pode ser feita considerando-se separadamente os ambientes ou em conjunto através de análise integrada dos dados nos diversos ambientes. O presente estudo teve como objetivo mapear e avaliar a estabilidade de QTLs ligados à resistência a gomose dos citros em uma progênie de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* ‘Rubidoux’, utilizando mapas de ligação previamente obtidos por Critofani et al. (1999) e Siviero (2001).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da cultura dos citros

O gênero *Citrus* pertence a subtribo *Citrinae*, tribo *Citreae*, sub-família *Aurantioideae* da família *Rutaceae*. Este gênero também contém espécies do sub-gênero *Papeda*, que não apresenta frutos comestíveis. Além dos citros, a subtribo *Citrinae* apresenta mais 12 outros gêneros dividido em três grupos, o grupo dos “citros primitivos” (*Severinia*, *Pleiospermium*, *Burkillanthus*, *Limnocitrus* e *Hesperathusa*), o grupo dos gêneros “próximos a citros” (*Citropsis* e *Atalania*) e o grupo dos “citros verdadeiro” que inclui o gênero *Citrus* e cinco outros gêneros: *Eremocitrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus* e *Cymenia*. Na grande maioria das espécies de *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* o número de cromossomo é $x=9$, sendo a diploidia ($2n=18$) a condição normal nesse grupo de plantas.

Fertilidade do solo, clima, irrigação, combinação copa/porta-enxerto e os problemas fitossanitários, principalmente doenças são os principais fatores que afetam a produção de citros. O porta-enxerto induz características importantes à copa como produtividade, qualidade dos frutos, resistência à seca, salinidade e ao frio, resistência/tolerância às pragas e doenças (Castle et al., 1993).

O primeiro porta-enxerto utilizado em grande escala no Brasil foi a laranja ‘Caipira’ que foi substituído pela laranja ‘Azeda’ que é resistente a gomose, no entanto, altamente suscetível à tristeza. Na década de 40, o aparecimento da tristeza forçou a

substituição da laranja ‘Azeda’, para o limoeiro ‘Cravo’, ‘Rugoso’ e ‘Lima da Pérsia’. Na década de 70 o aparecimento do declínio, que incide mais fortemente sobre plantas cítricas enxertadas sobre o limoeiro ‘Cravo’, promoveu uma tímida diversificação do ‘Cravo’ para tangerinas ‘Sunki’ e ‘Cleópatra’, que apresentam tolerância ao declínio, no entanto, são suscetíveis a *Phytophthora* spp. (Pompeu Júnior, 1991; Feichtenberger, 2001). Recentemente, a morte súbita dos citros, uma nova doença de agente causal ainda desconhecido, tem afetado alguns pomares em plantas enxertadas em limoeiro ‘Cravo’ (Gimenes-Fernandes & Bassanezi, 2001). O que fica claro que evolução histórica do uso de porta-enxertos na citricultura brasileira está diretamente ligada a ocorrência das doenças como: gomose, tristeza, nematóides, declínio e morte súbita.

A citricultura brasileira está centrada praticamente em um único porta-enxerto, o limoeiro ‘Cravo’, que é utilizado em cerca de 90% das plantas cítricas do país. Com o avanço da área citrícola para a região sul do Estado de São Paulo onde se observam maiores índices pluviosidade, portanto áreas mais úmidas e mais favoráveis ao desenvolvimento de doenças provocadas por *Phytophthora* spp., os produtores têm preferido utilizar o porta-enxerto citrumelo ‘Swingle’, que é altamente resistente a gomose, mas, no entanto, incompatível com a laranja ‘Pêra’ a principal cultivar-copa cultivada no país (Teófilo Sobrinho, 1991).

2.2 A gomose de *Phytophthora* dos citros

Existem descritas mais de 35 doenças de importância econômica que afetam a cultura de citros. Dentre elas destaca-se a gomose, causada por *P. parasitica*. O agente causador da gomose está difundido em todas as regiões citrícolas do mundo provocando elevados custos na proteção e controle em viveiros e no campo (Timmer et al., 2000). Segundo Fawcett (1923), os primeiros relatos de doenças em plantas cítricas com sintomas parecidos com sintomas de gomose no mundo foram realizados em 1646 na Itália. No entanto, a primeira epidemia de grande importância foi relatada na Ilha de Açores, em 1834. Na América do Norte, a doença foi primeiramente relatada na Califórnia em 1875. No

Brasil, a gomose foi primeiramente relatada no início do século passado por Aversa-Saccá (1917) que foi descrita como causada por *Bacterium gummes*.

A gomose, causada por *P. parasitica*, é uma das principais doenças dos citros e ocorre em todas as regiões citrícolas do mundo. Estima-se que os danos provocados por *Phytophthora* em citros sejam de 10 a 30 % da produção mundial proporcionando prejuízos de milhões de dólares por ano (Timmer et al., 2000). Onze espécies de *Phytophthora* estão associadas ao complexo de doenças *Phytophthora* - citros (Erwin & Ribeiro, 1996), cinco das quais já foram relatadas na América do Sul (Fawcett & Bitancourt, 1940).

Algumas mudanças na micologia e na classificação de fungos foram promovidas devido aos avanços da biologia molecular, química e bioquímica. Organismos do Filo Oomycota, pertencentes ao antigo Reino Fungi, foram transferidos para um novo Reino denominado Chromista. Com esta modificação, o gênero *Phytophthora* assim como outros de grande interesse fitopatológico como *Pythium*, *Peronospora* e *Plasmopora* não são mais considerados “fungos verdadeiros” (Hawksworth et al., 1995). Agrios (1997) segue a classificação adotada por Hawksworth et al. (1995) e denomina *Phytophthora* de pseudofungo ou ‘chromistan fungallike’.

De todas as espécies de *Phytophthora* relatadas em citros apenas duas, estão identificadas como causadoras da maioria das doenças do complexo *Phytophthora* - citros, *P. citrophthora* (R.E. Smith. & E.H. Smith.) Leonian. e *P. nicotianae* (Breda de Haan) (Tucker) var. *parasitica* (Dastur) Waterh. (sinonímia de *P. parasitica*), provocando prejuízos da ordem de milhões de dólares no mundo (Erwin & Ribeiro, 1996). *Phytophthora. citrophthora* é mais adaptada a regiões de clima frio, sendo patogênica a mais de 83 hospedeiros, sendo os citros o principal hospedeiro. Em citros, *P. citrophthora* causa importantes doenças nas raízes e parte aérea, incluindo-se os frutos em regiões de clima mediterrâneo. *Phytophthora parasitica*, ocorre mais frequentemente em regiões quentes e subtropicais do mundo, sendo descrita atacando mais de 400 espécies de plantas ataca principalmente as raízes e radículas sendo menos freqüente na parte aérea das plantas.

Boava et al. (2001) avaliaram a patogenicidade de *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* em diferentes porta- enxertos de citros e verificaram que a reação resistências/suscetibilidade não foi diferente entre eles, mas

Phytophthora citrophthora se mostrou mais patogênico que *Phytophthora parasitica* quando comparadas as lesões ocasionadas.

São reconhecidas outras espécies de *Phytophthora* em citros de importância secundária, provocando ataques ocasionais como: *P. palmivora* (Butler) E. J. Butler que é altamente patogênica às raízes dos citros em solos da Florida (EUA) e está associada a infecções da parte aérea em regiões úmidas. *Phytophthora citricola* Sawada ocorre atacando frutos em regiões quentes como Mediterrâneo, Austrália, Brasil e finalmente, *P. hibernalis* Carne e *P. syringae* (Kleb.) Kleb. que causam gomose severa e podridão parda em frutos de tangerinas e laranja-doce em regiões frias e úmidas, respectivamente (Broadbent, 1977; Erwin & Ribeiro, 1996; Timmer et al., 2000).

Feld et al., (1990) ressaltaram que a alta umidade relativa do ar e a alta temperatura são condições favoráveis para o desenvolvimento da doença, no entanto, extremos de temperatura podem ocasionar redução na infecção. A faixa de temperatura ideal para o desenvolvimento de lesões é de 10-20°C e 15-25°C para *P. citrophthora* e *P. parasitica*, respectivamente. Os solos pesados e mal drenados, métodos de irrigação por superfície como sulco e aspersão, podem aumentar o desenvolvimento da doença. Condições de baixa oxigenação, comum em solos argilosos favorecem o apodrecimento do sistema radicular das plantas em viveiro e no campo e dificultando o processo de regeneração de raízes e radículas atacadas por *Phytophthora* spp. A presença de outros patógenos como viroses, espécie do patógeno e o estado de vegetação também são fatores que influenciam o desenvolvimento da gomose.

O cultivar copa exerce influência na resistência do cultivar porta-enxerto a gomose. Brieger & Moreira (1945) constataram que a laranja 'Pêra', quando enxertada sobre o limoeiro 'Cravo' confere certa 'resistência' ao porta-enxerto em relação a gomose. A influência da cultivar-copa afetando a suscetibilidade do porta-enxerto foi relatada por Klotz et al. (1958), observando que o desenvolvimento de lesões provocadas por *Phytophthora* no porta-enxerto laranja doce foram maiores em limão 'Lisboa' do que em laranja 'Bahia', quando usados como copa.

Os principais sintomas da gomose no campo são: morte de tecidos internos da casca e do lenho quando removida a casca na região do tronco da planta; formação de calo nas bordas das lesões; exsudação de goma; seca e fendilhamento da casca; podridão do

pé, raízes e radículas; amarelecimento uniforme e progressivo de folhas; baixo desenvolvimento de folhas novas, murcha e queda de folhas e morte da planta (Timmer et al, 2000). Ferimentos físicos, químicos e outros patógenos dos citros provocam sintomas parecidos com aqueles da gomose de *Phytophthora* em viveiros e no campo gerando e diagnósticos incorretos.

2.3 Morfologia e isolamento do patógeno

Segundo Graham & Timmer (1992) os esporângios e zoósporos (esporos dotados de flagelos que conferem mobilidade) são os principais responsáveis pela infecção e pelo rápido desenvolvimento da doença, sendo capazes de germinar em água livre e infectar a planta quando atraídos por exsudados das raízes e radículas da planta, e são mais predominantes no solo no verão. Os oósporos e, principalmente, os clamidósporos, são as mais importantes estruturas de sobrevivência do patógeno, atuando como inóculo primário de infecção encontrados no solo principalmente no inverno (Lutz & Menge, 1991).

Métodos morfológicos, moleculares e pela curva de crescimento ‘in vitro’ em diferentes temperaturas pode ser usado para diferenciação das espécies de *Phytophthora* associadas a gomose dos citros. Isolados de *P. parasitica* crescem em temperaturas superiores a 35°C, sendo o ótimo entre 30-32°C, enquanto que isolados de *P. citrophthora* não apresentam crescimento à 35°C, possuindo crescimento ideal entre 24 a 28°C. A maioria dos isolados de *P. citrophthora* não produz clamidósporos em meio de cultura (Erwin & Ribeiro, 1996; Timmer et al., 2000).

O diagnóstico preciso de *Phytophthora* do solo e das raízes de citros pode ser realizado pelo teste imunológico de ELISA ‘Enzyme-linked immunosorbent assays’ com anticorpos mono e policlonais (Timmer et al., 1993), ou com uso de sondas específicas de DNA de *Phytophthora* que são capazes de identificar *Phytophthora* ao nível de espécie (Goodwin et al., 1989).

O isolamento de *Phytophthora* spp. das raízes, radículas, casca infectada e solo em meio de cultura (batata – dextrose - agar) não é uma tarefa simples devido ao aparecimento de grande número de contaminantes. Os meios de cultura específicos

recomendados para isolamento de *Phytophthora* de tecido vegetal infectado e do solo são complexos, exigem antibióticos e reagentes, tornando-se caros e trabalhosos (Tsao & Ocana, 1969; Broadbent, 1977).

O patógeno é mais facilmente isolado, indiretamente, usando frutos cítricos artificialmente infectados com os discos de folhas usados na detecção pelo método da isca (Grimm & Alexander, 1973) com secções de casca com pedaços de raízes infectadas com o patógeno (Fawcett, 1923). A técnica consiste em inocular os discos de folha, casca e raiz infectados na região do albedo do fruto de limão verdadeiro (*C. limon*) que atuará como filtro de agentes contaminantes. Os frutos são incubados em alta temperatura e umidade até que $\frac{3}{4}$ do fruto esteja doente, tempo necessário para patógeno atingir as sementes. As sementes contaminadas são então assepticamente seccionada em pedaços, com auxílio de bisturi e transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura cenoura-agar. Após 24 a 72 horas observa-se o micélio do patógeno colonizando o meio de cultura a partir dos pedaços de sementes de limão (Erwin & Ribeiro, 1996).

As diferenças na patogenicidade de espécies *Phytophthora* são conhecidas há muito tempo (Klotz & Fawcett, 1930; Klotz et al., 1958). As lesões de tronco são em geral maiores quando se inocula *P. citrophthora*. No entanto, são encontradas variações nos tamanhos das lesões provocadas por *Phytophthora* dentro de cultivares e entre plantas de mesma cultivar, para um mesmo isolado inoculado (Mello et al., 1971). Rossetti & Bitancourt (1951) detectaram variação da patogenicidade de isolados de *Phytophthora* e recomendaram que o patógeno a ser empregado nas inoculações experimentais tenha sua patogenicidade reativada, inoculando o patógeno em frutos cítricos seguido de re-isolamento.

2.4 Controle da gomose dos citros

Existem determinadas medidas preventivas que são de fundamental importância para evitar o surgimento desta doença, como efetuar o plantio em solos bem drenados, evitar plantio fundo, evitar acúmulo de água junto à base da planta, evitar excesso de adubação nitrogenada e/ou orgânica pesada junto a base do tronco, promover aeração da parte inferior, restringir uso de grades pesadas, evitar qualquer ferimento na planta, adoção de

medidas de exclusão como escolha do local de plantio, plantio de mudas saudáveis, inspeções, tratamento da água de irrigação, desinfestação de implementos e ferramentas, instalação de rodolúvios e pedilúvios na propriedade, promover o arejamento do colo das plantas através da remoção física do solo, quebra-ventos, manejo adequado do mato, cirurgia entre outras. O ácido fosforoso e seus derivados, produtos registrados no Brasil como fertilizantes em plantas cítricas têm sido usados com certo sucesso no campo por produtores no controle da gomose em pulverizações (Feichtenberger & Travel, 1999). A forma química de atuação destes produtos nas plantas, ação ‘fungistática’ ou ‘fungicida’ reduzindo o tamanho de lesões de *Phytophthora* spp., ainda é muito discutida (Schutte et al., 1991).

Segundo Amorim (1997), o controle biológico de *Phytophthora* spp. foi efetivo com o uso de rizobactérias *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. As bactérias apresentaram antagonismo em relação a *Phytophthora* spp. via produção de substâncias tóxicas e competição por ferro. Alguns isolados do fungo *Trichoderma* spp. apresentam hiperparasitismo ‘in vitro’ e foram eficientes na erradicação do patógeno em substratos usados para produção de mudas de citros. May (1994) observou efeito de *Trichoderma* spp. no controle de *P. parasitica* em mudas de citros. Tsao et al. (1996) relataram pelo menos cinco fungos como potenciais antagonistas capazes de inibir espécies de *Phytophthora* associadas às doenças dos citros, destacando ainda que a germinação, esporulação e a sobrevivência de *P. parasitica* no solo foram drasticamente reduzidos com a adição de dejetos animais, restos culturais de plantas e outras substâncias orgânicas ricas em nitrogênio.

O controle físico de patógenos de solo pode ser feito via fumigação ou vapor. No entanto, estes métodos são de alto custo, aplicável em pequenas áreas, exige equipamento e mão de obra especializada além do alto risco de reinfestação (Siviero, 2001). Hough et al. (1979) estudaram estratégia de controle físico do patógeno no campo via tratamento térmico das lesões e conseguiram inativar *P. parasitica* à 60°C impedindo o crescimento das lesões. A remoção física de partes da casca infectada com *Phytophthora* sp., pode ser aplicada em pomares caseiros e no campo em pequenas áreas devido ao seu custo. A prática consiste em remover partes doentes do tronco com instrumento cortante expondo a lesão e posterior aplicação de fungicidas de contato na área exposta.

O controle genético da gomose, via utilização de porta-enxerto resistente ou tolerante ao patógeno, é a medida mais eficiente no combate à doença, em

viveiros e no campo (Averna-saccá, 1917). A utilização da resistência genética é a medida de controle mais indicada, por ser de menor custo, facilmente exequível e por reduzir o impacto de fungicidas no ambiente. May (1994) e Feichtenberger (2001) salientam que o emprego dos diversos métodos de controle de *Phytophthora* em citros, via adoção conjunta das medidas de controle (manejo integrado), é a melhor estratégia no combate à doença.

2.5 Resistência dos citros a gomose de *Phytophthora*

Segundo Siviero (2001), embora a literatura esteja repleta de trabalhos envolvendo a identificação e caracterização de genótipos resistentes e suscetíveis a *Phytophthora* spp, nota-se uma escassez de estudos relacionados à herança da resistência a gomose. Hutchison (1985) destaca que os estudos de herança da resistência a doenças e para outros caracteres em citros praticamente são raros devido ao tempo de geração (7 a 10 anos), esterilidade, heterozigosidade e o tipo de reprodução. O mesmo autor descreve que no caso específico de resistência a *Phytophthora* spp. a herança é complexa, de natureza quantitativa e governada por múltiplos genes.

Laville (1975), analisando diversos trabalhos de citros x resistência varietal sugeriu que há uma superposição de mecanismos de resistência a *Phytophthora* relatando haver duas categorias de herança de resistência uma do tipo oligogênica e outra do tipo poligênica. O controle genético da resistência monogênica normalmente envolve uma relação do tipo gene-a-gene, na qual o produto de um gene de avirulência do patógeno é reconhecido pelo produto do gene de resistência do hospedeiro, que desencadeia uma resposta de resistência na planta. No entanto, há casos de resistência horizontal ou quantitativa, de característica oligo ou poligênica (Cervera et al., 1996).

A defesa física ou estrutural das plantas a *Phytophthora* é bastante conhecida. A camada de suberização dos tecidos da casca dos citros é o mais importante mecanismo de resistência natural da planta à infecção de *Phytophthora* e uma vez rompida a barreira estrutural, via ferimento físico ou químico, a resistência é automaticamente ‘quebrada’ (Fawcett, 1923; Klotz et al., 1968). Whiteside (1971) provou que o patógeno necessita de ferimento para penetrar na planta e provocar infecção.

Vernenghi et al. (1987) reportam que a substância do grupo das coumarinas, derivada de compostos de ácidos fenólicos, denominada sesalina, foi sintetizada em raízes do limoeiro rugoso em resposta a infecção de *Phytophthora* spp. e inibiu o desenvolvimento do patógeno. Desta forma, a sesalina, comportou-se como uma fitoalexina, nome empregado aos compostos de defesa bioquímica formado nas plantas em resposta à infecção por fitopatógenos (mecanismo pós-infeccional). Afek & Sztejberg (1989) relataram que a substância denominada escoparone, uma fitoalexina do grupo das coumarinas, está associada à resistência bioquímica a *Phytophthora* e que o escoparone, um derivado de compostos fenólicos pós-formado, acumula em maior quantidade nos tecidos de cultivares resistentes a *Phytophthora*. Sulistyowaty et al. (1990) demonstraram que a produção de escoparone é mais rápida em genótipos resistentes como, citrange 'Troyer' (*P. trifoliata* vs. *C. sinensis*), quando comparada com genótipo suscetível, limão rugoso (*C. aurantium*). A biossíntese do escoparone e seu modo de ação semelhante as fitoalexinas em plantas foram confirmados no controle de *Phytophthora* em frutos de citros por Ortuño et al. (1997). A salinidade do solo é um fator que predispõe plantas a infecções de *Phytophthora* spp. e atua reduzindo a acumulação de escoparone nos tecidos das plantas (Blaker et al., 1986).

Broadbent (1977) exclui a resistência morfológica como mecanismo de resistência em radículas e afirma que a resistência a *Phytophthora* está associada a fatores bioquímicos ou fisiológicos existentes entre os genótipos resistentes e suscetíveis. Os trabalhos de Wildmer et al. (1998) confirmam as hipóteses levantadas por Broadbent (1977) e acrescentam que o fator tolerância presente em muitos genótipos atua na inibição do crescimento de *Phytophthora* nos tecidos da planta.

Uma grande variabilidade na resistência a gomose tem sido observada entre genótipos usados como porta-enxertos, em condições de infecção natural bem como sob inoculação artificial. A resistência de espécies e cultivares cítricas a *Phytophthora* spp. foi estudada desde o início do século 20 (Averna-Saccá, 1917). No caso específico da doença denominada, podridão de raízes e/ou radículas os porta-enxertos são classificados como tolerantes e não tolerantes com relação reação a *Phytophthora*. Nesse caso, a tolerância do porta-enxerto está relacionada diretamente à sua capacidade de emitir novas raízes/radicelas frente ao ataque do patógeno no solo, ou pela limitação da conversão de propágulos do

patógeno em infecções devido ao mecanismo bioquímico de plantas resistentes (Graham, 1995).

No Brasil, um dos trabalhos pioneiros no estudo da resistência de espécies e cultivares a *Phytophthora* spp. foi realizado por Rossetti (1947). Feichtenberger et al. (1992) apresentaram uma ampla revisão dos trabalhos desenvolvidos no Brasil envolvendo e resistência varietal de citros e gêneros correlatos à *Phytophthora* spp. Sucessivos trabalhos relatados nesta área foram desenvolvidos em todas as partes do mundo: Austrália (Broadbent & Gollonow, 1993); China (Zhu et al., 1991); Venezuela (Rondon et al., 1993). A literatura nacional e internacional acusa uma série trabalhos envolvendo a reação de resistência de genótipos usados como porta-enxertos para citros em relação a gomose.

Muitos fatores estão envolvidos na resistência/tolerância de citros a *Phytophthora* spp. entre os quais se destacam: ambiente (Fawcett, 1923); espécie e isolado do patógeno (Klotz et al., 1958; Grimm & Whidden, 1962); presença ou ausência de outros patógenos na planta (Mello et al., 1971), método de inoculação e avaliação empregado (Grimm & Hutchison, 1973); estado de vegetação do hospedeiro e da própria cultivar-copa (Rossetti & Bitancourt, 1951; Ippolitto et al., 1996), idade da planta e aspecto nutricional (Broembsen & Deacon, 1997), salinidade do solo e pH do solo (Blaker & McDonald, 1986), grau de dormência da planta, suculência e vigor dos tecidos e o tipo da doença em estudo (gomose ou podridão de radículas) (Carpenter & Furr, 1962).

A resistência múltipla de porta-enxerto de citros às doenças causadas por *Phytophthora* spp., aos nematóides dos citros e ao vírus da tristeza dos citros (CTV) pode ser encontrada em *P. trifoliata*. No entanto, a herança da resistência pode se dar de forma independente para os patógenos. A combinação de caracteres desejáveis como: compatibilidade porta-enxerto/copa, problemas de adaptação ao solo e resistência às doenças dos citros reunidos num só cultivar comercial é quase impossível, no entanto, a adoção de técnicas simples e precoce de avaliação de caracteres, associada ao uso de marcadores moleculares pode viabilizar o desenvolvimento de porta-enxertos promissores para citros (Broadbent & Gollonow, 1993).

Segundo Siviero (2001), a avaliação da resistência de porta-enxertos de citros a *Phytophthora* spp. em grande número de materiais, dentro de programas de melhoramento, exige a adoção de métodos de inoculação artificial e avaliação rápidos e

eficientes além de permitir boa repetibilidade e correlação com as infecções naturais no campo. A escolha da metodologia de inoculação de *Phytophthora* spp. depende do objetivo do trabalho com a doença alvo, do inoculador, parte da planta em estudo e espécie da planta e do patógeno.

Vários métodos de inoculações de *Phytophthora* têm sido descritos, como por exemplo; inserção de discos de micélio do patógeno oriundos de bordas das lesões de colônias em plantas adultas no campo (Klotz & Fawcett, 1930; Rossetti, 1947); uso de suspensão de zoósporos do patógeno em solo inoculando mudas (Graham, 1995; May, 1999); inserção de discos de micélio do patógeno em ramos e haste de mudas de citros (Afek & Sztejberg, 1990); introdução de palito de dente, previamente contaminado com o patógeno, nas hastes das plantas (Aguillar-Vildoso & Pompeu Jr., 1997). Rossetti (1947) estudando a suscetibilidade de porta-enxertos a gomose usou o método da incisão inoculando discos de micélio em plantas no campo. O método da incisão foi primeiramente utilizado na avaliação de genótipos de citros nos EUA em 1912, por Fawcett (1923) o qual conseguiu reproduzir sintomas da doença a partir de inoculações usando pedaços de tecido vegetal infectado com *Phytophthora* ou de cultura pura.

Grimm & Hutchison (1973) adotaram uma escala de notas de 1 a 5 para avaliação de gomose em inoculações de hastes de plantas jovens considerando a área de anelamento lesionada. Smith et al. (1987) propuseram uma escala diagramática para avaliação de gomose, modificada de Grimm & Hutchison (1973), que prevê notas de quantidade de doença que variam de 0 a 5, levando-se em consideração principalmente à porcentagem de anelamento provocado pelo patógeno nas hastes inoculadas, formação de calos em torno da lesão e a extensão da lesão. Smith et al. (1987) avaliaram a resistência de cultivares de laranja doce e diversos porta-enxertos a *Phytophthora* e concluíram que o método do disco apresenta maior potencial de inóculo se comparado com métodos que utilizam zoósporos ou clamidósporos, pois apresentou lesões de tamanho maior em inoculações experimentais. Carvalho (2000) avaliando as infecções de tronco provocadas por *Phytophthora* em híbridos de citros utilizou medidas do comprimento e largura da lesão para o cálculo da área lesionada pelo patógeno. Para avaliação da tolerância de genótipos à podridão de raízes o mesmo autor empregou a taxa de redução de radículas medindo sobrevivência, vigor e aspecto geral das plântulas inoculadas, comparando-as com as sadias.

2.6 O melhoramento dos citros

Apesar da grande variabilidade genética existente entre os citros e outros gêneros da família Rutacea, o melhoramento genético tradicional tem apresentado limitações à obtenção de novas variedades porta-enxerto e copa. As primeiras barreiras encontradas pelos melhoristas de citros estão relacionada à sua complexa biologia, podendo-se destacar poliembrionia nucelar (apomixia), elevada heterozigose, auto e interincompatibilidade e longa juvenilidade (Mourão,1996).

Segundo Cristofani & Machado (1998) sementes de citros são utilizadas para propagação clonal de porta-enxerto pois a maioria dos embriões se desenvolve através de embriões nucelar. A proporção de embriões zigóticos depende do cultivar e das condições de polinização. Para os trabalhos de melhoramento genético, a ocorrência de embriões zigóticos é fundamental, ao passo que para a produção de mudas de porta-enxerto, a produção de plantas uniformes idênticas a planta matriz é a condição desejada. O método de separação de híbridos nucleares de zigóticos pode ser realizado visualmente quando se usa o parental *P. trifoliata* que possui o marcador genético morfológico característico de folha trilobada, via isoenzimas (Moore & Castle, 1988) e por meio de marcadores moleculares tipo RAPD (Cristofani et al., 1996).

Boava et al. (2003) utilizando a técnica de marcadores moleculares do tipo microssatélites (SSR) para identificar embriões zigóticos, associou com método de inoculação de *Phytophthora parasitica* em citros para explicar a variação de resultados experimentais, e observou uma influências de plantas zigóticas nos resultados experimentais de reação de resistência/suscetibilidade a gomose de *Phytophthora*.

A heterozigosidade está presente no gênero *Citrus* revelando uma origem através de hibridação interespecífica. No entanto, observa-se também em alguns genótipos de citros baixos níveis de heterozigosidade, como ocorre em *C. sunki*, *C. reshni* e *C. myrtifolia* sugerindo que a autofecundação também teve importante papel na sua origem e evolução. Os altos níveis de heterozigose na maioria dos locos, permite maior identificação de marcadores polimórficos úteis na construção de mapas. O cruzamento entre duas plantas pode ser realizado e a progênie F₁ obtida é geneticamente heterogênea, segregando 1:2:1 ou 3:1

quando ambos os genitores forem heterozigotos e diplóides (com marcadores co-dominantes e dominantes, respectivamente) ou segregando 1:1, se um deles for heterozigoto e o outro homozigoto (com marcadores dominantes ou co-dominantes) (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

A juvenilidade é o fato das plantas originadas de sementes apresentarem hábito de crescimento inicial lento, no entanto, vigoroso, maior sanidade e quantidade de espinhos quando comparadas a plantas propagadas assexuadamente por diversos ciclos reprodutivos. As plantas obtidas via enxertia apresentam crescimento rápido nos primeiros anos, precocidade e uniformidade na produção de frutos (Castle et al., 1993).

Segundo Siviero (2001), em um programa de melhoramento genético vegetal clássico que visa a incorporação de genes de resistência a doenças é de fundamental importância o conhecimento do tipo de herança dos fatores genéticos envolvidos na relação planta-patógeno. O estudo do modo de herança genética somente é possível por meio de hibridação entre parentais contrastantes para a característica em estudo e análise da segregação para o caráter nas progênes das gerações F_1 , F_2 , ..., F_n . O número de indivíduos e gerações a serem avaliados depende do objetivo do trabalho de melhoramento e da natureza da herança da resistência envolvida pelo caráter (qualitativa ou quantitativa). O processo de seleção de novos indivíduos pode se tornar trabalhoso, caro e lento se a base genética da interação patógeno-hospedeiro for desconhecida.

As freqüentes mutações somáticas e a grande plasticidade fenotípica dos citros, influenciada pelas condições de ambiente podendo expressar fenótipos distintos, contribuem ainda mais para dificultar os trabalhos de genética e melhoramento da espécie (Cameron & Frost, 1968).

Entre as combinações de parentais interespecíficas a hibridação entre *C. sunki* vs. *P. trifoliata* é uma das mais exploradas, devido às suas características contrastantes para diversos fatores entre eles a resistência às doenças (Matheron et al., 1998; Carvalho, 2000). A nomenclatura botânica sugerida para este cruzamento é citrandarin [*P. trifoliata* - citros vs. *C. reticulata* - mandarin] (Davies & Albrigo, 1994).

O porta-enxerto denominado *C. sunki* Hort. ex. Tanaka é originado do sudeste da China sendo indicado como porta-enxerto para laranjas, tangerinas e pomelos, possui diversas características desejáveis, como comportamento semelhante à tangerina

‘Cleópatra’ no tocante a formação de copa, tolerância à tristeza, xiloporose, sorose, declínio, tolerância a solos salinos e à seca. A árvore de *C. sunki* é de porte médio, folha lisa e pecíolo não alado, espinhos curtos, e bastante produtiva. Os frutos de *C. sunki* são pequenos com peso médio de 20g, apresenta coloração laranja intenso, odor característico, casca fina, não comestível pela alta acidez, possui sementes pequenas, roliças, bom poder germinativo, poliembriônicas, com cotilédones verdes (Pompeu Jr., 1991; Castle et al., 1993). O porta-enxerto ‘Sunki’ tem características indesejáveis como suscetibilidade a gomose (Feichtenberger, 2001) e pequeno número de sementes viáveis por fruto (Medina Filho et al., 1992).

O porta-enxerto *P. trifoliata* (L.) Rafinesque ‘Rubidoux’, espécie única do gênero, é um porta-enxerto muito usado no Japão, Uruguai e em países de clima temperado sendo indicado para combinações com laranjas, limas ácidas e tangerinas. O porta-enxerto *P. trifoliata* induz excelente qualidade de suco, ideal para regiões frias e úmidas, induz baixo vigor na planta reduzindo o porte da copa, facilitando a colheita e o adensamento do pomar (Pompeu Jr., 1991). A planta de *P. trifoliata* apresenta porte pequeno a médio, folhas trilobadas, caráter usado como marcador genético em programas de melhoramento, frutos de casca rugosa, sementes poliembriônicas de tamanho grande apresentando em geral de 30 a 40 sementes por fruto (Salibe, 1974; Castle et al., 1993).

O porta-enxerto *P. trifoliata* apresenta boas características fitossanitárias como alta resistência a gomose, aos nematóides (*Tylenchulus semipenetrans* e *Pratylenchulus coffeae*), ao vírus da tristeza dos citros e a xiloporose, no entanto possui aspectos negativos como suscetibilidade ao exocorte, intolerância ao declínio (Feichtenberger, 2001) baixo desenvolvimento no viveiro, intolerante à seca, alta exigência quanto a fertilidade do solo e apresenta incompatibilidade com laranja ‘Pêra’, limões verdadeiros e tangor ‘Murcott’ (Teófilo Sobrinho, 1991).

2.7 O uso de marcadores moleculares

A ausência de segregação fenotípica discreta impossibilita o uso das técnicas mendelianas clássicas para se estudar os poligenes (Tanksley, 1993). A resolução dos caracteres quantitativos, através da utilização dos marcadores moleculares, em seus

componentes unitários, ou seja, a possibilidade de se identificar, mapear e medir os efeitos dos genes controladores dos caracteres quantitativos é a contribuição de maior expressividade para o melhoramento.

O uso dos marcadores moleculares tem incrementado a eficácia dos métodos clássicos de melhoramento de plantas perenes como os citros, por diversos motivos: auxilia na detecção e localização de genes e compreensão de tipos de herança, permite a seleção e identificação rápida de genótipos eliminando a lentidão e o alto custo dos métodos convencionais e a facilidade de seleção precoce de indivíduos portadores de fatores genéticos desejáveis expressos na fase adulta das plantas (Tanksley, 1993; Gmitter, et al, 1998; Cristofani & Machado, 1999).

O mapeamento genético em citros tem sido grandemente beneficiado com o advento dos marcadores moleculares. A tecnologia permite selecionar genótipos superiores para vários caracteres num curto espaço de tempo. A seleção assistida por marcadores moleculares, tecnologia que associa marcadores moleculares a locos gênicos importantes para a agricultura, e a clonagem de genes são ferramentas úteis em programas de melhoramento de plantas perenes como os citros (Gmitter et al., 1998).

A construção de um mapa de alta resolução (alta saturação) é um pré-requisito para o isolamento de um gene utilizando a estratégia de clonagem baseada em mapeamento genético. Um mapa saturado do genoma é a base para estudos avançados de genética, incluindo a identificação, isolamento de genes, estudos da estrutura, expressão e função desse gene. Altas resoluções em regiões específicas, regiões próximas a genes de interesse, são fundamentais para a identificação e o isolamento de genes. A clonagem de genes se tornou uma realidade em espécies com mapas genéticos bem definidos (Leyeser et al., 1993).

Recentemente, marcadores homólogos a genes de resistência (RGC – resistance gene candidate) têm sido utilizados para alcançar genes de resistência em plantas (Shen et al., 1998; Deng et al., 2000). Marcadores RGC podem ser utilizados para SAM (seleção assistida por marcadores) ou para a clonagem de genes importantes via mapeamento. Marcadores moleculares ligados ao gene de resistência ao CTV foram identificados e um contig de 1,2 MB de clones de BAC foi obtido contendo o gene CTV (Roose et al., 2000).

Em programas de melhoramento de espécies perenes a estratégia de mapeamento utilizando a técnica ‘pseudo testcross’ envolve a progênie F_1 devido à dificuldade de se obter gerações avançadas. O princípio do ‘pseudo testcross’ é que se um parental for heterozigoto para um marcador dominante e o outro parental apresentar formas alélicas não detectadas a progênie F_1 segrega na proporção de 1:1 para ausência e presença do segmento de DNA detectado (Grattapaglia & Sederoff, 1994). Em resumo, a geração F_1 obtida do cruzamento entre duas plantas de uma mesma espécie altamente heterozigota lembra uma F_2 ou um retrocruzamento nos modelos clássicos de culturas anuais (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

A eficiência da adoção do ‘pseudotestcross’ e de outras estratégias de mapeamento estão associadas à distância genética entre os indivíduos cruzados e o nível de heterozigosidade da espécie, ou seja, quanto maior for a distância genética entre os genótipos dos parentais cruzados maior a chance de se detectar polimorfismos de DNA na população segregante (Carlson et al., 1991; Grattapaglia & Sederoff, 1994).

A construção de mapas genéticos e posterior localização de QTLs associados a características de interesse agrônômico pode ser realizada com auxílio de programas computacionais como JoinMap, Qgene, MapmakerQTL, QTLCartographer e outros. Os programas se baseiam em metodologias de esperanças matemático-estatísticas que associa as informações da segregação de pares de marcadores moleculares à característica fenotípica que se quer mapear (Liu, 1998).

O mapeamento de QTLs é baseado em testes de ligação entre marcadores moleculares e características fenotípicas. Os métodos mais empregados para detecção da associação entre marcador-QTL e fenótipo são: análises de marcas simples ‘single marker analysis’ usando os testes: t, regressão linear simples, análise de variância e razão de verossimilhança (Liu, 1998); mapeamento por intervalo usando o método da máxima verossimilhança (Lander & Botstein, 1987) e aproximação de Haley & Knott (1992) e finalmente, o mapeamento por intervalo composto, um refinamento do mapeamento por intervalo que evita a identificação de QTLs ‘fantasmas’ conjugando o método da máxima verossimilhança com regressões lineares múltiplas (Jansen, 1992,1993; Zeng, 1992,1994). A detecção de QTLs pode ser feita considerando-se separadamente os ambientes ou em conjunto através de análise integrada dos dados nos diversos ambientes. O poder de detecção de QTLs

para caracteres que apresentam herança de natureza complexa e baixa herdabilidade é reduzido devido ao efeito ambiental (Young, 1996).

Siviero, (2001) identificou quatro QTLs associados à resistência a gomose de *Phytophthora* dos citros, sendo três localizados em grupos de ligação I, II e V no mapa de *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux' e um QTL no grupo de ligação II no mapa de *Citrus sunki*, indicando a natureza quantitativa da doença. Os QTLs detectados são responsáveis por 14, 60 e 17% da variação fenotípica de *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux' a gomose dos citros, e 18% da variação fenotípica de *C. sunki* ao patógeno.

A maioria das características agrônômicas de diferentes culturas, está sob a ação de muitos locos (poligenes) com pequenos efeitos e apresentando uma variação contínua devido à segregação genotípica, aos efeitos ambientais e à interação genótipo ambiente.

A principal dificuldade no mapeamento de QTLs é o fato de vários fatores genéticos e ambientais afetarem a expressão final do fenótipo. Assim, os delineamentos experimentais devem envolver a medição e genotipagem, com marcadores moleculares, de um grande número de indivíduos ou famílias para permitir a precisão necessária à identificação do QTL (Ferreira et al., 1996). O ambiente exerce influência na avaliação fenotípica de características, principalmente, quando se trata de caracteres quantitativos. As estratégias para eliminar este efeito seriam conduzir ensaios em diferentes ambientes tentando comprovar a estabilidade de expressão ou aumentar números de indivíduos da população segregante. A detecção de QTLs pode ser feita considerando-se separadamente os ambientes ou em conjunto através de análise integrada dos dados nos diversos ambientes (Young, 1996). O poder de detecção de QTLs para caracteres que apresentam herança de natureza complexa e baixa herdabilidade é reduzido devido ao efeito ambiental (Young, 1996).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Os híbridos empregados no experimento estão estabelecidos no campo desde 1997. Essas plantas foram obtidas de polinização controlada realizada em setembro de 1993. Os indivíduos fazem parte de uma população de 314 indivíduos F₁ obtidos do cruzamento entre os parentais *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* ‘Rubidoux’ que pertencem ao BAG-citros do Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’. As plantas estão estabelecidas em campo em ‘pé franco’ no espaçamento 1,20 x 0,50 m.

O presente trabalho foi desenvolvido com 91 indivíduos dessa progênie mais os parentais, que foram enxertados em limoeiro ‘Cravo’ com 6 meses de idade.

3.2 Multiplicação e manutenção do porta-enxerto utilizado

O porta-enxerto utilizado para enxertia dos híbridos foi o limoeiro ‘Cravo’ pertencente ao Banco Ativo de Germoplasma do Centro APTA citros ‘Sylvio Moreira’ do Instituto Agrônomo de Campinas, em Cordeirópolis-SP.

Após a coleta dos frutos, realizou-se a extração de sementes, que foram lavadas até perderem a mucilagem e, em seguida foram colocadas para secagem à

sombra, por dois dias. Depois de secas, as sementes foram tratadas com fungicida “Plantacol” (Quintozene - Pentacloronitrobenzeno) - PM, na dosagem de 400g/100 kg semente.

As sementes foram plantadas em tubetes que receberam, antes do enchimento com substrato, um tratamento preventivo com o fungicida Benlate 500, (Metil-1-(Butilcarbamo)-2-benzimidard carbamato (Benomyl)), na base de 30g de benlate por 50L de água. O substrato usado foi o Plantimax, um produto elaborado com vermiculita expandida selecionada, e material orgânico de origem vegetal, isento de pragas, patógenos e sementes de plantas daninhas. Foi adicionado ao substrato adubo de formulação 18-5-9 na proporção de 40g para cada 10L de substrato. Quando as plantas atingiram 6 meses de idade borbulhas dos híbridos e dos parentais foram enxertadas utilizando o método de T invertido e mantidas em casa de vegetação.

3.3 Manutenção do isolado de *Phytophthora parasitica*

3.3.1 Isolamento e preservação de *Phytophthora parasitica*

As atividades de laboratório foram conduzidas na Clínica de Fitopatologia do Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’ do Instituto Agrônomo de Campinas, Cordeirópolis-SP. Estas atividades consistiram na inoculação e re-isolamento do patógeno e na manutenção do isolado de *Phytophthora parasitica* a ser utilizado na pesquisa.

O isolado, que se encontrava conservado em frascos pelo método de Castelani em água, foi transferido para placas em meio cenoura-ágar, cuja preparação foi feita da seguinte forma:

- 200g de cenoura
- 20g de ágar
- 1000 ml de água destilada

A cenoura foi picada e colocada no liquidificador por aproximadamente 1 minuto e em seguida filtrada, completou-se o volume com água, adicionou-se o ágar e autoclavou-se por 20 minutos a 120°C. Para cada 1000mL do meio cenoura-ágar, devidamente resfriado à temperatura próxima de solidificação, foram

adicionados 1mL de Rifampina , 1mL de Ampicilina e 2mL de Benomil. Após agitação dos frascos o meio foi vertido em placas previamente esterilizadas.

Foram realizados re-isolamentos periódicos a partir de plantas de limoeiro ‘Siciliano’ (*Citrus limon*), com a finalidade de se manter e recuperar a patogenicidade do isolado, onde ramos de limoeiro Siciliano, foram inoculados introduzindo discos de micélio em ferimentos realizados nas hastes da plantas, com um furador de 3mm de diâmetro, em seguida, os ferimentos foram protegidos com esparadrapo e envolvidos com gaze umedecida para manter a umidade. As plantas foram mantidas em casa de vegetação no interior de uma capela de 1m de altura, com pó de serra úmido para manter alta umidade relativa do ar. Após uma semana realizou-se o isolamento do patógeno em cultura pura, a partir das lesões provocadas pelas inoculações, procedendo-se da seguinte forma: os tecidos lesionados foram cortados e colocados durante 1 minuto no álcool, 30 segundos em solução à 5 % de hipoclorito de sódio, e lavados com água esterilizada, e, em seguida, colocados em placas contendo meio cenoura-ágar.

3.3.2 Agressividade do isolado após sucessivas repicagens

Com o objetivo de avaliar a agressividade de *P. parasitica*, após sucessivas repicagens em meio de cultura, foi conduzido um experimento utilizando plantas de limoeiro ‘Cravo’ (*Citrus limonia*) e limoeiro ‘Volkameriano’ (*Citrus volkameriana*).

A partir do isolado original foram realizadas 15 sucessivas repicagens (R1 a R15) em meio cenoura-ágar, em intervalos de 7 dias. Após 15 semanas os isolados que eram mantidos nos frascos pelo método Castelani foram transferidos para placas com meio cenoura-ágar, e após 6 dias foram realizadas inoculações nas plantas sendo o delineamento estatístico inteiramente casualizado com 10 plantas para cada isolado sendo 5 de limoeiro ‘Cravo’ (*Citrus limonia*) e 5 de limoeiro ‘Volkameriano’ (*Citrus volkameriana*).

A inoculação foi realizada com o método do disco, onde ramos foram inoculados com discos de micélio em ferimentos realizados nas hastes da plantas, com um furador de 3mm de diâmetro, em seguida os ferimentos foram protegidos com esparadrapo. As plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida com aproximadamente 85 % de UR e temperatura em torno de 24°C, sob iluminação artificial constante até a data da avaliação.



Figura 1. Inoculação de *Phytophthora parasitica* pelo método do disco com o auxílio do furador



Figura 2. Inserção de disco de micélio de *Phytophthora parasitica*



Figura 3. Proteção do local do ferimento causado pela inoculação de *Phytophthora. parasitica* com esparadrapo

A avaliação se deu 28 dias após a inoculação medindo-se a área das lesões, que eram desenhadas sobre durex e em seguida pintadas e a imagem capturada por scanner para serem digitalizadas e analisadas com o auxílio do programa operacional de computador SIARCS 3.0 desenvolvido pela EMBRAPA.

3.4 Inoculação dos híbridos e parentais visando avaliação de resistência à gomose

O lote de plantas destinadas à inoculação foi dividido em dois ensaios, cada um com 5 repetições de cada híbrido e parentais, para serem inoculadas em duas épocas.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados. O primeiro lote foi inoculado 180 dias após a enxertia utilizando o método do disco, já descrito anteriormente, (item 3.3.2). As plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida com aproximadamente 85 % de UR e temperatura em torno de 24°C, sob iluminação artificial constante até a data da avaliação. As plantas receberam irrigação três vezes por semana. A avaliação da doença foi realizada aos 40 dias após a inoculação,

medindo-se o comprimento longitudinal da lesão em mm (Tabela 5). No segundo lote a inoculação foi efetuada 54 dias após a primeira inoculação, utilizando-se o mesmo método, condições e avaliações anteriormente citados.

3.5 Mapeamento genético de regiões associadas a resistência à gomose

Mapas de ligação previamente construídos para estes mesmos parentais que visaram a localização de genes de resistência ao vírus da tristeza (CTV) (Cristofani et al., 1999) e mapeamento de QTLs envolvidos a resistência na gomose de *Phytophthora* (Siviero, 2001) foram empregados no presente trabalho.

Para as análises foram considerados os dados fenotípicos de avaliação de resistência a gomose obtidas em 2000 (Siviero, 2001) e os dados das duas avaliações realizadas nos dois ensaios do presente trabalho, totalizando três épocas de avaliação. Os dados gerados nas três épocas de avaliação foram avaliados conjuntamente para a determinação da interação entre as respostas nas três diferentes épocas de avaliação.

3.5.1 Análise individual dos ensaios para detecção de QTLs

Os QTLs foram mapeados com base nas médias dos comprimentos de lesão utilizando o método do mapeamento por intervalo composto (CIM) proposto por Zeng (1993, 1994) com o programa QTLCartographer v.1.25 (Basten et al. 1994). CIM, uma extensão do mapeamento por intervalo (Landers e Botstein, 1989), testa a hipótese que um intervalo entre duas marcas adjacentes contém um QTL afetando a característica, enquanto testa o efeito de QTLs segregando fora do intervalo avaliado, utilizando a regressão múltipla. O teste estatístico LOD score (LD) usado é o $-\log L_0/L_1$, onde L_0/L_1 é a probabilidade da hipótese nula (isto é, não há QTL no intervalo) sobre a hipótese alternativa (há um QTL no intervalo). O teste estatístico LR (Likelihood Ratio) usado é o $-2\ln L_0/L_1$.

Foi utilizado o Modelo 6 do módulo Zmapqtl do QTLCartographer analisando intervalo de 1cM entre marcadores e avaliados QTLs putativos em uma janela de 10 cM. O número de cofatores para o controle de 'background' foi estabelecido pelo passo 'forward-backward'. O valor crítico para o limite de erro tipo I ($\alpha = 0,05$) foi estabelecido para

a característica através de permutação randômica por 1000 vezes das médias dos genótipos e usando a permutação empírica da taxa de falso positivo (Churchill e Dorg, 1994). A estimativa da posição, efeitos genéticos e porcentagem de variância fenotípica do QTL foram realizadas a uma de significância LD na região em consideração.

A variância fenotípica explicada por um QTL foi estimada pelo quadrado do coeficiente de correlação parcial (R^2). A estimativa do valor R^2 foi realizada pelo módulo Zmapqtl.

3.5.2 Análise conjunta dos três ensaios para detecção e mapeamento de QTLs

Uma expansão do CIM foi utilizada para testar a hipótese de que um intervalo flanqueado por duas marcas adjacentes contém um QTL afetando a característica, e que ele explica a interação QTL x característica, enquanto estatisticamente explica os efeitos de QTLs adicionais fora do intervalo (Jiang e Zeng, 1995). A análise de uma característica em vários ambientes e correlação genética com o ambiente é convencionalmente equivalente a análise de múltiplas características geneticamente correlacionadas em um único ambiente (Falconer, 1952). A probabilidade estatística LT, é $-2l_2 (L_0/L_1)$, onde L_0 é a probabilidade da hipótese nula ser $A_1 = A_2 = \dots = A_i$, a hipótese alternativa de $A_1 \neq A_2 \neq \dots \neq A_i$, se este teste é realizado somente nas regiões onde os QTLs foram detectados numa análise conjunta no mapa, O teste estatístico é assintoticamente distribuído como X^2 com $i - 1$ GL sob a hipótese nula. Se uma varredura ampla do genoma para os efeitos de alterações for realizado, a distribuição é assintoticamente X^2 com i GL.

O limiar da significância para cada teste deve ser ajustado para o número de testes independentes no genoma amplamente coberto. Embora existam 63 marcas no mapa de *Poncirus*, por exemplo, não há 63 testes independentes, porque os marcadores em um mesmo cromossomo estão correlacionados. No CIM (Zeng, 1994) o número efetivo de teste independente na procura por QTL é determinado pela região do genoma em ambos os lados do intervalo testado. Nesta análise, foi usado o tamanho da janela de 10cM e estima-se que as regiões adjacentes de 30cM podem ser consideradas como independentes (Viera et al, 2000).

Foi estimado o número de testes independentes com $\sum_i [(T_i/30 + 1)$, onde T_i é o comprimento total estimado do mapa em centimorgans do grupo de ligação. Para cada um dos oito grupos de ligação, respectivamente, ou aproximadamente 30 testes no total. Consequentemente, a taxa de erro tipo I de $\alpha= 0,001613$ foi utilizada na análise conjunta de interação. Para testar a interação QTL X ambiente que eram condicionais à presença de um QTL significante, um nível de significância convencional de 5% é apropriado. Três análises CIM foram realizadas uma para cada época de avaliação. Todas as análises utilizaram uma janela de 10 cM. O processo de Stepwise foi utilizado para seleção das variáveis regressoras na região múltipla, dentro do mapeamento por intervalo composto.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Agressividade do isolado após sucessivas repicagens

Os dados do teste de inoculação de *P. parasitica* para avaliação da agressividade de isolados após sucessivas repicagens encontram-se na Tabela 1. Foi utilizado o método de disco de micélio e a avaliação se deu 28 dias após a inoculação medindo-se a área da lesão (Figura 4).

De acordo com as condições do experimento pode-se verificar que o comprimento das lesões variaram entre 0,92 a 1,07 cm² e de 1,29 a 1,54 cm² para o Cravo e Volkameriano, respectivamente, não evidenciando uma diferença significativa entre os isolados R1 a R15, indicando que as sucessivas repicagens não alteraram a agressividade do isolado de *P. parasitica* utilizado.

Tabela 1. Média das áreas das lesões causadas por inoculação de *Phytophthora parasitica* submetidos a repicagens sucessivas em limoeiro Cravo e limoeiro Volkameriano

Repicagens	Limoeiro Cravo	Limoeiro Volkameriano
R1	0.25a	1,38a
R2	1.02a	1,35a
R3	0.95a	1,43a
R4	0.94a	1,32a
R5	1.03a	1,49a
R6	0.98a	1,41a
R7	1.07a	1,43a
R8	1.01a	1,52a
R9	0.92a	1,29a
R10	1.06a	1,30a
R11	1.03a	1,52a
R12	0.93a	1,31a
R13	0.94a	1,54a
R14	1.03a	1,39a
R15	0.99a	1,42a

* Médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey.



Figura 4. Lesões causadas pela inoculação de *Phytophthora parasitica* em limoeiro Cravo

4.2 Avaliação da inoculação de *Phytophthora parasitica* dos híbridos e parentais

A Figura 5 mostra, graficamente, a distribuição dos resultados das inoculações dos parentais e dos 91 híbridos na primeira época de avaliação. O anexo 5 apresenta o comprimento médio de lesão (mm) causada por *P. parasitica* em híbridos obtidos do cruzamento entre *C. sunki* vs *P trifoliata* 'Rubidoux'.

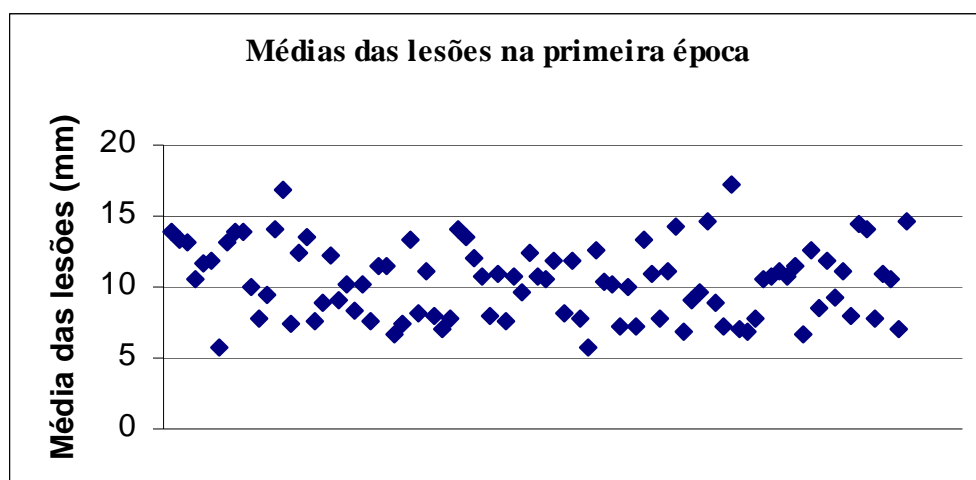


Figura 5. Distribuição das médias de lesões de *Phytophthora parasitica* de híbridos e parentais na primeira época avaliação.

Observando o gráfico constata-se que as médias de lesão dos híbridos na primeira época de avaliação ficaram entre 5,8 e 17,2 mm de comprimento longitudinal. Os parentais *C. sunki* e *P. trifoliata* 'Rubidoux' apresentaram médias de 14,6 e 7,0 mm respectivamente.

A Figura 6 mostra, graficamente, a distribuição dos resultados das inoculações dos parentais e dos 91 híbridos na segunda época de avaliação.

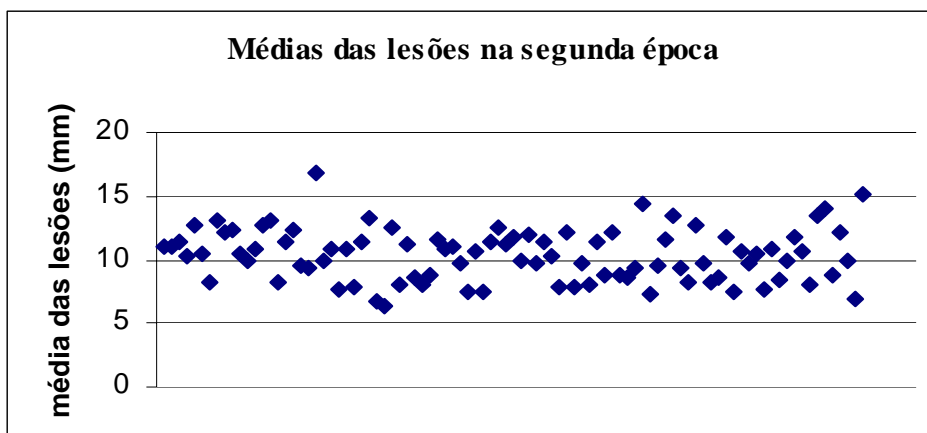


Figura 6. Distribuição das médias de lesões de *Phytophthora parasitica* de híbridos e parentais na segunda época de avaliação.

Pelo gráfico constata-se que as médias de lesão dos híbridos na segunda época de avaliação ficaram entre 6,4 e 16,8 mm de comprimento longitudinal. Os parentais *C. sunki* e *P. trifoliata* 'Rubidoux' apresentaram médias de 15,2 e 7,0 mm, respectivamente.

As análises estatísticas foram feitas com os dados dos dois ensaios de inoculação, separadamente, comparando os híbridos com os parentais *C. sunki* e *P. trifoliata* 'Rubidoux' (Tabelas. 03 e 04 e Anexos 01, 02, 03 e 04). Posteriormente, foi realizada uma análise dos dados comparando as duas épocas de inoculação. (Tabela 05)

O resultado do teste de normalidade utilizando os métodos estatístico não paramétrico de Shapiro-Wilk, Lilliefors e K.S, foram realizados com os dados transformados em raiz de $x + 0,5$ e estão graficamente demonstrados na Figura 7

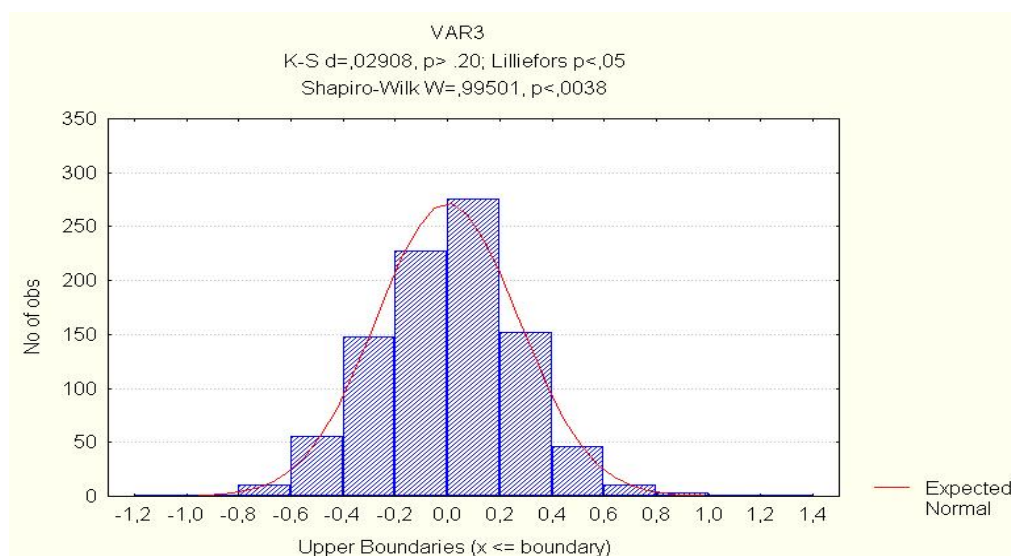


Figura.07 Histograma obtido pelos testes Shapiro-Wilk , Lilliefors e K.S mostrando a distribuição do resíduo e a curva normal esperada.

Através da Figura 07 observa-se que os resultados da reação dos híbridos e parentais à inoculação com *P. parasitica* apresentaram efeitos residuais atendendo a expectativa de distribuição normal pelos testes Lilliefors e K.S, sendo o valor estatístico obtido pelo teste K.S foi $d=0,02908$, $p> 20$ e pelo teste Lilliefors $p<0,05$, sendo altamente significativo o que atende as exigência para o prosseguimento das análises estatísticas.

4.2.1 Análise dos dados da primeira época de avaliação

Os resultados da análise estatística dos dados obtidos pela inoculação dos híbridos e parentais na primeira época de avaliação, apresentados na Tabela 2, mostra que houve uma diferença significativa entre as lesões.

Tabela 2. Análise estatística dos dados da primeira época de avaliação de inoculação artificial de *P parasitica*

Variáveis	G.L	SQ	QM	F	Pr<F
Híbridos 1º época	92	3128,456237	34,005937	6,36	< 0,0001
Resíduo	372	1990,000000	5,349462		
Total	464	5118,546237			

Realizou-se uma comparação entre os híbridos e os parentais *C. sunki* e *P. trifoliata* 'Rubidoux', respectivamente, utilizando o teste de Dunnett's, sendo o mínimo de diferença significativa de 4,8243, cujos dados seguem anexos (Anexo 1 e 2). Através dessa análise realizada na primeira época de avaliação, pode-se concluir que 38 híbridos mais o parental Rubidoux, apresentaram diferença significativa em relação ao parental Sunki. Dentro do grupo dos híbridos materiais promissores para resistência a gomose foram encontrados. Alguns indivíduos apresentaram maior resistência que o próprio parental Rubidoux, que foi o caso dos híbridos 8, 128, 70, 166, 142, 150, 102 e 149.

Quando comparados com Rubidoux, 24 híbridos mais o parental Sunki apresentaram diferença significativa

4.2.2 Análise dos dados da segunda época de avaliação

A análise estatística, apresentada na Tabela 3, é referente aos dados obtidos da segunda avaliação dos híbridos e parentais, e observa-se que houve uma diferença significativa entre os híbridos.

Tabela 3. Análise estatística dos dados do segundo ensaio.

Variáveis	G.L	SQ	QM	F	Pr<F
Híbridos 2º época	92	1938,236559	21,067789	7,67	<0,0001
Resíduo	372	1022,400000	2,748387		
Total	464	2960,636559			

Com os dados do segundo ensaio, realizou-se a comparação entre os híbridos e os parentais *C. sunki* e *P. trifoliata* 'Rubidoux', respectivamente, utilizando o teste de Dunnett's, sendo o mínimo de diferença significativa de 3,4579, cujos dados seguem anexos (Anexos 3 e 4). Através das análises, pode-se observar que 68 híbridos mais o parental Rubidoux, apresentaram diferença significativa com relação ao parental Sunki, apontando materiais promissores para resistência a gomose, materiais esses que apresentaram maior resistência que o parental Rubidoux, que foi o caso dos híbridos 70 e 73.

Quando comparados com Rubidoux, 44 híbridos mais o parental Sunki apresentaram diferença significativa.

4.2.3 Análise da interação reação dos híbridos x épocas de avaliações

Em ambos experimentos houve uma diferença significativa entre os híbridos quando comparados com os parentais. Na Tabela 4 estão as análises estatística comparando os dois ensaios.

Tabela 4. Análise estatística dos dados entre as duas épocas de avaliação

Variáveis	G.L	SQ	QM	F	Pr<F
Híbridos	92	4502,731183	48,942730	12.9	<0,0001
Época	1	0,348387	0,348387	0,09	0,7693
Híbrido*Época	92	564,051613	6,130996	1,51	0,0023

Através das análises dos dados comparando as épocas de inoculação, podemos concluir que houve uma diferença significativa entre os híbridos, não ocorrendo uma diferença entre época e a interação híbrido x época.

4.3 Análise individual de cada ensaio para detecção de QTLs

Para cada detecção de QTLs foram utilizados os mapas de ligação construídos previamente para *Citrus sunki* e *P. trifoliata*, utilizando a estratégia de Pseudo-testcross, 80 indivíduos da progênie e marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Cristofani et al, 1999).

Com base na análise de ligação, 123 dos 168 marcadores RAPD encontrados se agruparam em 18 grupos de ligação. Sessenta e três marcadores se ligaram em 10 grupos de ligação em *Citrus sunki* e em *Poncirus trifoliata* cv. 'Rubidoux', sessenta marcadores se ligaram em 8 grupos de ligação.

O comprimento total dos mapas foi de 867,58 cM para ‘Rubidoux’ e 732,32 cM para ‘Sunki’, com uma distância média de 14,45 cM entre marcadores para ‘Rubidoux’ e 11,62 cM para ‘Sunki’. O comprimento individual dos grupos de ligação variou de 3,20 a 246,67 cM para ‘Rubidoux’ e de 10,3 a 174,18 cM para Sunki’ O maior intervalo entre os marcadores foi de 43,8 cM. Foram encontrados em ‘Sunki’ 3 “gaps” com distância maior que 30 cM e em ‘Rubidoux’ foram encontrados 6 “gaps” com distância maior que 30 cM.

Cada ensaio, 1º avaliação e 2º avaliação, foi analisado individualmente para a detecção de QTLs envolvidos. O teste da verossimilhança foi aplicado aos marcadores e aos 2 conjunto de dados fenotípicos isoladamente.

A detecção de QTLs ligados a gomose de *Phytophthora* feita com o auxílio do programa QTLCartographer pode ser visualizada nas Figura 8 e 9, que demonstram a detecção de QTL no mapa completo de *Poncirus trifoliata* completo e no grupo de ligação II. Nas ordenadas estão dispostas as escalas dos valores de ‘LOD score’ para os grupo de ligação analisados. Na abcissa está a representação do grupo de ligação.

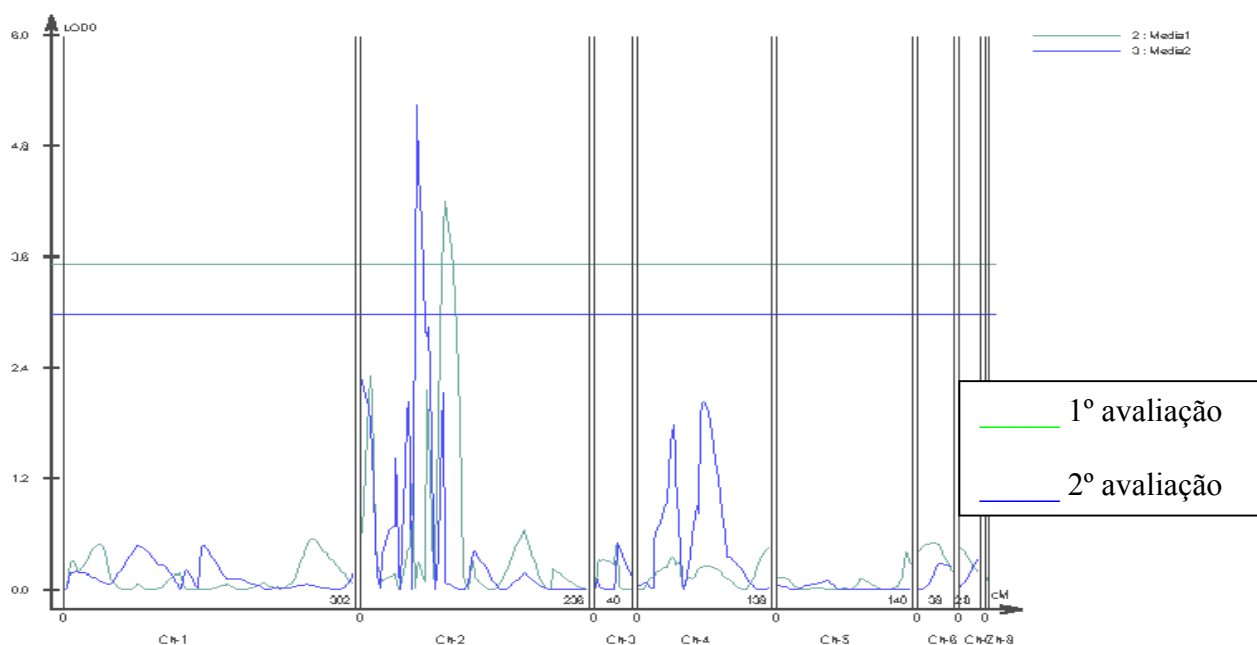


Figura 08. Análise do mapa de ligação de *Poncirus trifoliata* mostrando a presença de QTLs associados a resistência à gomose de *Phytophthora* nas duas avaliações

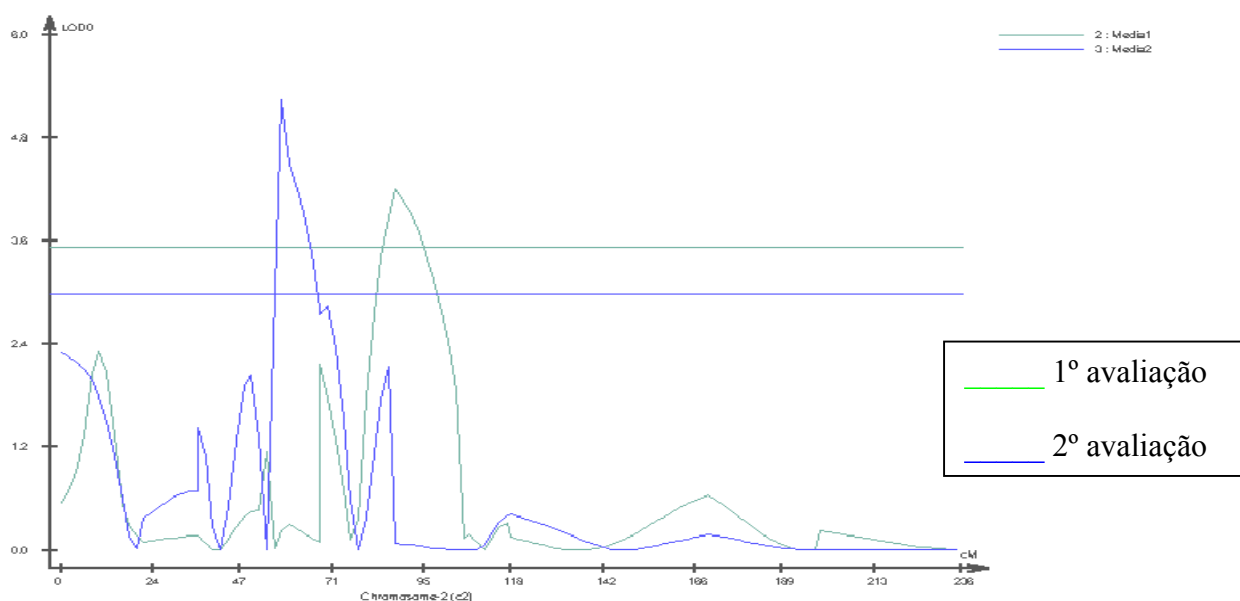


Figura 09. Análise do grupo de ligação II de *Poncirus trifoliata* mostrando a presença de QTL associados a resistência à gomose de *Phytophthora*

Na Figura 9 verifica-se a presença de QTLs no grupo de ligação II *Poncirus trifoliata* sendo um para cada avaliação o que reforça os dados de literatura de que o gênero *Poncirus trifoliata* é uma das mais importantes fontes de resistência às doenças que afetam os citros incluindo a resistência a gomose de *Phytophthora*, consistindo numa grande fonte de fatores genéticos de resistência a fitopatógeno (CTV, nematóides) e outros caracteres de importância agrônômica como tolerância ao frio (Siviero, 2001).

Tabela 5. Valores encontrados para QTLs mapeados em cada avaliação (1ª e 2ª avaliação)

Época de avaliação	Grupo de ligação	Intervalo associado ao QTL	Distância do início do grupo II(cM)	LOD score	R ² (%)	Efeito aditivo
1ª avaliação	II de <i>P. trifoliata</i>	N14_1600 AV03_250	87,73	19,33	26	-3,27
2ª avaliação	II de <i>P. trifoliata</i>	M17_650 NO5_1300	57,92	24,11	43	2,79

Na análise dos experimentos (Tabela 5), a partir das média das lesões causadas por *Phytophthora*, foram identificadas duas posições no grupo de ligação II de *Poncirus trifoliata* associadas à resistência, sendo uma para cada conjunto de dados fenotípicos (1º e 2º avaliações). Na primeira avaliação o QTL está associado ao intervalo N14_1600 a AV03_250 localizado a 87,73 cM do início do grupo de ligação II, sendo responsável por 26 % da variação fenotípica, apresentando um efeito aditivo negativo (-3,27) podendo inferir que o alelo do QTL atua no sentido de reduzir a expressão do caráter analisado.

Na segunda avaliação o QTL está associado ao intervalo M17_650 a N05_1300 localizado a 57,92cM do início do grupo de ligação II, sendo responsável por 43 % da variação fenotípica, apresentando um efeito aditivo de 2,79.

No mapa de Sunki não houve nenhum QTL associado a resistência de *Phytophthora*. Tal fato pode ser justificado, considerando que o porta-enxerto *C. sunki* é citado como suscetível à gomose de *Phytophthora* por vários autores (Feichtenberger, 1999, Siviero 2000 e Boava 2001)

4.4 Análise conjunta para detecção de QTLs ligados à resistência de *Phytophthora*

Com objetivo de avaliar a estabilidade de QTLs em épocas distintas de avaliação, foram analisados dados fenotípicos de 3 ensaios, sendo: primeira e segunda avaliação de resistência a *P. parasitica* do presente trabalho e dados obtidos por Siviero (2001).

4.4.1 Mapa de *Poncirus trifoliata* ‘Rubidoux’

A análise de interação genótipo x ambiente, para as três épocas de avaliação, no mapa de ligação de *Poncirus trifoliata* ‘Rubidoux’, resultou como pode ser observado na Figura 10, em cinco posições significativas associados a resistência à gomose de *Phytophthora*, através da análise conjunta. Quando considerado picos da LR da análise conjunta superiores a LR calculada (9,94)

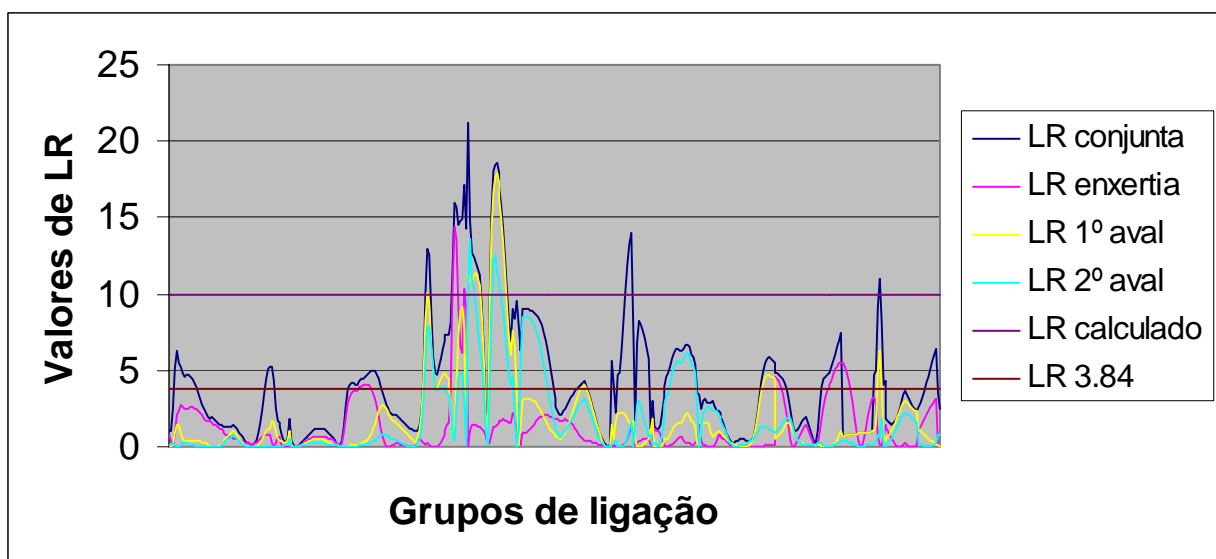


Figura 10. Detecção de QTLs associados à resistência à gomose em mapas de ligação de *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux'

Três posições apareceram no grupo ligação II (Figura 11), uma posição no grupo de ligação III e uma no grupo de ligação V.

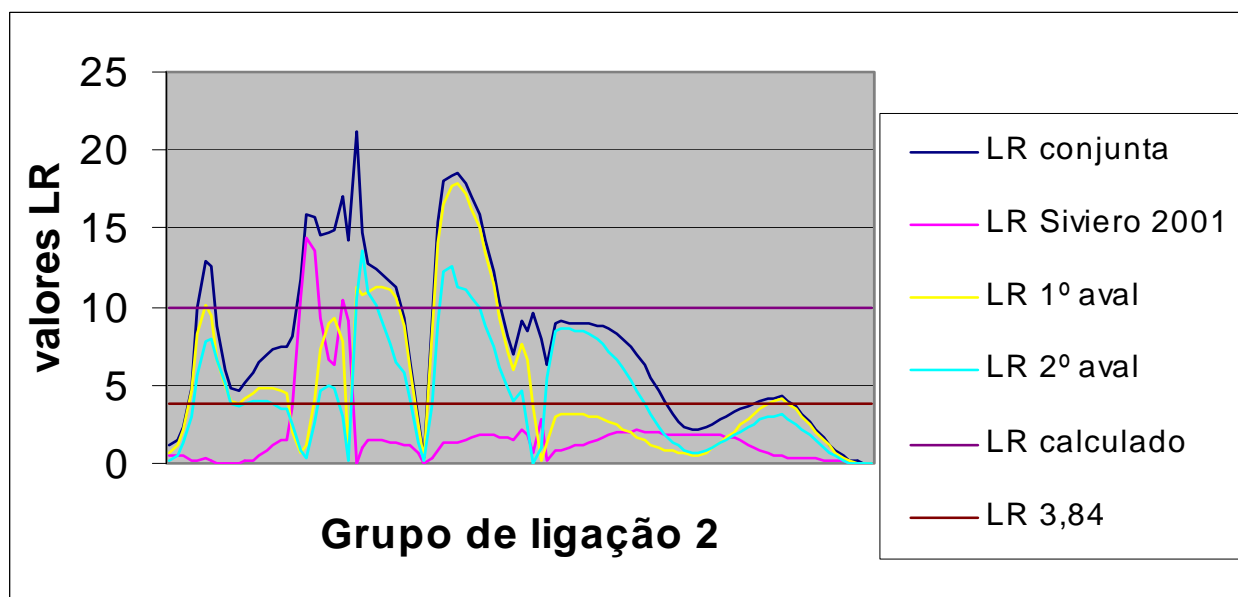


Figura 11. Detecção de QTLs associados à resistência à gomose no grupo ligação II de *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux'

O teste de interação genótipo x ambiente resultou significativo em 5 posições superiores ao LR calculado (9,94), que apresentaram valores de LR de 12,95, 21,24, 18,58 no grupo de ligação II, 13,95 no grupo de ligação III e 10,93 no grupo de ligação V (Tabela 6).

Os QTLs identificados no grupo II estão localizados no intervalo de 8 a 12 cM, de 37 a 51 cM e de 8 a 14 cM, considerando o início do grupo, apresentando comprimento de 4, 14 e 17 cM, respectivamente, os marcadores associados ao intervalos correspondente são C12_1500, M17_650 a N05_1300 e N14_1600 a AV03_250. No grupo III o QTL identificado está localizado no intervalo de 8 a 14 cM do início do grupo, com 6 cM de comprimento e os marcadores associados ao intervalos correspondente são AV02_110 a M12_490. No grupo 5 o QTL identificado está localizado no intervalo de 100 a 121 cM considerando o início do grupo, com 21 cM de comprimento e o marcador associados ao intervalos correspondente é U05-740

Tabela 6. Análise conjunta das médias de todos os experimentos, utilizando o processo Jzmapqtl para análise de caracteres correlacionados.

Grupo de ligação	Intervalo associado ao QTL	Posição do intervalo (cM)	Comprimento do intervalo (cM)	LR (H ₀ :H ₁) Análise conjunta
II de <i>Poncirus trifoliata</i> Rubidoux	C12_1500	8 12	4	12,95
II de <i>Poncirus trifoliata</i> Rubidoux	M17_650 N05_1300	37 51	14	21,24
II de <i>Poncirus trifoliata</i> Rubidoux	N14_1600 AV03_250	72 89	17	18,58
III de <i>Poncirus trifoliata</i> Rubidoux	AV02_110 M12_490	8 14	6	13,95
V de <i>Poncirus trifoliata</i> Rubidoux	U05-740	100 121	21	10,93

Considerando o limiar de significância de $x^2_{\text{tab}}=3,84$ o teste de interação genótipo x ambiente resultou significativo para a 1º e 2º avaliação apenas nos 3 intervalos do grupo de ligação II. No intervalo associado ao marcador C12_1500 o valor de

LR($H_0:H_1$) foi superior ao limiar de significância (3,84) apresentando valores de 10,11 na primeira avaliação e 7,84 na segunda

No intervalo de M17_650 a N05_1300 o LR ($H_0:H_1$) foi de 11,30 e 10,64 na 1° e 2° avaliação, respectivamente. No intervalo N14_1600 a AV03_250 o LR ($H_0:H_1$) foi de 11,30 e 10,64 na 1° e 2° avaliação, respectivamente.

No entanto, não foram detectados QTLs para as avaliação de Siviero (2001), visto que nos três intervalos o LR ($H_0:H_1$) foi inferior a 3,84 com 0,03, 1,39 e 0,26 (Tabela 7). Demonstrado desta forma a ocorrência da interação genótipo ambiente.

Entretanto como pode ser observado na Figura 11 existe um QTL detectado no intervalo M17_650 a N05_1300 na análise de Siviero, (2001), mas não se pode afirmar que esse QTL se mostra estável em relação aos dois encontrados nas outras avaliações. Provavelmente, aumentando o número de marcadores e melhorando a condição dos experimentos poder-se-a chegar a uma correlação mais significativa entre as 3 avaliações.

Tabela 7. Valores encontrados para QTLs mapeados em cada avaliação (1° e 2° avaliação e Siviero, 2001)) utilizando-se a análise conjunta.

Grupo de ligação	Intervalo associados aos QTLs	LR ($H_0:H_1$) (1° avaliação)	LR ($H_0:H_1$) (2° avaliação)	LR ($H_0:H_1$) (Siviero, 2001)
II de <i>P. trifoliata</i>	C12_1500	10,11	7,84	0,26
II de <i>P. trifoliata</i>	M17_650 N05_1300	11,30	10,64	0,03
II de <i>P. trifoliata</i>	N14_1600 AV03_250	17,92	11,23	1,39
III de <i>P. trifoliata</i>	AV02_110 M12_490	1,31	1,51	1,31
V de <i>P. trifoliata</i>	U05-740	6,23	0,71	0,16

O QTL ligado ao intervalo C12_1500 possui um efeito aditivo de 0,81 na primeira avaliação e 0,80 na segunda e atua no sentido de aumentar a expressão o do caracter analisado. O QTL ligado ao intervalo M17_650 a N05_1300 possui um efeito aditivo de 1,83 na primeira avaliação e 1,81 na segunda e atua no sentido de aumentar a expressão o do caracter analisado. O QTL ligado ao intervalo N14_1600 a AV03_250 possui um efeito

aditivo negativo, -2,02 na primeira avaliação e -1,41 na segunda avaliação (Tabela 8). Esse efeito aditivo negativo pode inferir que o QTL atua no sentido de reduzir a expressão de caráter analisado, ou seja da resistência à gomose de *Phytophthora*. Cunha et al. (2002) visando mapear QTLs para o florescimento do feijoeiro com marcadores RAPD em diferentes ambientes observaram um efeito aditivo negativo em um dos QTLs identificado, concluindo que esse atua no sentido de reduzir o número de dias para o florescimento.

Tabela 8. Valores dos efeitos aditivos encontrados para QTLs mapeados em cada avaliação (1º e 2º avaliação) utilizando-se a análise conjunta.

Grupo de ligação	Intervalo associados aos QTLs	Efeito aditivo (1º avaliação)	Efeito aditivo (2º avaliação)
II de <i>P. trifoliata</i>	C12_1500	0,81	0,80
II de <i>P. trifoliata</i>	M17_650	1,83	1,81
	N05_1300		
II de <i>P. trifoliata</i>	N14_1600	-2,02	-1,41
	AV03_250		

As interações devido às avaliações em diferentes épocas podem ser explicadas pelas diferentes condições experimentais para os dados fenotípicos obtidos por Siviero (2001) e pelo presente trabalho. Apesar de as mesmas condições de temperatura e umidade relativa terem sido mantidas, bem como a utilização do mesmo método de inoculação, não foi realizado um controle de idade das plantas inoculadas, época do ano em que foram inoculadas, assim, já era esperada que essa interação se manifestasse nos QTLs que foram identificados pelos marcadores, de tal forma que, apesar do QTL e do marcador estarem presentes e ligados em um mesmo grupo de ligação em duas épocas de avaliação, o marcador só é informativo se o QTL expressa o seu efeito nos vários ambientes de avaliação.

Muitos fatores estão envolvidos na resistência/tolerância de citros a *Phytophthora* spp. entre os quais se destacam: ambiente (Fawcett, 1923); espécie e isolado do patógeno (Klotz et al., 1958; Grimm & Whidden, 1962); presença ou ausência de outros patógenos na planta (Mello et al., 1971), método de inoculação e avaliação empregados

(Grimm & Hutchison, 1973); estado de vegetação do hospedeiro e da própria cultivar-copa (Rossetti & Bitancourt, 1951; Ippolitto et al., 1996), idade da planta e aspecto nutricional (Broembsen & Deacon, 1997), salinidade do solo e pH do solo (Blaker & McDonald, 1986), grau de dormência da planta, suculência e vigor dos tecidos e o tipo da doença em estudo [gomose ou podridão de radículas] (Carpenter & Furr, 1962).

Na verdade, espera-se que a maioria dos QTLs sofra o efeito dessa interação e só se expresse em condições específicas. Entretanto, existem alguns QTLs que mantêm seus efeitos significativos na maioria dos ambientes. Esses são os mais interessantes de serem identificados por ligação a um marcador molecular. Entretanto, eles devem ser a minoria, devido à variação ambiental nas avaliações. Portanto, tais QTLs devem ser difíceis de serem identificados por meio de marcadores moleculares, a não ser que o mapa de ligação seja altamente saturado, ou apresente no mínimo um marcador a cada 15 cM (Tanksley, 1993), o que aumenta as chances de encontrar um marcador ligado a esse QTL.

4.4.2 Mapa de *Citrus sunki*

Assim como para o mapa de *Poncirus trifoliata* a detecção de QTLs ligados à resistência dos citros a gomose feita com o auxílio do programa QTLCartographer pode ser visualizada pela Figura 12 no mapa completo de *Citrus sunki*. Nas ordenadas está disposta a escala dos valores de “LR” para cada grupo de ligação analisado e na abcissa está a representação do grupo de ligação.

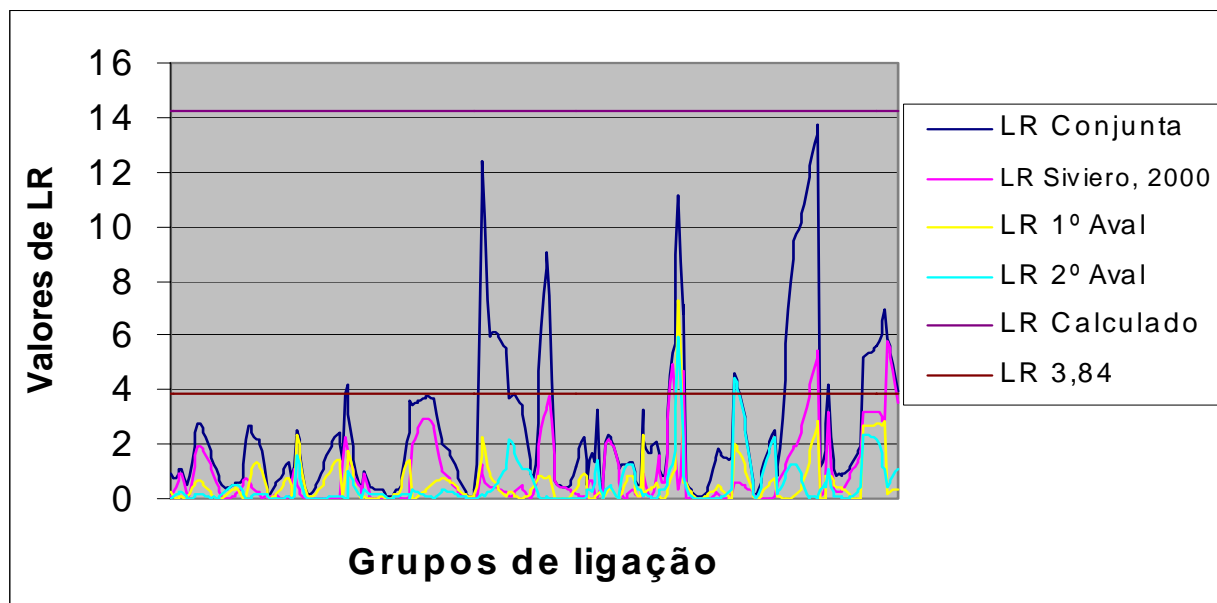


Figura 12. Detecção de QTLs associados à resistência à gomose em mapas de ligação de tangerina 'Sunki'

O critério adotado foi considerar a presença de QTL onde se observaram picos acima do 'LR calculado' (14,21), obtido a partir da análise conjunta das três avaliações. A partir do gráfico pode-se verificar que não houve nenhum QTL associado à resistência de *Phytophthora*. Tal fato pode ser justificado, considerando que o porta-enxerto *C. sunki* é citado como suscetível à gomose de *Phytophthora* por vários autores (Feichtenberger 1999, Siviero 2000 e Boava 2001)

5. CONCLUSÕES

- Quinze sucessivas repicagens não alteram a agressividade de *P. parasitica*
- Dentro do grupo dos híbridos vários indivíduos se mostram-se promissores para resistência a gomose de *Phytophthora*, apresentando maior resistência que o próprio parental Rubidoux.
- Foram detectado cinco locos controladores para característica quantitativas (QTL), no grupo de ligação II, III e V de *P. trifoliata* associada a resistência à gomose de *Phytophthora*
- Com os dados fenotípicos da primeira época de avaliação o QTL associado ao intervalo N14_1600 a AV03_250 localizado a 87,73 cM do início do grupo de ligação II, é responsável por 26 % da variação fenotípica,
- Com os dados fenotípicos da segunda época de avaliação o QTL associado ao intervalo M17_650 a NO5_1300 localizado a 57,92cM do início do grupo de ligação II, é responsável por 43 % da variação fenotípica,

- Em cada região observa-se uma correlação na detecção de QTLs para as avaliações realizadas em duas das três épocas. Demonstrado desta forma a ocorrência da interação genótipo ambiente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFEK, U.& SZTEJNBERG, A. A rapid method for evaluating citrus seedlings for resistance to foot rot caused by *Phytophthora citrophthora*. vol.74, n.1, 1990 p. 66-68. AGRIOS, G.N. *Plant Pathology*. San Diego: APS Press, 1997. 635p.

AGUILLAR-VILDOSO, C.I. & POMPEU JÚNIOR, J. Inoculação de *Phytophthora parasitica* em caules de variedades cítricas pelo método do palito. *Fitopatologia Brasileira*, 22 (supl.), ago 1997. p 240.

AMORIM, E.P.D. Controle biológico de *Phytophthora parasitica var nicotianae* Dastur e *Phytophthora citrophthora* Leonian em plântulas de citrus. Botucatu, 1997. 11p. Tese (Doutorado em Agronomia/ Proteção de Planta) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

AVERNA-SACCÁ, R. Moléstias da laranjeira. *Boletim Agrícola*, v.18, p.334-46, 1917.

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 Carolina State University, 2000. 139p.

- BLAKER, N.S., MCDNALD, J.D. The role of salinity in the developmen of *Phytophthora* root rot of citrus. *Phytophathology*, v.76, n.9, p.970-975. 1986.
- BOAVA, L.P, SIVIERO, A. , ABRÃO, G.S., BARBASSO, D.V. & MASUDA, Y “Patogenicidade de *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* em porta-enxertos de citros. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, suplemento, 2001
- BOAVA, L.P., MASUDA, Y. SIVIERO, A., CRISTOFANI, M., FURTADO, E.L., & MACHADO, M.A. Associação da técnica de marcadores moleculares do tipo microssatélites (SSR) ao método de inoculação de *Phytophthora parasitica* em citros para explicar a variação de resultados experimentais” *Revista Fitopatologia Brasileira*, suplemento 2003
- BOAVA, L.P., SIVIERO, A., MASUDA, Y., FURTADO, E.L., & MACHADO, M.A “Resistência de Citrandarins e Citranges a *Phytophthora parasitica*” *Revista Laranja*, Cordeirópolis, v.24, n.1, p.135-144,2003
- BRIEGER, F.G., MOREIRA, S. Experiências de cavalos para citrus II. *Bragantia*, v.5, n.10, p.597-653. 1945.
- BROADBENT, P. *Phytophthora* disease of citrus: a review. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, v.3, p.597-653. 1945.
- BROADBENT, P., GOLLNOW, B.I. Selecting disease-resistant *Citrus* rootstocks. *Australian Journal of Experimental Agricultural*, v.33, p.775-80. 1993.
- BROEMBSSEN, S.L., DEACON, J.W.. Calcium interference with zoospore and infectivity of *Phytophthora parasitica* in nutrient irrigation solution. *Phytophathplogy*, v.87, n.5, p.522-528. 1997.

- CAMERON, J.W., FROST, H.B. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: the Citrus Industry. REUTHER, W., BATCHELOR, L.D., WEBBER, EDS. VOL ii, University of California. P.325-370. 1968.
- CARLSON, J.E., TULSIERAM, L.K. GALUBITZ, J.C. LUK, V.W.K. RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theoretical Applied Genetics*, v.83, p.805-15. 1991.
- CARPENTER, J.B., FURR, J.R. Evaluation of tolerance to root rot caused by *Phytophthora parasitica* in seedlings of *Citrus* and related genera. *Phytopathology*, v.52, p.1277-85. 1962.
- CASTLE, W.S., TUCKER, D.P.H., KREZDORN, A.H., YOUTSEY, C.O. Rootstocks for Florida *Citrus*: rootstocks selection - The first step to success. Orlando:IFAS, University of Florida, 1993. 92p.
- CARVALHO, M.L.T. Reação de porta-enxerto de híbridos de citros à infecção de tronco e raízes por *Phytophthora parasitica*. Campinas, 82p. 2000. Tese (Doutorado em genética e Biologia Molecular/Genética Vegetal e Melhoramento) – Universidade de Campinas.
- CEVERA, M.T., GUSMÃO, J., PELEMAN, J. BOERJAN, W. Identification of AFLP molecular markers for resistance agins *Melampsora larici-populina* in *Populus*. *Theoretical and Applied Genetics*, v.93, p.733-737. 1996.
- CHURCHILL, G.A., DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, v.138, p.963-71, 1994.
- CRISTOFANI, M.; TARGON, M.L.P.N.; COLLETA FILHO, H.D., MACHADO, M.A. Identification of zygotic and nucellar embryos of polyembryonic varieties of citrus using RAPD markers. *Brazilian Journal of Genetics*, 19 (3); 231, 1996.

CRISTOFANI, M. & MACHADO, M.A. Utilização de Marcadores Moleculares na identificação e determinação da frequência de embriões zigóticos. *Laranja: Revista técnico-científica de citricultura*, Cordeirópolis, vol 19, n.1 p.159-166,1998.

CRISTOFANI, M., MACHADO, M.A., GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of *Citrus* tristeza virus resistance gene. *Euphytica*, v.109, n.1, p.25-32.1999.

CRISTOFANI, M., MACHADO, M.A. Uso de técnicas moleculares na taxonomia, genética e no melhoramento dos citros. *Laranja*, v.20, p.188-232, 1999.

CRISTOFANI, M. Mapas de ligação de *Citrus sunki* Hort. Ex. tan. E *Poncirus trifoliata* (L) Raf. Cv Rubidoux e localização do gene de resistência ao vírus da tristeza. Piracicaba, 1997. 14p. Tese (Doutorado em agronomia/Genética e melhoramento de plantas)- Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' Universidade de São Paulo.

CRISTOFANI, M., MACHADO, M.A. Molecular markers linked to *Citrus* tristeza virus (CTV) resistance gene in cultivars and hybrids of *Poncirus trifoliata*. In: Goren, R., Goldschmidt, E.E.(eds.) INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CITRUS BIOTECHNO-LOGY, 1. *Acta Horticulturae*, v.535, p.231-5. 2000.

DAVIES, F., ALBRIGO, L.G. *Citrus*. Walingford:CAB International, 1994. 245p.

DENG, Z., HUANG, S., XIAO, S.Y., GMITTER, F.G. Development and characterization of SCAR markers linked to the *Citrus* tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata*. *Genome*, v.40, p.697-704. 1997.

ERWIN, D.C., RIBEIRO, O.K. *Phytophthora* disease worldwide. St Paul, APS Press, 1996. 562p.

- FALCONER, D.S. *Introduction to quantitative genetics*. England:Logman Scientific and Technical, 1989. 438p.
- FAWCETT, H.S. Gummosis on citrus. *Journal of Agriculture Research*, v.24, n.3, p.235-55. 1923.
- FAWCETT, H.S, BITANCOURT, A.A. Occurrence, pathogenicity, and temperature relations of *Phytophthora* species on citrus in Brasil and South American countries. *Arquivo Instituto Biológico*, v.11, n.1, p.107-1119. 1940.
- FEICHTENBERGER, E., TRAVEL, A.P. Efeito de fungicidas sistêmicos e fosfitos no desenvolvimento de lesões de *Phytophthora parasitica* em laranjeiras 'Hamilin'. *Fitopatologia brasileira*, v.74, n.1, p.24-7. 1990.
- FEICHTENBERGER, E. Manejo ecológico de gomose de *Phytophthora* dos citros. São Paulo, Rhodia Agro Ltda, 42p. 1996.
- FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In.: LUZ, E.D.M.N., MATSUOKA, K. SANTOS, A.F. (eds.). *Doenças causadas por Phytophthora no Brasil*. Livraria Rural Editora:Piracicaba, 2001. p.283-342.
- FELD, S.J., MENGE, J.A., STOLZY, L.H. Influence of drip and furrow irrigation in *Phytophthora* root rot of citrus under field and greenhouse conditions. *Plant disease*, v.74, n.1, p.224-7. 1990.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética. 2.ed., Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1996. 220p.

- GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R.B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do triângulo mineiro. *Summa Phytopathologica*. v.27,n.1, p. 93. 2001.
- GOODWIN, P.H., KIKPATRICK, B.C., DUNIWAY, J.M. Cloned DNA probes for identification of *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology*, v.79, n.6, p.716-21. 1989.
- GRAHAM, J.H., TIMMER, L.W. *Phytophthora* disease of *Citrus*. In: KUMMER, J. (Ed.). *Plant diseases of international importance*. N. Jersey:Prentice-Hall, 1992. p.250-69.
- GRAHAM, J.H. Root regeneration and tolerance of Citrus rootstocks to root rot caused by *Phytophthora nicotianae*. *Phytopathology*. v.85, n.1, p.111-117.1995.
- GRATTAPAGLIA, D., SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandees* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*, v.137, p.170-77.1994.
- HALEY, C.S.; KNOTT, S.A. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity*, v.69, p.315-324, 1992.
- HAWKSWORTH, P.M., KIRK, P.M., SUTTON, B.C Dictionary of the Fungi. Ins Myc. Inst., Wallingford, UK, 1995. 616p.
- HOUGH, A., MULDNER, N.J., LA GRANJE, J.M. Heat treatment for the control of *Phytophthora* gummosis in citrus. *Plant disease*, v.63, n.1, p. 40-43. 1979.
- HUTCHISON, D.J. Rootstocks development screening and selection for disease tolerance and horticultural characteristics. *Fruit Varieties Journal*,v.39, p.21-5.1985.
- JANSEN, R.C. A general mixture model for mapping quantitative trait lociby using molecular markers. *Theoretical Applied Genetics*, v.85, p.252-260. 1992.

- JANSEN, R.C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* v.135, p.205-211, 1993.
- JIANG, C., ZENG, Z.-B., Multiple trait analyses of genetic for quantitative trait loci. *Genetics* 140: p.1111-1127. 1995.
- KLOTZ L.J., FAWCETT, H.S. The relative resistance of varieties and species of citrus to *Phytophthora gummosis* and other bark disease. *Journal of Agricultural Research*, v.2, n.5, p.415-425. 1930.
- KLOTZ L.J., DeWOLFE, T. A., WONG, P.P. Influence of two varieties of citrus scions on the pathogenicity of three isolates of *Phytophthora parasitica* to sweet orange rootstocks. *Phytopathology*, v.48, p.520-521. 1958.
- LANDER, E.S., BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, v.121, p.185-99. 1987.
- LANDER, E.S., GREEN, P., BARLOW, A., DALY, M.J., LINCOLN, E.E., NEWBURG, L. Mapmaker: an interactive computer package constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, v.1, p.174-81, 1989.
- LAVILLE, E. Reflexions sur la nature des relations hôte-parasite dans le couple agrumes-*Phytophthora* spp. *Fruits*, v.30, n.1, p.19-22. 1975.
- LEYESER, H.M.O.; LINCOLN, C.A.; TIMPTE, C.; LAMMBER, D.; TURNER, J.; ESTELLE, M. Arabidopsis auxin-resistance gene AXR 4 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature*, v.364, p161-164. 1993.
- LIU, B.H. *Statistical genomics. Linkage, Mapping, and QTL Analysis*. Boca Raton: CRC Press, 1998. 854p.

- LUTZ, A., MENGE, J.A. Population fluctuations and the numbers and types of propagules of *Phytophthora parasitica* that occur in irrigated *Citrus* groves. *Plant Disease*, v.75, p.173-9, 1991.
- MARINO, M.K., NASSAR, A.M., NEVES, M.F. Exportação brasileira de citros: barreiras na União Européia e EUA. *Revista Laranjav.*24, n.2, p.267-287, 2003.
- MATHERON, M.E., WRIGHT, G.C., PORCHAS, M. Resistance to *Phytophthora parasitica* and nursery characteristic of several citrus rootstocks. *Plant disease*, v.82, v12, p.1217-1225. 1998.
- MAY, L.I. Controle biológico, físico e químico de *Phytophthora parasitica* Dastur em mudas de citros. Piracicaba, 1994. 89p. Dissertação (mestrado em Agronomia/Fitopatologia) Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' Universidade de São Paulo.
- MEDINA FILHO, H.P., BORDIGNON, R., BALLVÉ, R.M.L.,SIQUEIRA, W.J. Genetic proof of the occurrence of mono and dizygotic hybrid twins in *Citrus* rootstocks. *Revista Brasileira de genética*, v.16, n.3, p.703-711.1993.
- MEIRELLES, J. C. S. O agronegócio é o negócio do Brasil. *Revista Pespectiva* 99. p 5. 1999.
- MELLO, O.F., ROSSETTI, V., OLIVEIRA, D.A., POMPEU JR, J. Estudo comparativo da resistência a *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora*, de onze variedades de *Citrus sinensis*, usadas como porta-enxerto para laranja 'Hamilin' de clone nucelar e clone velho. Congresso Brasileiro de Fruticultura, 1. P.489-503, Campinas, SP. 1971
- MOURÃO, F.A.A. Produção de Híbridos somático em Citros". *Revista: Laranja, Cordeirópolis*, v.17, n.1, p.179-197, 1996.

- MOORE, G.A., CASTLE, W.S. Morphological and isozymic analysis open-pollinated *Citrus* rootstock population. *Journal of Heredity*, v.70, p.59-63.1988.
- POMPEU JUNIOR, J. *Porta-enxerto*. In: RODRIGUEZ, O., VIEGAS, F., POMPEU, JR, AMARO, A.A. (Eds.) *Citricultura Brasileira*. 2a. Ed., Campinas:Fundação Cargill, v.1. 1991. p.116-52.
- RONDON, A., HUNG, G., SOLORZANO, R. Reaccion de patrones cítricos a *Phytophthora nicotinae var parasitica*, em condiciones de umbráculo. *Agronomia-Tropical-Maracay*, v.43, n.3, p.117-125. 1993.
- ROOSE, M.L., D. FENG, F.S. CHENG, R.I. TAYAR, C.T. FREDERICI, R.S. KUPPER. 2000. 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.
- ROSSETTI, V. Estudos sobre a gomose de *Phytophthora* dos citros I - Suscetibilidade de diversas espécies cítricas a algumas espécies de *Phytophthora*. *Arquivos Instituto Biológico*, v.18, p.97-124, 1947.
- ROSSETTI, V., BITANCOURT, A.A. Estudo sobre a gomose de *Phytophthora* dos citros II – Influência do estado de vegetação do hospedeiro nas lesões experimentais. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.20, p.73-94. 1951.
- SALIBE, A.A. Curso de especialização em citricultura a nível de pós-graduado. 3.ed. 1974. 190p. (apostila)
- SCHUTTE, G.C., BEZUIDENHOUT, J.J., KOTZÉ, J.M. Timing application of phosphonate fungicides using different application methods as determined by means of gas-liquid-chromatography for *Phytophthora* root rot of citrus. *Phytophactica*, v.23, p. 69-71. 1991.

- SHEN, K.A, MEYERS, B.C., ISLAM-FARIDI, M.N., CHIN D.B., STELLY, D.M., MICHELMORE, R.W. Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.8, p.815-23, 1998.
- SIVIERO, A. Métodos de inoculação da *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* a gomose. Botucatu, 2001.117p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista.
- SMITH, G.S., HUTCHISON, D.J., HENDERSON, T. Screening sweet orange citrus cultivars for relative susceptibility to *Phytophthora* foot rot. Proc. Florida state horticultural Science, v. 110, p.64-66. 1987.
- SULISTYOWATI, L., Keane, p.j., anderson, jw. Accumulation of the phytoalexin, 6,7 dimethoxycoumarin, in root and stem of citrus following inoculation with *Phytophthora citrophthora*. *Physiology and molecular Plant Pathology*, v.37, p.441-61. 1990.
- TANKSLEY, S.D., YONG, N.D., PATERSON, A.H. BONIERBALI, M.W. RPFL Mapping in plant breeding: new tools for na old science. *Biotechnology*, v.7, p.257-264. 1989.
- TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics*, v.27, p.205-33, 1993.
- TEÓFILO SOBRINHO, J. variedades de copas e porta-enxertos para os citros. In: MENTEN, J.O.M. (ed) Curso intensivo de citricultura. Piracicaba, ESALQ. Ceres. 1991. P.25-31
- TIMMER, L.W., GARNSEY, S.M, GRAHAM, J.H. Compendium of *Citrus* Diseases. APS Press. St. Paul, 2000. 132p.

- TSAO, P.H., FANG, J.G., SZTEJNBERG, A., DAFT, G.C. Biological control with Fungi Antagonist against *Phytophthora* root rot of Citrus. Proc. International Society of Citriculture, 1996. V.1, p.394-396.
- VERNENGI, A., RAMIANDRASOA, F., CHUILON, S. RAVISE, A. phytoalexine des citrus: seselne propriétés inhibitrices et nodulation de synthese. *Fruits*, v.42, p.103-11. 1987.
- VIERA, C., PASYUKOVA, E.G., ZENG, Z.B., HACHETT, J.B., LYMAN, R.F.L., MACHAY, T.F.C. Genotype-Environment interaction for Quantitative trait loci affecting life in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 154: p.213-227. 2000.
- WHITESIDE, J.O. Some factors affecting the occurrence and development of foot rot on citrus trees. *Phytopathology*, v.61, n12, p.1233-1971.
- WHITESIDE, J.O., GARNSEY, S.M., TIMMER, L.W. Compendium of citrus diseases. APS Press. St. Paul, 1996. 80p.
- WIDMER, T.L., GRAHAM, J.H., MITCHELL, D.J. Composted municipal waste reduces infection of citrus seedling. *Plant disease*, v.82, n.6, p.682-688. 1998.
- YOUNG, N.D. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review Phytopathology*, v.34, p.479-501, 1996.
- ZENG, Z.B. Theoretical basis of precision mapping of quantitative trait loci. *Proceedings National Academy Science of USA*, p.10972-6, 1993.
- ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, v.136, p.1457-68, 1994.
- ZHU, W.S., CHEN, Z.S., LAN, X.V., JI, Y. Studies on the resistance of some Citrus biotypes to foot rot caused by *Phytophthora parasitica*. *China-Citrus*, v.20, n.1, p.11-13. 1991.

Anexo 1 Análise de Variância para os dados de lesão na primeira época comparando híbridos com Rubidoux

Teste t de Dunnett

Nota: Esse teste controla o erro tipo 1 para comparação de todos os tratamentos contra o controle

Alpha	0,05
Grau liberdade do resíduo	372
Quadrado médio do resíduo	5,349462
Valor crítico do teste de t de Dunnett	3,29796
Diferença mínima significativa	4,8243

As comparações significativas ao nível de 0,05 são indicadas por ***

COMPARAÇÃO HÍBRIDOS		Diferença entre médias	Simultaneous 95% Confidence Limits		
148	- Rubidoux	10.200	5.376	15.024	***
20	- Rubidoux	9.800	4.976	14.624	***
Sunki	- Rubidoux	7.600	2.776	12.424	***
145	- Rubidoux	7.600	2.776	12.424	***
187	- Rubidoux	7.400	2.576	12.224	***
141	- Rubidoux	7.200	2.376	12.024	***
105	- Rubidoux	7.000	2.176	11.824	***
189	- Rubidoux	7.000	2.176	11.824	***
19	- Rubidoux	7.000	2.176	11.824	***
10	- Rubidoux	6.800	1.976	11.624	***
1	- Rubidoux	6.800	1.976	11.624	***
11	- Rubidoux	6.800	1.976	11.624	***
14	- Rubidoux	6.800	1.976	11.624	***
106	- Rubidoux	6.600	1.776	11.424	***
31	- Rubidoux	6.600	1.776	11.424	***
77	- Rubidoux	6.400	1.576	11.224	***
136	- Rubidoux	6.400	1.576	11.224	***
2	- Rubidoux	6.400	1.576	11.224	***
4	- Rubidoux	6.200	1.376	11.024	***
129	- Rubidoux	5.600	0.776	10.424	***
172	- Rubidoux	5.600	0.776	10.424	***
118	- Rubidoux	5.400	0.576	10.224	***
26	- Rubidoux	5.400	0.576	10.224	***
47	- Rubidoux	5.200	0.376	10.024	***
108	- Rubidoux	5.000	0.176	9.824	***
126	- Rubidoux	4.800	-0.024	9.624	
7	- Rubidoux	4.800	-0.024	9.624	
177	- Rubidoux	4.800	-0.024	9.624	
124	- Rubidoux	4.800	-0.024	9.624	
6	- Rubidoux	4.600	-0.224	9.424	
68	- Rubidoux	4.400	-0.424	9.224	
163	- Rubidoux	4.400	-0.424	9.224	
66	- Rubidoux	4.400	-0.424	9.224	
140	- Rubidoux	4.200	-0.624	9.024	
160	- Rubidoux	4.200	-0.624	9.024	
81	- Rubidoux	4.200	-0.624	9.024	

Continuação ANEXO 1

183	- Rubidoux	4.200	-0.624	9.024
113	- Rubidoux	4.000	-0.824	8.824
192	- Rubidoux	4.000	-0.824	8.824
137	- Rubidoux	4.000	-0.824	8.824
154	- Rubidoux	3.800	-1.024	8.624
161	- Rubidoux	3.800	-1.024	8.624
109	- Rubidoux	3.800	-1.024	8.624
119	- Rubidoux	3.800	-1.024	8.624
5	- Rubidoux	3.600	-1.224	8.424
121	- Rubidoux	3.600	-1.224	8.424
193	- Rubidoux	3.600	-1.224	8.424
152	- Rubidoux	3.600	-1.224	8.424
130	- Rubidoux	3.400	-1.424	8.224
59	- Rubidoux	3.200	-1.624	8.024
56	- Rubidoux	3.200	-1.624	8.024
132	- Rubidoux	3.200	-1.624	8.024
134	- Rubidoux	3.000	-1.824	7.824
15	- Rubidoux	3.000	-1.824	7.824
117	- Rubidoux	2.600	-2.224	7.424
144	- Rubidoux	2.600	-2.224	7.424
18	- Rubidoux	2.400	-2.424	7.224
179	- Rubidoux	2.200	-2.624	7.024
143	- Rubidoux	2.000	-2.824	6.824
54	- Rubidoux	2.000	-2.824	6.824
146	- Rubidoux	1.800	-3.024	6.624
42	- Rubidoux	1.800	-3.024	6.624
176	- Rubidoux	1.600	-3.224	6.424
57	- Rubidoux	1.400	-3.424	6.224
125	- Rubidoux	1.200	-3.624	6.024
80	- Rubidoux	1.200	-3.624	6.024
110	- Rubidoux	1.000	-3.824	5.824
101	- Rubidoux	1.000	-3.824	5.824
184	- Rubidoux	1.000	-3.824	5.824
104	- Rubidoux	0.800	-4.024	5.624
139	- Rubidoux	0.800	-4.024	5.624
17	- Rubidoux	0.800	-4.024	5.624
191	- Rubidoux	0.800	-4.024	5.624
127	- Rubidoux	0.800	-4.024	5.624
151	- Rubidoux	0.800	-4.024	5.624
114	- Rubidoux	0.600	-4.224	5.424
37	- Rubidoux	0.600	-4.224	5.424
62	- Rubidoux	0.600	-4.224	5.424
23	- Rubidoux	0.400	-4.424	5.224
73	- Rubidoux	0.400	-4.424	5.224
147	- Rubidoux	0.200	-4.624	5.024
133	- Rubidoux	0.200	-4.624	5.024
135	- Rubidoux	0.200	-4.624	5.024
102	- Rubidoux	0.000	-4.824	4.824
149	- Rubidoux	0.000	-4.824	4.824
142	- Rubidoux	-0.200	-5.024	4.624
150	- Rubidoux	-0.200	-5.024	4.624
70	- Rubidoux	-0.400	-5.224	4.424
166	- Rubidoux	-0.400	-5.224	4.424
128	- Rubidoux	-1.200	-6.024	3.624
8	- Rubidoux	-1.200	-6.024	3.624

ANEXO 2 Análise de variância para os dados de lesão na primeira época comparando híbridos com Sunki

Teste t de Dunnett

Nota: Esse teste controla o erro tipo 1 para comparação de todos os tratamentos contra o controle

Alpha	0,05
Grau liberdade do resíduo	372
Quadrado médio do resíduo	5,349462
Valor crítico do teste de t de Dunnett	3,29796
Diferença mínima significativa	4,8243

As comparações significativa ao nível de 0,05 são indicadas por ***

COMPARAÇÃO HÍBRIDOS	Diferença		Simultaneous 95% Confidence Limits	
	entre médias			
148 - Sunki	2.600		-2.224	7.424
20 - Sunki	2.200		-2.624	7.024
145 - Sunki	0.000		-4.824	4.824
187 - Sunki	-0.200		-5.024	4.624
141 - Sunki	-0.400		-5.224	4.424
105 - Sunki	-0.600		-5.424	4.224
189 - Sunki	-0.600		-5.424	4.224
19 - Sunki	-0.600		-5.424	4.224
10 - Sunki	-0.800		-5.624	4.024
1 - Sunki	-0.800		-5.624	4.024
11 - Sunki	-0.800		-5.624	4.024
14 - Sunki	-0.800		-5.624	4.024
106 - Sunki	-1.000		-5.824	3.824
31 - Sunki	-1.000		-5.824	3.824
77 - Sunki	-1.200		-6.024	3.624
136 - Sunki	-1.200		-6.024	3.624
2 - Sunki	-1.200		-6.024	3.624
4 - Sunki	-1.400		-6.224	3.424
129 - Sunki	-2.000		-6.824	2.824
172 - Sunki	-2.000		-6.824	2.824
118 - Sunki	-2.200		-7.024	2.624
26 - Sunki	-2.200		-7.024	2.624
47 - Sunki	-2.400		-7.224	2.424
108 - Sunki	-2.600		-7.424	2.224
126 - Sunki	-2.800		-7.624	2.024
7 - Sunki	-2.800		-7.624	2.024
177 - Sunki	-2.800		-7.624	2.024
124 - Sunki	-2.800		-7.624	2.024
6 - Sunki	-3.000		-7.824	1.824
68 - Sunki	-3.200		-8.024	1.624
163 - Sunki	-3.200		-8.024	1.624
66 - Sunki	-3.200		-8.024	1.624
140 - Sunki	-3.400		-8.224	1.424
160 - Sunki	-3.400		-8.224	1.424
81 - Sunki	-3.400		-8.224	1.424
183 - Sunki	-3.400		-8.224	1.424
113 - Sunki	-3.600		-8.424	1.224

192	- Sunki	-3.600	-8.424	1.224	
137	- Sunki	-3.600	-8.424	1.224	
154	- Sunki	-3.800	-8.624	1.024	
161	- Sunki	-3.800	-8.624	1.024	
116	- Sunki	-3.800	-8.624	1.024	
109	- Sunki	-3.800	-8.624	1.024	
119	- Sunki	-3.800	-8.624	1.024	
5	- Sunki	-4.000	-8.824	0.824	
121	- Sunki	-4.000	-8.824	0.824	
193	- Sunki	-4.000	-8.824	0.824	
152	- Sunki	-4.000	-8.824	0.824	
130	- Sunki	-4.200	-9.024	0.624	
59	- Sunki	-4.400	-9.224	0.424	
56	- Sunki	-4.400	-9.224	0.424	
132	- Sunki	-4.400	-9.224	0.424	
134	- Sunki	-4.600	-9.424	0.224	
15	- Sunki	-4.600	-9.424	0.224	
117	- Sunki	-5.000	-9.824	-0.176	***
144	- Sunki	-5.000	-9.824	-0.176	***
18	- Sunki	-5.200	-10.024	-0.376	***
179	- Sunki	-5.400	-10.224	-0.576	***
143	- Sunki	-5.600	-10.424	-0.776	***
54	- Sunki	-5.600	-10.424	-0.776	***
146	- Sunki	-5.800	-10.624	-0.976	***
42	- Sunki	-5.800	-10.624	-0.976	***
176	- Sunki	-6.000	-10.824	-1.176	***
57	- Sunki	-6.200	-11.024	-1.376	***
125	- Sunki	-6.400	-11.224	-1.576	***
80	- Sunki	-6.400	-11.224	-1.576	***
110	- Sunki	-6.600	-11.424	-1.776	***
101	- Sunki	-6.600	-11.424	-1.776	***
184	- Sunki	-6.600	-11.424	-1.776	***
104	- Sunki	-6.800	-11.624	-1.976	***
139	- Sunki	-6.800	-11.624	-1.976	***
17	- Sunki	-6.800	-11.624	-1.976	***
191	- Sunki	-6.800	-11.624	-1.976	***
127	- Sunki	-6.800	-11.624	-1.976	***
151	- Sunki	-6.800	-11.624	-1.976	***
114	- Sunki	-7.000	-11.824	-2.176	***
37	- Sunki	-7.000	-11.824	-2.176	***
62	- Sunki	-7.000	-11.824	-2.176	***
23	- Sunki	-7.200	-12.024	-2.376	***
73	- Sunki	-7.200	-12.024	-2.376	***
147	- Sunki	-7.400	-12.224	-2.576	***
133	- Sunki	-7.400	-12.224	-2.576	***
135	- Sunki	-7.400	-12.224	-2.576	***
102	- Sunki	-7.600	-12.424	-2.776	***
Rubidoux	- Sunki	-7.600	-12.424	-2.776	***
149	- Sunki	-7.600	-12.424	-2.776	***
142	- Sunki	-7.800	-12.624	-2.976	***
150	- Sunki	-7.800	-12.624	-2.976	***
70	- Sunki	-8.000	-12.824	-3.176	***
166	- Sunki	-8.000	-12.824	-3.176	***
128	- Sunki	-8.800	-13.624	-3.976	***
8	- Sunki	-8.800	-13.624	-3.976	***

ANEXO 3 Análise de Variância para os dados de lesão na segunda época comparando Híbridos com Rubidoux

Teste t de Dunnett

Nota: Esse teste controla o erro tipo 1 para comparação de todos os tratamentos contra o controle

Alpha	0,05
Grau liberdade do resíduo	372
Quadrado médio do resíduo	2,7483872
Valor crítico do teste de t de Dunnett	3,29796
Diferença mínima significativa	3,4579

As comparações significativas ao nível de 0,05 são indicadas por ***

COMPARAÇÃO HÍBRIDOS		Diferença entre médias	Simultaneous 95% Confidence Limits		
47	- Rubidoux	9.800	6.342	13.258	***
Sunki	- Rubidoux	8.200	4.742	11.658	***
141	- Rubidoux	7.400	3.942	10.858	***
189	- Rubidoux	7.000	3.542	10.458	***
187	- Rubidoux	6.400	2.942	9.858	***
145	- Rubidoux	6.400	2.942	9.858	***
68	- Rubidoux	6.200	2.742	9.658	***
10	- Rubidoux	6.000	2.542	9.458	***
20	- Rubidoux	6.000	2.542	9.458	***
148	- Rubidoux	5.800	2.342	9.258	***
6	- Rubidoux	5.800	2.342	9.258	***
19	- Rubidoux	5.800	2.342	9.258	***
77	- Rubidoux	5.600	2.142	9.058	***
117	- Rubidoux	5.600	2.142	9.058	***
14	- Rubidoux	5.400	1.942	8.858	***
31	- Rubidoux	5.400	1.942	8.858	***
136	- Rubidoux	5.200	1.742	8.658	***
129	- Rubidoux	5.200	1.742	8.658	***
11	- Rubidoux	5.200	1.742	8.658	***
192	- Rubidoux	5.200	1.742	8.658	***
124	- Rubidoux	5.000	1.542	8.458	***
179	- Rubidoux	4.800	1.342	8.258	***
119	- Rubidoux	4.800	1.342	8.258	***
152	- Rubidoux	4.800	1.342	8.258	***
105	- Rubidoux	4.600	1.142	8.058	***
144	- Rubidoux	4.600	1.142	8.058	***
134	- Rubidoux	4.400	0.942	7.858	***
26	- Rubidoux	4.400	0.942	7.858	***
116	- Rubidoux	4.400	0.942	7.858	***
126	- Rubidoux	4.400	0.942	7.858	***
4	- Rubidoux	4.400	0.942	7.858	***
66	- Rubidoux	4.400	0.942	7.858	***
118	- Rubidoux	4.200	0.742	7.658	***
81	- Rubidoux	4.200	0.742	7.658	***
108	- Rubidoux	4.000	0.542	7.458	***
1	- Rubidoux	4.000	0.542	7.458	***
2	- Rubidoux	4.000	0.542	7.458	***

Continuação ANEXO 3

59	- Rubidoux	3.800	0.342	7.258	***
18	- Rubidoux	3.800	0.342	7.258	***
172	- Rubidoux	3.800	0.342	7.258	***
56	- Rubidoux	3.800	0.342	7.258	***
106	- Rubidoux	3.800	0.342	7.258	***
113	- Rubidoux	3.600	0.142	7.058	***
160	- Rubidoux	3.600	0.142	7.058	***
183	- Rubidoux	3.600	0.142	7.058	***
15	- Rubidoux	3.400	-0.058	6.858	
177	- Rubidoux	3.400	-0.058	6.858	
7	- Rubidoux	3.400	-0.058	6.858	
163	- Rubidoux	3.400	-0.058	6.858	
5	- Rubidoux	3.200	-0.258	6.658	
121	- Rubidoux	3.000	-0.458	6.458	
17	- Rubidoux	3.000	-0.458	6.458	
193	- Rubidoux	3.000	-0.458	6.458	
54	- Rubidoux	3.000	-0.458	6.458	
125	- Rubidoux	2.800	-0.658	6.258	
109	- Rubidoux	2.800	-0.658	6.258	
161	- Rubidoux	2.800	-0.658	6.258	
149	- Rubidoux	2.800	-0.658	6.258	
132	- Rubidoux	2.800	-0.658	6.258	
143	- Rubidoux	2.600	-0.858	6.058	
37	- Rubidoux	2.600	-0.858	6.058	
146	- Rubidoux	2.400	-1.058	5.858	
140	- Rubidoux	2.400	-1.058	5.858	
42	- Rubidoux	2.400	-1.058	5.858	
137	- Rubidoux	1.800	-1.658	5.258	
135	- Rubidoux	1.800	-1.658	5.258	
104	- Rubidoux	1.800	-1.658	5.258	
191	- Rubidoux	1.800	-1.658	5.258	
101	- Rubidoux	1.600	-1.858	5.058	
139	- Rubidoux	1.600	-1.858	5.058	
151	- Rubidoux	1.600	-1.858	5.058	
176	- Rubidoux	1.400	-2.058	4.858	
8	- Rubidoux	1.200	-2.258	4.658	
150	- Rubidoux	1.200	-2.258	4.658	
147	- Rubidoux	1.200	-2.258	4.658	
23	- Rubidoux	1.200	-2.258	4.658	
102	- Rubidoux	1.000	-2.458	4.458	
184	- Rubidoux	1.000	-2.458	4.458	
80	- Rubidoux	1.000	-2.458	4.458	
133	- Rubidoux	1.000	-2.458	4.458	
62	- Rubidoux	0.800	-2.658	4.258	
128	- Rubidoux	0.800	-2.658	4.258	
130	- Rubidoux	0.800	-2.658	4.258	
166	- Rubidoux	0.600	-2.858	4.058	
57	- Rubidoux	0.600	-2.858	4.058	
154	- Rubidoux	0.400	-3.058	3.858	
110	- Rubidoux	0.400	-3.058	3.858	
114	- Rubidoux	0.400	-3.058	3.858	
142	- Rubidoux	0.200	-3.258	3.658	
70	- Rubidoux	-0.200	-3.658	3.258	
73	- Rubidoux	-0.600	-4.058	2.858	

ANEXO 4 Análise de variância para os dados de lesão na segunda época comparando Híbridos com Sunki

Teste t de Dunnett

Nota: Esse teste controla o erro tipo 1 para comparação de todos os tratamento contra o controle

Alpha	0,05
Grau liberdade do resíduo	372
Quadrado médio do resíduo	2,7483872
Valor crítico do teste de t de Dunnett	3,29796
Diferença mínima significativa	3,4579

As comparações significativa ao nível de 0,05 são indicadas por ***

COMPARAÇÃO HÍBRIDOS		Diferença entre médias	Simultaneous 95% Confidence Limits		
47	- Sunki	1.600	-1.858	5.058	
141	- Sunki	-0.800	-4.258	2.658	
189	- Sunki	-1.200	-4.658	2.258	
187	- Sunki	-1.800	-5.258	1.658	
145	- Sunki	-1.800	-5.258	1.658	
68	- Sunki	-2.000	-5.458	1.458	
10	- Sunki	-2.200	-5.658	1.258	
20	- Sunki	-2.200	-5.658	1.258	
148	- Sunki	-2.400	-5.858	1.058	
6	- Sunki	-2.400	-5.858	1.058	
19	- Sunki	-2.400	-5.858	1.058	
77	- Sunki	-2.600	-6.058	0.858	
117	- Sunki	-2.600	-6.058	0.858	
14	- Sunki	-2.800	-6.258	0.658	
31	- Sunki	-2.800	-6.258	0.658	
136	- Sunki	-3.000	-6.458	0.458	
129	- Sunki	-3.000	-6.458	0.458	
11	- Sunki	-3.000	-6.458	0.458	
192	- Sunki	-3.000	-6.458	0.458	
124	- Sunki	-3.200	-6.658	0.258	
179	- Sunki	-3.400	-6.858	0.058	
119	- Sunki	-3.400	-6.858	0.058	
152	- Sunki	-3.400	-6.858	0.058	
105	- Sunki	-3.600	-7.058	-0.142	***
144	- Sunki	-3.600	-7.058	-0.142	***
134	- Sunki	-3.800	-7.258	-0.342	***
26	- Sunki	-3.800	-7.258	-0.342	***
116	- Sunki	-3.800	-7.258	-0.342	***
126	- Sunki	-3.800	-7.258	-0.342	***
4	- Sunki	-3.800	-7.258	-0.342	***
66	- Sunki	-3.800	-7.258	-0.342	***
118	- Sunki	-4.000	-7.458	-0.542	***
81	- Sunki	-4.000	-7.458	-0.542	***
108	- Sunki	-4.200	-7.658	-0.742	***
1	- Sunki	-4.200	-7.658	-0.742	***
2	- Sunki	-4.200	-7.658	-0.742	***
59	- Sunki	-4.400	-7.858	-0.942	***

Continuação ANEXO 4

18	- Sunki	-4.400	-7.858	-0.942	***
172	- Sunki	-4.400	-7.858	-0.942	***
56	- Sunki	-4.400	-7.858	-0.942	***
106	- Sunki	-4.400	-7.858	-0.942	***
113	- Sunki	-4.600	-8.058	-1.142	***
160	- Sunki	-4.600	-8.058	-1.142	***
183	- Sunki	-4.600	-8.058	-1.142	***
15	- Sunki	-4.800	-8.258	-1.342	***
177	- Sunki	-4.800	-8.258	-1.342	***
7	- Sunki	-4.800	-8.258	-1.342	***
163	- Sunki	-4.800	-8.258	-1.342	***
5	- Sunki	-5.000	-8.458	-1.542	***
127	- Sunki	-5.000	-8.458	-1.542	***
121	- Sunki	-5.200	-8.658	-1.742	***
17	- Sunki	-5.200	-8.658	-1.742	***
193	- Sunki	-5.200	-8.658	-1.742	***
54	- Sunki	-5.200	-8.658	-1.742	***
125	- Sunki	-5.400	-8.858	-1.942	***
109	- Sunki	-5.400	-8.858	-1.942	***
161	- Sunki	-5.400	-8.858	-1.942	***
149	- Sunki	-5.400	-8.858	-1.942	***
132	- Sunki	-5.400	-8.858	-1.942	***
143	- Sunki	-5.600	-9.058	-2.142	***
37	- Sunki	-5.600	-9.058	-2.142	***
146	- Sunki	-5.800	-9.258	-2.342	***
140	- Sunki	-5.800	-9.258	-2.342	***
42	- Sunki	-5.800	-9.258	-2.342	***
137	- Sunki	-6.400	-9.858	-2.942	***
135	- Sunki	-6.400	-9.858	-2.942	***
104	- Sunki	-6.400	-9.858	-2.942	***
191	- Sunki	-6.400	-9.858	-2.942	***
101	- Sunki	-6.600	-10.058	-3.142	***
139	- Sunki	-6.600	-10.058	-3.142	***
151	- Sunki	-6.600	-10.058	-3.142	***
176	- Sunki	-6.800	-10.258	-3.342	***
8	- Sunki	-7.000	-10.458	-3.542	***
150	- Sunki	-7.000	-10.458	-3.542	***
147	- Sunki	-7.000	-10.458	-3.542	***
23	- Sunki	-7.000	-10.458	-3.542	***
102	- Sunki	-7.200	-10.658	-3.742	***
184	- Sunki	-7.200	-10.658	-3.742	***
80	- Sunki	-7.200	-10.658	-3.742	***
133	- Sunki	-7.200	-10.658	-3.742	***
62	- Sunki	-7.400	-10.858	-3.942	***
128	- Sunki	-7.400	-10.858	-3.942	***
130	- Sunki	-7.400	-10.858	-3.942	***
166	- Sunki	-7.600	-11.058	-4.142	***
57	- Sunki	-7.600	-11.058	-4.142	***
154	- Sunki	-7.800	-11.258	-4.342	***
110	- Sunki	-7.800	-11.258	-4.342	***
114	- Sunki	-7.800	-11.258	-4.342	***
142	- Sunki	-8.000	-11.458	-4.542	***
Rubidoux	- Sunki	-8.200	-11.658	-4.742	***
70	- Sunki	-8.400	-11.858	-4.942	***
73	- Sunki	-8.800	-12.258	-5.342	***