

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

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Phytophthora parasitica* E MAPEAMENTO DE QTLs DE RESISTÊNCIA EM HÍBRIDOS DE *Citrus sunki* vs. *Poncirus Trifoliata* À GOMOSE**

**AMAURI SIVIERO**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU-SP  
Julho - 2001

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Phytophthora parasitica* E MAPEAMENTO DE QTLs DE RESISTÊNCIA EM HÍBRIDOS DE *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* A GOMOSE**

Engenheiro Agrônomo AMAURI SIVIERO

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU-SP

Julho - 2001

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

Siviero, Amauri, 1963  
S624a Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora*  
*parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em hí-  
bridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* a gomose

Amauri Siviero. -- Botucatu, [s.n.], 2001  
x, 114 f.; il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrônômicas  
Orientador: Edson Luiz Furtado  
Inclui bibliografia

1. *Phytophthora parasitica* - Inoculação 2. Frutas  
cítricas - Doenças e pragas 3. Genética quantitativa  
I. Furtado, Edson Luiz II. Universidade Estadual Pau-  
lista Júlio de Mesquita Filho (Campus de Botucatu). Fa-  
culdade de Ciências Agrônômicas IV. Título

Palavras-chave: *Phytophthora parasitica*; Inoculação; Frutas cí-  
tricas; Doenças; Gomose

À minha companheira

Rosana Cavalcante dos Santos

OFEREÇO

Aos meus filhos

Naômi Luana Timm Siviero

André Augusto Siviero

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Furtado, pela orientação e incentivo em todos os momentos.

Ao Pesquisador Dr. Marcos Antonio Machado, pela co-orientação e confiança no nosso trabalho.

A Dra. Mariângela Cristofani, pelas sugestões, dedicação e motivação pelo nosso trabalho.

Aos docentes do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônomicas – Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu.

Aos dirigentes e funcionários do Centro de Citricultura ‘Sylvio Moreira’ – Instituto Agrônomico de Campinas, pela viabilização desta pesquisa.

Aos Pesquisadores Eduardo Feichtenberger e Carlos Ivan Aguilar-Vildoso, pela cessão de isolados do patógeno.

Ao Prof. Dr. Antonio Augusto Franco Garcia, Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’ – Universidade de São Paulo, pelo auxílio nas análises estatísticas e genéticas.

Aos Profs. Alexandre Siqueira Guedes Coelho, Universidade Federal de Goiás e ao Dr. José Raymundo Passos, Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista - Botucatu, pelas valiosas colaborações nas análises estatísticas e genéticas.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

A Companhia Agrícola Botucatu e a Citrolima - Casa Branca, SP pela cessão de mudas para os experimentos.

Aos acadêmicos de agronomia do Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal de São Carlos - Araras, Leonardo Pires Boava e Danilo Valério Barbasso pelo auxílio nos trabalhos.

E a todos que de alguma forma ajudaram este trabalho ser concretizado.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO .....	1
SUMMARY .....	3
1. INTRODUÇÃO .....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA. ....	7
2.1 Importância da gomose dos citros. ....	7
2.2 Doenças de <i>Phytophthora</i> em citros. ....	9
2.3 A gomose dos citros. ....	11
2.4 Controle da gomose dos citros. ....	16
2.5 Resistência genética de genótipos a gomose dos citros. ....	19
2.6 Métodos de inoculação e avaliação de <i>Phytophthora</i> spp. ....	25
2.7 Melhoramento genético de citros. ....	28
2.8 Utilização de marcadores moleculares em estudos de genética e no melhoramento de citros. ....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS. ....	44
3.1 Obtenção e manutenção de isolados de <i>Phytophthora parasitica</i> . ....	44
3.2 Agressividade de isolados de <i>Phytophthora parasitica</i> em <i>Citrus limon</i> e <i>Citrus         limonia</i> . ....	45
3.3 Métodos de inoculação de <i>Phytophthora parasitica</i> . ....	47
3.3.1 Inoculação ‘in vitro’ de <i>Phytophthora parasitica</i> . ....	47
3.3.2 Inoculação de <i>Phytophthora parasitica</i> usando casca destacada. ....	48
3.3.3 Inoculação de <i>Phytophthora parasitica</i> via método do disco, inserção sob casca e contato com tecido. ....	49
3.3.4 Inoculação de <i>Phytophthora.parasitica</i> utilizando disco e palito-de-dente infestado em porta-enxertos de citros. ....	50

3.3.5 Metodologia de inoculação <i>Phytophthora parasitica</i> em plantas jovens usando palito-de-dente e agulha infestados. ....	52
3.4 Multiplicação e manutenção de híbridos e parentais. ....	54
3.4.1 Avaliação da resistência .....	55
3.5 Mapeamento de QTLs ligados ao caráter de resistência a gomose dos citros.....	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO. ....	60
4.1 Agressividade de isolados de <i>Phytophthora parasitica</i> em <i>Citrus limon</i> e <i>Citrus limonia</i> .....	60
4.2 Metodologias de inoculação de <i>Phytophthora parasitica</i> em citros.....	66
4.2.1 Avaliação ‘in vitro’ da resistência de porta-enxertos de citros a gomose. ...	66
4.2.2 Avaliação de gomose dos citros em inoculação em casca destacada.....	68
4.2.3 Avaliação das inoculações de <i>Phytophthora parasitica</i> via método de disco, inserção sob casca e contato em porta-enxertos de citros. ....	69
4.2.4 Inoculações de <i>Phytophthora parasitica</i> via disco e palito-de-dente infestado em porta-enxertos de citros. ....	70
4.2.5 Inoculação de <i>Phytophthora parasitica</i> em plantas jovens usando palito-de-dente e agulha infestada. ....	71
4.3 Inoculação de infestado <i>Phytophthora parasitica</i> em <i>Citrus sunki</i> , e <i>Poncirus trifoliata</i> ‘Rubidoux’ e híbridos. ....	74
4.4 Mapeamento de marcadores moleculares e QTLs ligados ao caráter de resistência a gomose dos citros. ....	80
4.4.1 Identificação de marcadores ligados à resistência a gomose dos citros.....	80
4.4.2 Detecção de marcadores moleculares ligados a QTLs de resistência a gomose dos citros. ....	85
5. ....	92
CONCLUSÕES.....	
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro</b>		<b>Página</b>
1	Reação de alguns genótipos utilizados como porta-enxerto para citros em relação a gomose. ....	20
2	Isolados de <i>Phytophthora parasitica</i> de localidades do Estado de São Paulo, identificação da cultura (LRS e IAC) e data de isolamento. ....	45
3	Relação de genótipos testados, em relação a <i>Phytophthora parasitica</i> , usando os métodos de inoculação da agulha e do palito-de-dente infestado..	53
4	Agressividade de 15 isolados de <i>Phytophthora parasitica</i> , procedentes de localidades do Estado de São Paulo, inoculados em plantas de limão 'Siciliano', avaliada mediante dois métodos de mensuração. ....	61
5	Agressividade de 10 isolados de <i>Phytophthora parasitica</i> , procedentes de localidades do Estado de São Paulo, inoculados em hastes de limão 'Siciliano' e 'Cravo' mediante dois métodos de mensuração. ....	62
6	Classes de diâmetro, número de hastes por diâmetro, média de área lesionada considerando os métodos de medida de área lesionada por <i>Phytophthora parasitica</i> (planímetro e mesa) e os genótipos de citros testados ('Cravo' e 'Siciliano'). ....	64
7	Coefficiente de correlação, equações de curva de regressão linear, valor de F para curvas de regressão das interações entre os fatores, diâmetro de hastes, largura e comprimento de lesões provocadas por <i>Phytophthora parasitica</i> considerando dois métodos de mensuração de lesão em dois genótipos de citros ('Cravo' e 'Siciliano'). ....	64
8	Matrizes de correlação entre as variáveis: largura, comprimento da lesão, métodos avaliação e dois genótipos de citros testados usando dados da inoculação de dez isolados de <i>Phytophthora parasitica</i> . ....	65
	Tamanho médio de lesões provocadas pela inoculação de <i>Phytophthora</i>	

9	<i>parasitica</i> em casca de destacada em porta-enxertos para citros. ....	68
10	Comprimento médio de lesões (mm) provocadas por <i>Phytophthora parasitica</i> em porta-enxertos de citros usando os métodos de inoculação do disco e de inserção sob casca .....	69
11	Médias de lesão de <i>Phytophthora parasitica</i> em mm, obtidas por dois genótipos usando-se dois métodos de inoculação e em duas épocas de avaliação. ....	71
12	Comprimento da lesão, em cm, provocadas por <i>Phytophthora parasitica</i> em plântulas genótipos, utilizando o método da agulha. ....	72
13	Comprimento médio de lesão, em mm, causada por <i>Phytophthora parasitica</i> , em 98 híbridos obtidos do cruzamento entre <i>Citrus sunki</i> vs. <i>Poncirus trifoliata</i> ‘Rubidoux’ (média de 10 repetições). ....	74
14	Quadro de análise de variância dos dados da inoculação de <i>Phytophthora parasitica</i> em híbridos de <i>Citrus sunki</i> vs. <i>Poncirus trifoliata</i> ‘Rubidoux’. ..	76
15	Quadro de análise de variância dos ensaios montados em três diferentes épocas de inoculação de <i>Phytophthora parasitica</i> em híbridos de <i>Citrus sunki</i> vs. <i>Poncirus trifoliata</i> ‘Rubidoux’. ....	76
16	Quadro das esperanças do quadrados médios para ensaio, genótipos e ensaios x genótipos (resíduo).....	79
17	Identificação de ‘primers’ que geraram marcadores ligados à resistência a gomose dos citros em <i>Phytophthora trifoliata</i> ‘Rubidoux’ e <i>Citrus sunki</i> avaliados por dois métodos de análise utilizando o teste F. ....	81
18	Grupo de ligação dos parentais, marcadores moleculares entre o intervalo de mapeamento do QTL, posição absoluta do QTL a partir do telômero esquerdo, em Morgans, proporção da variação fenotípica explicada pelo QTL ( $R^2$ ) e efeito aditivo. (Dados fornecidos pelo programa QTL Cartographer).....	89

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Incidência de plantas doentes e comprimento médio de lesões causadas <i>Phytophthora parasitica</i> em quatro porta-enxertos de citros via inoculação ‘in vitro’. .....	67
2 Distribuição das médias de lesões de gomose causadas por <i>Phytophthora parasitica</i> em híbridos e parentais.....	75
3 Histograma mostrando a distribuição normal das observações fenotípicas dos híbridos resultante do cruzamento entre <i>Citrus sunki</i> vs. <i>Poncirus trifoliata</i> ‘Rubidoux’ inoculados com <i>Phytophthora parasitica</i> . .....	75
4 Gráficos das relações entre ensaios 1, 2 e 3 e a correlação ( $R^2$ ) entre os ensaios 1 x 2, 1 x 3 e 2 x 3. ....	77
5 Mapa genético de <i>Poncirus trifoliata</i> . Os sinais + e – indicam as fases de ligação dos marcadores. Locus com distorção da taxa de segregação esperada de 1:1, estão indicados com asterisco. Setas indicam a posição do QTL de resistência a gomose (Adaptado de Cristofani et al., 1999). .....	83
6 Mapa genético de <i>Citrus sunki</i> . Os sinais + e – indicam as fases de ligação dos marcadores. Locus com distorção da taxa de segregação esperada de 1:1 estão indicados com asterisco. Setas indicam a posição do QTL de resistência a gomose (Adaptado de Cristofani et al., 1999). .....	84
7 Análise do grupo de ligação I do mapa de <i>Poncirus trifoliata</i> ‘Rubidoux’ e a presença de QTL entre 210 e 240 centiMorgans (LOD = 2,9). .....	86
8 Análise do grupo de ligação II do mapa de <i>Poncirus trifoliata</i> ‘Rubidoux’ e a presença de QTL entre as marcas N05_1300 e AV16_1400 (LOD = 2,9). .....	86
9 Análise do grupo de ligação V do mapa de <i>Poncirus trifoliata</i> ‘Rubidoux’ e a presença de QTL entre as marcas 70 e 112 centiMorgans (LOD = 2,9). .....	87
10 Análise do grupo de ligação II do mapa de <i>Citrus sunki</i> e a presença de QTL entre 17 centiMorgans e a marca C11_400 (LOD = 2,6).....	87

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivos selecionar isolados de *Phytophthora parasitica* com alta agressividade em citros, avaliar métodos de inoculação em genótipos quanto à resistência a gomose de *Phytophthora* e detectar marcadores moleculares ligados a locos controladores de características quantitativas (QTLs) de resistência a gomose. Foram testados 15 isolados de *P. parasitica* procedentes do Estado de São Paulo. As plantas foram inoculadas por meio de contato, método do disco, inserção sob casca, agulha e palito-de-dente infestado com o patógeno. Para o trabalho de detecção de marcadores e QTLs foram inoculados 98 indivíduos de uma progênie F<sub>1</sub>, obtida do cruzamento entre *Citrus sunki*, parental suscetível, e *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux', parental altamente resistente ao patógeno. As avaliações fenotípicas da resistência a gomose da progênie foram incorporadas aos mapas de ligação de *P. trifoliata* 'Rubidoux' e *C. sunki*, estabelecidos através de 170 marcadores moleculares do tipo RAPD, usando a estratégia de 'pseudo testcross'. Os isolados apresentaram variação na agressividade quando inoculados em *C. limon* Burmann. e *C. limonia* Osbeck. com destaque para o isolado, LRS23/97. A avaliação de resistência de

genótipos de citros a gomose pode ser realizada em plântulas e 'in vitro', através de inserção de agulha infestada com o patógeno e através do método do disco e da inserção sob casca em plantas com diâmetro acima de 4,0 mm. Os indivíduos da população F<sub>1</sub>, inoculados artificialmente através do método do disco, apresentaram lesões intermediárias em relação aos parentais. A herdabilidade do caráter foi de 18,7%. Foram detectados 36 marcadores moleculares associados à resistência a gomose, dos quais, 19 mapeados em *P. trifoliata* 'Rubidoux' e 10 em *C. sunki*. Foram detectados três QTLs de resistência a gomose nos grupos de ligação I, II e V do mapa de *P. trifoliata* 'Rubidoux' e um QTL no grupo de ligação II em *C. sunki*. A proporção da variação fenotípica, explicada pela associação marcador-QTL de resistência a gomose, variou de 14 a 60% em *P. trifoliata* 'Rubidoux' e foi de 18% em *C. sunki*. Considerando-se as médias de lesão obtidas pelos híbridos, a baixa herdabilidade determinada e a detecção de mais de um QTL de resistência a gomose, pode-se afirmar que a herança da resistência é de natureza quantitativa.

EVALUATION OF INOCULATION METHODS TO *Phytophthora parasitica* AND QTLs RESISTANCE TO *Phytophthora* GUMMOSIS ON *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* HYBRIDS. Botucatu, 2001, 114p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: AMAURI SIVIERO

Adviser: EDSON LUIZ FURTADO

## SUMMARY

The objectives of the study were to select *Phytophthora parasitica* isolates with high aggressivity on citrus, to evaluate inoculation methods and to detect molecular markers linked to resistance QTLs to *Phytophthora* gummosis. Fifteen isolates of *P. parasitica* from the State of São Paulo were tested. Young plants were inoculated and by contact, through the insertion of a disc and tricking infested, needle and toothpick infested with pathogen. For the markers and QTLs detection, 98 individuals of the F<sub>1</sub> progeny obtained from *Citrus sunki*, (susceptible parent) and *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux', (resistant) cross were inoculated. The phenotypic evaluations for *Phytophthora* gummosis resistance were incorporated on genetic linkage maps built with 170 RAPD markers using the pseudotestcross strategy. The isolates showed variation in aggressivity when inoculated on *Citrus limon* Burmann. and *Citrus limonia* Osbeck. The LRS23/97 isolate showed more aggressivity. The citrus genotypes evaluation to resistance to *Phytophthora* gummosis were made in seedlings and 'in vitro' by needle insertion with pathogen, disc insertion method under bark and disc

method in plants with diameter larger than 4,0 mm. The F<sub>1</sub> hybrids, which were artificially inoculated by disc method, showed intermediates symptoms compared to the parents. The heretability of *Phytophthora* gummosis resistance was 18,7%. 36 molecular markers were associated to *Phytophthora* gummosis resistance and 19 were associated with *P. trifoliata* 'Rubidoux' map and 10 with *C. sunki* map. It was also detected 3 QTLs linked to *Phytophthora* gummosis resistance on I, II and V linkage groups of *P. trifoliata* 'Rubidoux' map and 1 QTL on II linkage group of *C. sunki* map. The phenotypic variation ratio explained by association markers-QTLs, was in a range of 14 to 60% for *P. trifoliata* 'Rubidoux' and was 18% for *C. sunki*. Considering, the average lesion showed by the hybrids, the low character of heretability and the detection of more than 1 QTL linked to citrus *Phytophthora* gummosis, the resistance showed a inheritance of resistance is quantitative character.

---

Keywords: citrus disease - genetic mapping – *Phytophthora* foot rot

## 1. INTRODUÇÃO

Os citros (*Citrus* spp.) é uma das mais importantes culturas, dentro do setor agro-industrial do Brasil, em termos econômicos e sociais, gerando importantes divisas para o País. As doenças, entre outros fatores, podem afetar a citricultura causando prejuízos na produção e demandando recursos para proteção e controle em viveiros e pomares. Entre as principais doenças estão aquelas causadas por *Phytophthora* spp. onde se destaca a gomose de *Phytophthora* e a podridão de radículas causadas, notadamente por *Phytophthora parasitica* Dastur.

As principais estratégias de controle da gomose são: plantio de mudas saudáveis, evitar plantio em áreas infestadas com o patógeno, com excesso de umidade do solo, controle cultural evitando ferimentos nas plantas, aumento dos teores de matéria orgânica do solo e controle químico com uso de produtos sistêmicos. No entanto, o uso de cultivares resistentes é o método mais econômico e eficiente de controle da gomose.

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 a gomose, tolerância à podridão de radículas e ainda resistência ao vírus da tristeza dos citros (CTV), declínio e nematóides.

A diversificação de porta-enxertos na citricultura brasileira é uma necessidade, haja vista que mais de 85% das plantas cítricas estão assentadas sobre o porta-enxerto de limoeiro 'Cravo', moderadamente resistente a gomose. Esta realidade se apresenta como um risco aos produtores quando se recorda a catástrofe dos anos quarenta com a chegada do CTV ao Brasil, dizimando milhões de plantas cítricas assentadas praticamente sobre um único porta-enxerto, a laranja 'Azeda', resistente a gomose.

O estudo de locos controladores de características quantitativas (QTLs) associado ao uso de mapas genéticos obtidos por marcadores moleculares permite identificar, mapear e quantificar o efeito dos QTLs. 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 do mapa (Tanksley, 1993).

O presente estudo teve como objetivos: selecionar isolados de *Phytophthora parasitica* com alta agressividade em plantas cítricas, estabelecer métodos precoce de inoculação e avaliação e detectar marcadores moleculares ligados a locos controladores de características quantitativas para resistência a gomose.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância da gomose dos citros

O gênero *Citrus* apresenta espécies de importância econômica, incluindo laranja doce (*Citrus sinensis*), tangerinas (*C. reticulata*), limões (*C. limon*), limas (*C. aurantium*) e pomelos (*C. paradisi*). Os citros são originários do sudeste asiático, sendo a espécie frutífera mais plantada no mundo. A cultura dos citros é uma das mais importantes na economia brasileira sob ponto de vista econômico e social.

A produção de citros na safra de 98/99 girou em torno de 387.725.000 de caixas de 40,8kg. O Estado de São Paulo é o maior produtor do Brasil onde se concentram cerca de 76% das plantas cítricas, contando com aproximadamente 201.940.000 de árvores em produção e ocupando uma área calculada em 796.265 ha. Aproximadamente 62% da produção nacional é destinada à exportação na forma de suco concentrado para Europa, Estados Unidos da América (EUA) e Japão, gerando importantes divisas para o País. Outra parte da produção é consumida 'in natura' ou na forma de sucos no mercado interno e uma pequena parte (1%) é exportada como fruta fresca (Amaro, 1999).

Os principais fatores que afetam a produção de citros são fertilidade do solo, clima, irrigação, combinação copa/porta-enxerto e os problemas fitossanitários, principalmente doenças. Atualmente existem descritas mais de 35 doenças de importância econômica que afetam a cultura de citros. Dentre elas se destaca a gomose, causada notadamente por *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora*. O agente causador da gomose está difundido 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).

*Phytophthora* spp. é habitante do solo e provoca doenças no colo, raízes e radículas das plantas cítricas. As folhas dos citros são atacadas mais frequentemente em viveiros e, em pós-colheita, o patógeno causa de podridão parda do fruto.

O estudo das doenças provocadas por *Phytophthora* em citros está intimamente ligado ao estudo de porta-enxerto. O porta-enxerto exerce grande influência e modificações na cultivar-copa como vigor, produção, qualidade dos frutos, nutrição e resistência a pragas e doenças. No caso específico do Brasil, acrescenta-se a tolerância à seca, acidez, alta saturação de alumínio, baixa saturação de cálcio e declínio (Pompeu Jr, 1991). Castle et al. (1993) agruparam as características inerentes ao porta-enxerto das plantas cítricas em três tópicos: características ligadas ao processo de embrião nucelar; características hortícolas como porte, produção e tamanho de fruto, qualidade de suco, supressão de juvenildade, compatibilidade com diversas copas, nutrição, resistência e/ou tolerância ao frio, seca, encharcamento, salinidade, alcalinidade e características fitossanitárias como resistência/tolerância a *Phytophthora* spp., ao vírus da tristeza dos citros (CTV), aos nematóides (*Tylenchulus semipenetrans*, *Radopholus similis* e *Pratylenchus* sp.) e ao declínio.

A evolução histórica do uso de porta-enxertos na citricultura brasileira está diretamente ligada a ocorrência das doenças gomose, tristeza e declínio. O primeiro porta-enxerto utilizado em grande escala no Brasil foi a laranja 'Caipira' que é suscetível a gomose e possui baixa resistência a seca. Devido à alta suscetibilidade a gomose, o porta-enxerto laranja 'Caipira' foi substituído pela laranja 'Azeda', que embora resistente a gomose, é altamente suscetível à tristeza quando utilizado como porta-enxerto de laranja doce.

Na década de 40 com o aparecimento da tristeza forçou a substituição de porta-enxerto de laranja ‘Azeda’, resistente a *Phytophthora* spp., por porta-enxertos, resistentes à tristeza, no entanto mais suscetíveis a gomose, como 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 limão ‘Cravo’, promoveu uma tímida diversificação de porta-enxerto limão ‘Cravo’ para porta-enxertos de tangerinas ‘Sunki’ e ‘Cleópatra’, que apresentam alto grau de tolerância ao declínio, no entanto, são suscetíveis a gomose (Pompeu Jr., 1991; Feichtenberger, 2001).

Atualmente, 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).

Trabalhos de genética e melhoramento dos citros têm sido realizados visando à seleção de cultivares de citros superiores e principalmente associados à obtenção de materiais resistentes às principais doenças dos citros. No entanto, até o presente não se observam estudos específicos relacionados à herança da resistência no patossistema citros-*Phytophthora*.

## **2.2 Doenças de *Phytophthora* em citros**

Os avanços da biologia molecular, química e bioquímica promoveram importantes mudanças na micologia e na classificação de fungos. 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*, *Plasmopara* 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'.

Atualmente, 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). De todas as espécies de *Phytophthora* relatadas em citros apenas duas, *P. parasitica* e *P. citrophthora*, estão identificadas como causadoras da maioria das doenças do complexo *Phytophthora* - citros, provocando prejuízos da ordem de milhões de dólares no mundo. As perdas na produção causadas por doenças do complexo *Phytophthora* - citros nos EUA variam de 20 a 26% (Broadbent, 1977). O prejuízo total avaliado no combate preventivo e curativo às doenças provocadas pelo gênero *Phytophthora* em citros ultrapassa 76 milhões de dólares anualmente (Erwin & Ribeiro, 1996).

As espécies de *Phytophthora* mais importantes relacionadas com doenças em citros são: *P. citrophthora* (R.E. Smith. & E.H. Smith.) Leonian. e *P. nicotianae* (Breda de Haan) (Tucker) var. *parasitica* (Dastur) Waterh. (sinonímia de *P. parasitica*). *P. 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. A espécie *P. parasitica* ocorre mais freqüentemente em regiões quentes e subtropicais do mundo, sendo descrita atacando mais de 400 espécies de plantas. Em citros, *P. parasitica*, ataca principalmente as raízes e radículas sendo menos freqüente na parte aérea das plantas. 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).

O tombamento de mudas em viveiros pode ocorrer em pré e pós-emergência das plântulas cítricas. Entre os agentes causadores de tombamento destacam-se: *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. e *Rhizoctonia solani*, todos afetando tecidos da região do colo das mudas. Em plantas cultivadas, em regime de céu aberto e em viveiros contaminados com o patógeno, é comum a ocorrência de podridões de raízes e radículas em mudas, lesões cloróticas (anasarca) e necróticas em folhas, brotações novas e hastes tenras. As infecções são mais freqüentes em anos de chuva intensa no outono/inverno (Feichtenberger, 2001).

A podridão de radículas dos citros comum em viveiros, pomares novos e adultos, foi primeiramente reconhecida como doença importante do patossistema citros – *Phytophthora*, por Fraser (1942). A podridão de radículas é causada por *P. parasitica* e *P. citrophthora* ocorre em nível da superfície e/ou imediatamente abaixo da superfície do solo. Os sintomas típicos da doença são: podridão das radículas e de raízes finas nutridorais, exsudação de goma, escurecimento e morte de tecidos da casca das radículas provocando redução significativa no número de radículas de plantas suscetíveis/intolerantes, amarelecimento da planta, seca e morte da muda e de plantas atacadas (Graham & Timmer, 1992; Graham, 1995).

A podridão parda dos frutos, causada por diversas espécies de *Phytophthora*, ocorre no pomar antes da colheita em frutos localizados no terço inferior da planta. A infecção nos frutos se dá por esporos móveis (zoósporos) do patógeno que são carregados do solo para a parte aérea das plantas via respingos de água. Os frutos contaminados apresentam uma podridão seca e odor característico. Os sintomas iniciais são lesões pequenas de cor marrom aumentando de tamanho posteriormente atingindo grandes áreas do fruto (Broadbent, 1977; Timmer et al., 2000).

### **2.3 A gomose dos citros**

A gomose, causada notadamente por *P. parasitica*, é uma das principais doenças dos citros e ocorre em todas as regiões citrícolas do mundo (Graham & Timmer, 1992). No Brasil, *P. citrophthora* e *P. parasitica* são os causadores da gomose, sendo que *P. parasitica* predomina na grande maioria de viveiros e pomares comerciais (Feichtenberger, 2001).

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. Entretanto, 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*.

As principais espécies de *Phytophthora* causadoras de gomose são *P. parasitica* e *P. citrophthora*. As espécies *P. parasitica* e *P. citrophthora* possuem características como: micélio cenocítico, em geral heterotáticas, produz esporângios papilados, persistentes, piriformes a esféricos e estruturas sexuais femininas (oogônio) e masculinas (anterídeo, do tipo anfígeno) diferenciadas do micélio que dão origem ao oósporo (esporo sexual), ausência de vesículas na liberação de zoósporos (esporo assexual, móvel), fase vegetativa diplóide sendo a fase haplóide efêmera, possuem esporângio apical e papilado, normalmente persistente. Muitos isolados formam clamidósporos (estrutura vegetativa com função de sobrevivência) parede espessa, com habilidade de sobrevivência em solos e em matéria orgânica em decomposição através de micélio, esporângios, zoósporos, cistos, clamidósporos e oósporos (Watanabe, 1994; Erwin & Ribeiro, 1996; Feichtenberger, 2001).

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 (Graham & Timmer, 1992). 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).

A diferenciação das espécies de *Phytophthora* associadas a gomose dos citros pode ser feita por métodos morfológicos, moleculares e pela curva de crescimento 'in vitro' em diferentes temperaturas. 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).

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.

Aguilar-Vildoso (1997) estudou a variabilidade de isolados de *P. parasitica* de citros procedentes do Estado de São Paulo usando morfologia, marcadores moleculares do tipo RAPD ('Random Amplified Polymorphic DNA') e sensibilidade a fungicidas. O autor encontrou diferenças quanto às dimensões de esporângios, capacidade de produção de clamidósporos e verificando que os marcadores RAPD são eficientes na distinção de isolados do patógeno.

O diagnóstico preciso de *Phytophthora* do solo e das raízes de citros pode ser realizado pelo teste imunológico de ELISA 'Enzyme-liked 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 asépticamente seccionada em pedaços, com auxílio de bisturi e transferidos 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).

O método da isca é eficiente na detecção qualitativa do patógeno no solo (Grimm & Alexander, 1973). O grau de infestação de *Phytophthora* no solo pode ser estimado quantitativamente via técnica de diluição em série associada ao método da isca (Tsao & Ocana, 1969). Matheron & Matejka (1992), quantificaram o nível de propágulos de *Phytophthora* via contagem de esporângios em discos de meio da cultura contaminado com o patógeno. Gautam et al. (1999) desenvolveram anticorpos monoclonais para espécies de *Phytophthora* que, associados a técnicas colorimétricas, conseguem detectar qualitativa e quantitativamente espécies de *Phytophthora* a partir de 10 propágulos por mL.

Os principais sintomas da gomose no campo são: morte de tecidos internos da casca e do lenho visível 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).

Alguns patógenos dos citros provocam sintomas parecidos com aqueles da gomose de *Phytophthora*, em viveiros e no campo, gerando confusão e diagnósticos incorretos. A exsudação de goma pela casca ou raiz dos citros pode ser provocada pelos patógenos fúngicos: *Dothiorella gregaria*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rosellinia* spp., *Macrophomina* sp., *Botrytis cinerea*, *Armillaria mellea*, *Corticium salmonicolor*, *Diaporthe* spp., *Phomopsis* spp.; pelo vírus do exocorte ou ainda por ferimentos provocados por nematóides, afídeos, insetos, produtos químicos e pelo homem, via ferramentas e equipamentos (Fawcett, 1936; Feichtenberger, 2001).

As condições favoráveis à infecção e desenvolvimento da doença são principalmente alta temperatura, umidade relativa do ar e umidade do solo. 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. Matheron & Matejka (1992) observaram que a temperatura tem grande

influência no crescimento 'in vitro' do patógeno, esporulação e no desenvolvimento de lesões. 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. O crescimento radial do patógeno 'in vitro' varia entre 15-30°C e 20-35°C para *P. citrophthora* e *P. parasitica*, respectivamente. Os zoósporos de *Phytophthora* conseguem sobreviver em água com mobilidade ativa até por 20 horas a 20°C (Stolzy et al., 1965).

Solos pesados e mal drenados, técnicas e manejo de irrigação incorreto podem aumentar o desenvolvimento da doença. Segundo Stolzy et al. (1965), 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. Feld et al. (1990) destacam que métodos de irrigação por superfície como sulco e aspersão aumentam o risco de disseminação do patógeno e devem ser evitados.

A presença de outros patógenos como viroses, espécie do patógeno e o estado de vegetação são fatores que influenciam o desenvolvimento da gomose. Mello et al. (1971) demonstraram que lesões provocadas por *Phytophthora* são maiores nas plantas de clones nucelares (isentas de sorose, exocorte e xiloporose) quando comparadas àquelas produzidas em plantas da mesma cultivar oriunda de clone velho.

Rossetti & Bitancourt (1951) demonstraram que o desenvolvimento da gomose é influenciado pelo estado de vegetação da planta. Segundo os autores, as plantas que apresentam atividade fisiológica ativa, ou seja, brotações novas, maior vigor vegetativo, e expressiva circulação nos vasos da casca produzem maiores lesões de *Phytophthora* spp. Os mesmos autores afirmam que as variações nos tamanhos de lesões provocadas em inoculações de *Phytophthora* observadas entre e dentro de plantas cítricas da mesma cultivar pode ser atribuída à atividade fisiológica da casca no local de inoculação.

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. O pomeleiro 'Marsh Seedless', quando usado como porta-enxerto para laranja 'Baianinha' apresentou alta suscetibilidade a *Phytophthora*, no entanto, a doença não se manifestou quando a cultivar usada como enxerto foi a laranja 'Pêra'. 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. Vanderweyen (1980) obteve resultados semelhantes no campo, em experimentos conduzidos na África.

No campo é comum observar plantas fortemente atacadas com gomose no meio de plantas saudias o que pode ser explicado, em parte, pelo aspecto genético, quando a semente do porta-enxerto utilizada é de origem não nucelar, ou seja, um híbrido.

## 2.4 Controle da gomose dos citros

Medidas de controle cultural resumem-se em evitar o enterrio profundo das mudas, evitar plantios em locais de alta umidade do solo e do ar, restringir uso de grades pesadas, evitar qualquer ferimento na planta, adoção de medidas de exclusão como escolha do local de plantio, plantio de mudas saudias, inspeções, tratamento da água de irrigação, desinfecção de implementos e ferramentas, instalação de rodoluvios e pediluvios na propriedade, promover o arejamento do colo das plantas através da remoção física do solo, quebra-ventos, manejo adequado do mato e cirurgia (Feichtenberger, 2001). A adição de fontes de matéria orgânica em substratos comerciais em mudas e no campo (Amorim, 1997) e a prática da enxertia alta (Koller et al., 1983) completam o conjunto de medidas de controle cultural de gomose.

O controle químico de *Phytophthora* spp. visa reduzir a população do patógeno via aplicação de produtos sistêmicos como metalaxyl ('RIDOMIL') e fosetyl-Al ('ALIETTE'). Farih et al., (1981) afirmam que o metalaxyl mata diretamente o patógeno, reduz a população do patógeno na rizosfera sendo, pois, eficiente no controle de *P. parasitica* aplicado em pulverização, pincelamento de tronco ou em rega. Os mesmos autores afirmam que o produto fosetyl-Al, um precursor do ácido fosforoso ( $H_3PO_3$ ) em tecido vegetal, é eficiente no combate a gomose provocada por *P. citrophthora* e apresenta ação fungistática, sendo incapaz de matar estruturas do patógeno no solo e na planta.

May (1994) concluiu que o metalaxyl foi o melhor fungicida para controlar *P. parasitica* sendo altamente eficiente na erradicação do patógeno 'in vitro' e em substratos para produção de mudas. No entanto, o mesmo autor conseguiu recuperar *P. parasitica* de substratos de plantas cítricas tratadas com fosetyl-Al.

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). Afek & Szejberg (1989) apresentam duas hipóteses para o modo de ação do fosetyl-Al nas plantas: em baixa concentração, a substância estimula os mecanismos de defesa da planta, via produção de fitoalexinas e, quando presente em altas concentrações, degrada-se em ácido fosforoso, que é altamente tóxico a *Phytophthora*.

O controle químico é adotado levando-se em consideração a densidade de inóculo no solo, ou seja, os níveis de infestação de propágulos de *Phytophthora* do solo. O nível de 0,5 propágulo de *Phytophthora* por cm<sup>3</sup> de solo é considerado baixo, 5 a 15 moderado e acima de 20 propágulos/cm<sup>3</sup> é alto, exigindo aplicação de produtos químicos e outras medidas de controle (Timmer et al., 1993).

Smith & Teague (1989) realizaram estudo analisando o retorno econômico da aplicação de produtos químicos no combate a gomose em pomares de citros nos EUA e concluíram que o tratamento químico de rotina recomendado de controle da doença é antieconômico.

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 (Amorim, 1997).

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.

Widmer et al. (1998) observaram redução de até 95% na infecção de *P. parasitica* em mudas cítricas quando se adicionou composto orgânico oriundo de lixo doméstico no substrato de plantio na proporção de 20% em volume.

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. May (1994), estudou a viabilidade do uso da solarização no controle de *P. parasitica* em mudas cítricas e concluiu que uso de coletor solar foi eficiente na redução de propágulos de *P. parasitica*. 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 medida da terapia, via cirurgia mediante 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. Cohen et al. (1964) conseguiram recuperar até 85% de plantas novas infectadas com *Phytophthora* no campo através de tratamento cirúrgico e aplicação de fungicidas cúpricos de contato.

Shea & Broadbent (1983) salientam que o controle de patógenos do solo como *Phytophthora* é bastante difícil, embora este gênero seja um mal competidor com outros microrganismos do solo. O desenvolvimento de métodos de controle de *Phytophthora* baseado na manipulação do ambiente como microbiano, químico e físico do solo desfavorecendo a população de *Phytophthora* em detrimento de outras, é limitado pela falta de dados sobre a variação temporal e espacial do grau de infestação do patógeno, sobre o ambiente e sobre a resposta na população do patógeno em relação ao tratamento adotado.

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 genética de genótipos a gomose dos citros

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). Fawcett (1923), inoculando mudas e plantas no campo, observou que plantas de *C. aurantium* (laranja 'Azeda') e *P. trifoliata* foram resistentes e enquanto que *C. grandis* (toranja) e *C. sinensis* (laranja doce) se comportaram como suscetíveis ao patógeno, na época, denominado *Pythiacystis citrophthora*.

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 (Quadro 01).

Quadro 01. Reação de alguns genótipos utilizados como porta-enxerto para citros em relação a gomose.

Genótipos	Alta resistência	Resistente	Moderada suscet..	Suscetível	Alta suscet.
limão ‘Cravo’ ( <i>C. limonia</i> )		6*,2	1,4,5,7,8, 10, 11		
limão ‘Rugoso’ ( <i>C. jambhiri</i> )			9,10	2,3,5,12	1,8
limão verdadeiro ( <i>C. limon</i> )				3	2,5,9, 11
limão ‘Volkameriano’ ( <i>C. volkameriana</i> )			1,2, 6	4,12	
tang. ‘Sunki’ ( <i>C. sunki</i> )			2,4,6	1	
tang. ‘Cleópatra’ ( <i>C. reshni</i> )		1,2, 11	3,4,7,12	6,10	
lima ‘Pérsia’ ( <i>C. limmettooides</i> )				5,7,	
trifoliata ( <i>P. trifoliata</i> )	1,2,6,7,8, 9, 10,12	3			
macrofila ( <i>C. macrophylla</i> )		2, 8,12			
citranges ( <i>P. trifoliata</i> vs. <i>C. sinensis</i> )	4,5,12	1,2,7, 10	3,8,11		
citrumelo ( <i>P. trifoliata</i> vs. <i>C. paradisi</i> )	12	8	4		
tangelo ‘Orlando’ ( <i>C. paradisi</i> vs. <i>C. reticulata</i> )			1,2,6	4	
laranja ‘Azeda’ ( <i>C. aurantium</i> )	2,4,8,9, 11	1,3,6,7, 10,12			
laranja ‘Caipira’ ( <i>C. sinensis</i> )				2,5, 9	7,8
laranja ( <i>C. sinensis</i> )				2,3,5, 11	1,4,10 8,12
pomelo ( <i>C. paradisi</i> )			5, 11	2, 9	

\*1 Carlos et al. (1997), 2 Feichtenberger (2001), 3 Hearn et al. (1974), 4 Rondon et al. (1993), 5 Rossetti (1947), 6 Pompeu Jr. (1991), 7 Salibe (1974), 8 Timmer et al. (2000), 9 Fawcett (1923), 10 Castle et al. (1993), 11 Klotz & Fawcett (1930) e 12 Matheron et al. (1998).

Observando atentamente o Quadro 01 nota-se que um mesmo genótipo pode ser classificado em mais de uma categoria de resistência/suscetibilidade a *Phytophthora* spp. fato que pode estar relacionado a diversos fatores bióticos e abióticos envolvidos no patossistema *Phytophthora*-citros.

Alguns porta-enxertos de citros apresentam elevada resistência a *Phytophthora* (Quadro 01) e são largamente utilizados na citricultura dos EUA como *P. trifoliata* e seu híbridos, citrumelos e a laranja ‘Azeda’ (Castle et al., 1993). No entanto, os porta-enxertos *P. trifoliata* e seus híbridos são pouco difundidos no Brasil em função de problemas de incompatibilidade com a laranja ‘Pêra’, cultivar mais comum no Brasil (Teófilo

Sobrinho, 1991). No caso específico da laranja ‘Azeda’, a suscetibilidade ao vírus da tristeza dos citros limita o seu uso no Brasil (Müller & Costa, 1993), além da intolerância à podridão de radículas (Graham, 1995).

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; Ippolito 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). As diferenças na patogenicidade de isolados de *P. parasitica* em citros foram relatadas por Klotz et al., (1958) e Grimm & Whidden (1962).

Matheron & Matejka (1992) descrevem três fatores responsáveis pelos conflitos na classificação de genótipos de citros quanto à resistência e/ou suscetibilidade a *Phytophthora*: tipo de patologia em estudo (gomose ou podridão de radículas), espécie de *Phytophthora* envolvida no estudo (*P. parasitica* e *P. citrophthora*) e fatores bióticos e abióticos envolvidos no patossistema citros-*Phytophthora*. Para compensar ou minimizar a influência dos diversos efeitos ligados ao patossistema citros-*Phytophthora*, os autores sugerem que experimentos em laboratório, casa de vegetação e campo devem ser conduzidos em diferentes localidades, variando vigor, nutrição e idade da planta e empregando-se diferentes métodos de inoculação e avaliação. Os mesmos autores demonstraram que resistência à colonização de tecidos vegetais de plantas a *Phytophthora* spp. varia de acordo com a estação do ano. Nos EUA, o desenvolvimento de lesões de *Phytophthora* spp. nos tecidos é reduzida no inverno e máxima no verão.

A resistência/suscetibilidade do porta-enxerto exerce influência sobre a população de *Phytophthora* do solo. Em solos cultivados com porta-enxerto resistente a gomose observou-se diminuição drástica da população de *P. parasitica* na rizosfera das plantas (Agostini et al., 1991). Um nível alto de propágulos do patógeno no solo (15–25 propágulos do pseudofungo/cm<sup>3</sup>) pode induzir doença inclusive em genótipos resistentes (Lutz

& Menge, 1991). Graham (1990) afirma que 1,0 propágulo de *P. parasitica* por cm<sup>3</sup> de solo é capaz de induzir doença nas plantas e acrescenta que *P. trifoliata* e citrumelo ‘Swingle’ são intolerantes a *Phytophthora* quando plantados em solos contendo até 10 propágulos de *P. parasitica* por cm<sup>3</sup> de solo.

A resistência de um porta-enxerto a gomose - ‘Foot rot’ ou ‘*Phytophthora gummosis*’, nem sempre corresponde com a resistência à podridão de radículas - ‘Root rot’. Os genótipos citrumelo ‘Swingle’ e *C. macrophylla* são classificados como resistentes às infecções de tronco e de raízes. A laranja ‘Azeda’ é classificada mundialmente como resistente a infecções de tronco, no entanto é intolerante à podridão de radículas (Furr & Carpenter, 1961; Carpenter & Furr, 1962; Grimm & Hutchison, 1973; Graham, 1990). Graham (1990) classificou os genótipos com relação à podridão de radículas em três grupos: tolerantes (*P. trifoliata* e citrumelo ‘Swingle’), suscetíveis: citrange ‘Carrizo’, tangerina ‘Cleópatra e laranjas doce e limão rugoso como intermediário.

Os porta-enxertos limão ‘Cravo’, laranja ‘Azeda’, tangerinas ‘Sunki’ e ‘Cleópatra’ e citrange ‘Carrizo’ são classificados como moderadamente tolerantes ou intolerantes à podridão das radículas/raízes. No entanto, citrange ‘Carrizo’, laranja ‘Azeda’ e limoeiro ‘Cravo’ são classificados como resistentes e/ou moderadamente resistentes a gomose (Carvalho, 2000; Feichtenberger, 2001).

A podridão de radículas no Brasil assume menor importância em relação às infecções de tronco de *Phytophthora* devido à baixa utilização da irrigação dos pomares, tipo de solo, matéria orgânica do solo e a coincidência entre o período de inverno com o período seco. As condições desfavoráveis à ocorrência de podridão de radículas no Brasil e a grande importância das infecções de tronco por *Phytophthora* geram maior preocupação dos produtores e estudos acadêmicos focalizando a gomose do tronco (Feichtenberger, 2001).

Matheron & Matejka (1992) ressaltam que os resultados obtidos sobre a resistência de genótipos a *Phytophthora* em testes artificiais (laboratório e casa de vegetação) nem sempre correspondem à resistência de genótipos no campo. Os autores encontraram maiores lesões provocadas por *Phytophthora* em inoculações de laranja ‘Azeda’ quando comparadas com lesões de limão rugoso em teste controlado. No campo a situação se inverteu, as lesões de *Phytophthora* foram sempre maiores nas inoculações em limão rugoso.

Em muitos casos a tolerância de genótipos à podridão de radículas é aceitável como indicador para resistência a gomose (Carpenter & Furr, 1962; Graham, 1990).

Carvalho (2000) detectou que *P. trifoliata* é resistente às infecções de tronco e tolerante às infecções de raízes provocadas por *P. parasitica* e que este genótipo transmite mais acentuadamente a característica de resistência a gomose e a tolerância à podridão de radículas aos descendentes quando comparado com a laranja ‘Azeda’ constituindo um fator de grande importância para programas de melhoramento da cultura.

Embora a literatura esteja repleta de trabalhos envolvendo a identificação e caracterização de genótipos resistentes e suscetíveis a *Phytophthora* spp. (Broadbent, 1977; Feichtenberger et al., 1992) 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.

Furr & Carpenter (1961) analisando o comportamento de indivíduos F<sub>1</sub> de diversos cruzamentos entre parentais contrastantes para resistência a *Phytophthora* observaram grande amplitude na resposta ao patógeno indicando que a herança da resistência de citros a doença é complexa e provavelmente controlada por muitos genes. Graham & Castle (1993) destacam que a herança de porta enxertos de citros para resistência/tolerância a *Phytophthora* spp. é de caráter quantitativa sendo controlada por vários 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).

Os mecanismos de resistência estruturais e bioquímicos de genótipos a *Phytophthora* são ainda pouco estudados. 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 & Szejberg (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 em 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 & McDonald, 1986).

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.

Broadbent (1977) acrescenta que genótipos resistentes e suscetíveis são igualmente infectados com *Phytophthora* spp. na região de alongação das radículas e que a característica de resistência vai se expressar somente quando as células estiverem totalmente diferenciadas. O autor 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.

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).

## **2.6 Métodos de inoculação e avaliação de *Phytophthora* spp.**

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.

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.

Diversas metodologias de inoculação de *Phytophthora* em porta-enxertos para citros são utilizadas: imersão de plântulas em água aerada contendo zoósporos e posterior plantio em solo infestado (Carpenter & Furr, 1962), infestação do solo com clamidósporos de *Phytophthora* (Graham, 1990), inserção de pedaços de micélio do patógeno em frutos, ramos e tronco de plantas no campo (Fawcett, 1923; Klotz & Fawcett, 1930), inserção de disco contendo meio + micélio sob a casca de plantas semelhante ao processo de

borbulhía de gemas (Grimm & Hutchison, 1973; Afek & Sztejnberg, 1990), inserção de suspensão de zoósporos em incisões realizadas na base das plantas (Whiteside, 1974; Smith et al., 1991) do uso do palito de dente colonizado com patógeno (Aguilar-Vildoso & Pompeu Jr., 1997) e inserção de agulha contaminada com o patógeno em plântulas (Siviero et al., 2000).

A avaliação das inoculações para o caso de podridão de raízes/radicelas pode ser realizada estimando-se a percentagem de sobrevivência de plântulas (Carpenter & Furr, 1962); medindo a percentagem de radículas doentes/sadias (Grimm & Hutchison, 1973); porcentagem de redução do peso da matéria fresca das radículas (Matheron et al., 1998); estimando visualmente a infecção usando o teste de tetrazólio (Klotz & DeWolfe, 1965) e usando medidas de sobrevivência, vigor e aspecto geral das plantas (Carvalho, 2000). Nas inoculações de *Phytophthora* em parte aérea de plantas a área lesionada pelo patógeno pode ser mensurada com o auxílio de planímetro (Klotz & Fawcett, 1930); através da estimativa da porcentagem de anelamento do tronco (Smith et al., 1987) ou por medidas do comprimento e largura da lesão e formação de goma provocada por *Phytophthora* (Fawcett, 1923).

A inoculação de plantas jovens em ambiente protegido pode ser realizada inoculando-se o solo/substrato ou ainda as raízes/radicelas das plantas. Este procedimento está direcionado no estudo das podridões de raízes/radicelas e tombamento de mudas (Graham, 1988).

Klotz & Fawcett (1930) ressaltam que a simples multiplicação da medida do comprimento pela largura da lesão visando estimar a área de lesão provocada por *Phytophthora* gera erros superestimando a área real entre 25 e 50%. Araújo (1998) confirmou os dados Klotz & Fawcett (1930) calculando o erro de superestimação da área lesionada de 15 e 59%, dependendo do método de avaliação da área lesionada.

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. A nota zero da escala de notas corresponde a 0% de anelamento e

formação de calos em torno do local de inoculação e ausência de lesão do patógeno no sentido vertical e a nota 05 corresponde a 100% de anelamento e grande extensão de área lesionada no sentido vertical. A escala de Smith et al. (1987) foi utilizada para avaliação da resistência de genótipos a gomose em condições naturais de infecção (Oliveira & Santos Filho, 2000).

Araújo (1998) estudando métodos de avaliação de lesões em inoculações de *P. parasitica* na parte aérea de plantas de 18 meses em casa de vegetação detectou que: o comprimento das lesões da parte superior do ponto de inoculação é sempre maior e foi altamente correlacionado-se ao comprimento da lesão medida abaixo do ponto de inoculação; a área da lesão obtida através de duas metodologias distintas correlacionou positivamente com a medida do comprimento e da largura da lesão no lenho apresentando coeficientes de correlação de 0,98 e 0,85%, respectivamente e que a estimativa da área lesionada por *Phytophthora*, depois de transferida da planta para o papel, pode ser realizada com o uso aparelho medidor de área foliar ('Area metter') ou através de programas computacionais específicos como 'Image tools' e 'Photo Shop'.

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.

Smith et al. (1991) estudaram a influência do potencial de inóculo e de diversos métodos de inoculação de *Phytophthora* para medir a suscetibilidade de genótipos a gomose, inoculando plantas jovens em casa de vegetação e concluíram que: a) o método de inoculação via clamidósporo é eficiente, prático quando comparado com o método do disco e suspensão de zoósporos e permite quantificar o inóculo com mais facilidade b) o uso do método do disco é muito severo devido ao alto potencial de inóculo e c) a densidade de inóculo pode afetar suscetibilidade da planta ao patógeno.

Nos estudos de tolerância de genótipos à podridão de radículas a densidade de inóculo acima de 1,0 propágulo/cm<sup>3</sup> de solo já é capaz de induzir doença em plântulas, suscetíveis ao patógeno, com três meses de idade (Graham, 1990).

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.

## 2.7 Melhoramento genético de citros

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 progênies 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.

No melhoramento de porta-enxertos de citros, o processo de obtenção de um genótipo superior pretende associar as características desejáveis como resistência à adaptação em solos salinos/ácidos, resistência a doenças e pragas, produção de qualidade de frutos, tolerância ao frio/calor, altura de planta, rusticidade, produção precoce e alto número de sementes poliembriônicas (Hearn et al., 1974; Grosser & Gmitter, 1990; Medina Filho et al., 1993).

O melhoramento de citros para porta-enxerto ou copa pode ser realizado por seleção de genótipos superiores ou por cruzamentos controlados (hibridação). No caso de *Citrus* spp. os estudos genéticos e o melhoramento convencional são limitados devido ao longo ciclo de reprodução, alta heterozigosidade da espécie, juvenilidade prolongada, partenocarpia, depressão por endogamia, poliploidia e poliembrião (Barret & Rhodes, 1976; Grosser & Gmitter, 1990).

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).

A poliploidia em citros é um fenômeno que interfere na transmissão do caracteres da planta para gerações seguintes. Os genótipos tetraplóides apresentam folhas mais espessas, de coloração escura, crescimento lento, porte reduzido, florescimento e frutificação retardados e menor número de frutos e sementes por fruto (Cameron & Frost, 1968). As plantas autotetraplóides produzem poucos frutos em relação as diplóides, no entanto, são úteis nos trabalhos de melhoramento sendo usadas como parental em cruzamentos com plantas diplóides na produção de híbridos triplóides de grande interesse comercial, que geralmente não apresentam sementes (Grosser & Gmitter, 1990).

A partenocarpia em citros consiste no desenvolvimento do fruto sem fertilização do óvulo gerando frutos sem sementes e pode ser dividida em dois tipos: autônoma - situação em que as combinações de genes são letais ao desenvolvimento de grão de pólen ou saco embrionário como exemplo a laranja 'Bahia' e a partenocarpia estimulada – relacionada ao fenômeno da auto-incompatibilidade associada a também esterilidade de grãos de pólen que ocorre em numerosos cultivares de laranja doce, limões, e pomelos e pode ser observada nas cultivares nas tangerinas 'Clementina' e 'Nova' (Vardi, 1992).

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).

O gênero *Citrus* é considerado altamente heterozigoto, no entanto, a característica não pode ser estendida para todas espécies do gênero. A heterozigosidade está presente em limões e limas ácidas revelando uma origem através de hibridação interespecífica. No entanto, observa-se também em alguns genótipos de citros apresentam 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. Como o gênero *Citrus* é heterozigoto os híbridos obtidos são geneticamente diferentes entre si, mesmo quando originários dos mesmos pais (Herrero et al., 1996).

Em espécies alógamas como os citros são encontrados altos níveis de heterozigose na maioria dos locos, o que permite maior identificação de marcadores polimórficos úteis na construção de mapas. O cruzamento entre duas plantas pode ser realizado e a progênie  $F_1$  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).

O processo de obtenção de genótipos superiores é prejudicado entre outros fatores pelo processo da apomixia ou embrionia nucelar, pois as progênies formadas são uma mistura de plantas híbridas e nucleares. A embrionia nucelar pode ser de três tipos: nucelar, que gera plântulas idênticas à mãe; clivagem, via bipartição do embrião sexual e apomixia, decorrente da existência de mais de um gametófito no óvulo (Barret & Rhodes, 1976). Por outro lado, a poliembrionia nucelar é um fator positivo no melhoramento, pois a propagação vegetativa da plantas é facilitada quando o genótipo apresenta um grande número de sementes poliembriônicas.

A proporção de embriões zigóticos e nucleares varia com as espécies/cultivares de citros envolvidas no cruzamento (Brieger & Moreira, 1945). A identificação de plântulas zigóticas de nucleares constitui fase importante nos trabalhos de melhoramento via hibridação (Barret & Rhodes, 1976). 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).

Os *Citrus* e seus gêneros correlatos se hibridizam com certa facilidade consistindo numa boa característica para o melhoramento da cultura. A obtenção de híbridos de citros de espécies intergenéricas e interespecíficas envolve a escolha de parentais com características favoráveis ao melhoramento da espécie sob diversos aspectos.

A estratégia de criar novas combinações de cultivares de copa e porta-enxertos e assim explorar a variabilidade dos citros, via cruzamentos, vem sendo utilizada pelo homem há muito tempo. Importantes cultivares comerciais de porta-enxertos e copas de citros foram desenvolvidos por meio de cruzamentos controlados como os tangelos 'Orlando' e

‘Minneola’, (*C. reticulata* vs. *C. paradisi*) as tangerinas ‘Page’, ‘Robinson’, ‘Osceola’ e ‘Lee’ [*(C. reticulata* vs. *C. paradisi*) vs. *C. reticulata*] (Hearn et al., 1974).

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 cavalo 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).

As necessidades primárias para o desenvolvimento de um programa de melhoramento em citros visando a resistência ou tolerância de porta-enxertos a *Phytophthora* são: fontes de resistência, método eficiente de inoculação do patógeno para evitar escapes, ser prático, visando avaliar um grande número de genótipos e considerada produção de sementes híbridas produzidas a partir do cruzamento entre parentais (Furr & Carpenter, 1961).

Historicamente, o melhoramento de porta-enxertos no Brasil foi realizado a partir da seleção de plantas cítricas existentes nos bancos de germoplasma e de genótipos provenientes de programas de melhoramento conduzidos no exterior, principalmente, nos EUA (Pompeu Jr., 1991). O desenvolvimento de híbridos de citros para copa e porta-enxerto no Brasil é recente e teve um grande impulso no início da década de noventa (Machado, 1997). Destaca-se o trabalho desenvolvido por Carvalho (2000) que testou diversas combinações de híbridos de citros para as duas mais importantes doenças do complexo *Phytophthora* – citros: podridão do tronco e das radículas.

No Estado de São Paulo, as prioridades para o melhoramento de citros – *Phytophthora* estão voltadas para o estudo do modo de herança, mapeamento genético e desenvolvimento de técnicas de avaliação precoce de híbridos visando obter porta-enxertos que sejam resistentes/tolerantes ao patógeno (Machado, 1997).

## **2.8 Utilização de marcadores moleculares em estudos de genética e no melhoramento de citros**

O uso dos marcadores moleculares tem incrementado a eficácia dos métodos clássicos de melhoramento de plantas visando resistência a doenças, por diversos motivos: auxilia na detecção e localização de genes de resistência à doença e compreensão da herança da resistência, permite a seleção e identificação rápida de genótipos resistentes 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 et al., 1989; Vega, 1997; Cristofani & Machado, 1999).

Os avanços da biologia molecular foram potencializados pelo uso de técnicas baseadas em PCR ('Polymerase chain reaction'). Modernos e mais refinados marcadores moleculares estão sendo desenvolvidos e utilizados em citros: a técnica do RAPD, RFLP ('Restriction fragment length polymorphism'), AFLP ('Amplified fragment length polymorphism') e microssatélites (Roose, 1988; Luro et al., 1992; Sugawara & Oowada, 1995; Gmitter et al., 1998; Cristofani et al., 1999), contribuindo decisivamente para o avanço no conhecimento da genética e melhoramento dos citros.

Na espécie *Citrus*, os marcadores moleculares têm sido úteis na caracterização de germoplasma (Machado et al., 1996; Luro et al., 1992), no mapeamento genético (Gmitter et al., 1996, Durham et al., 1992; Jarrel et al., 1992; Cristofani et al., 1999), na diferenciação de embriões nucleares e zigóticos (Cristofani et al., 1996), na caracterização de patógenos (Aguilar-Vildoso, 1997; Kuramae-Izioka et al., 1997), no diagnóstico do patógeno via obtenção de sondas moleculares (Goodwin et al., 1989) e em estudos de herança genética (Cai et al., 1994; Cheng et al., 1995; Ling et al., 2000).

O mapeamento genético de 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 liga marcadores moleculares a locos gênicos importantes para a agricultura, e a donagem de genes são ferramentas úteis em programas de melhoramento de plantas perenes como os citros (Machado, 1997; Gmitter et al., 1998). No entanto, até o ano de 1992, nenhum gene que confere resistência a doenças em plantas tinha sido detectado e clonado usando a biologia molecular (Staskawicz et al., 1995)

Os mapas genéticos são construídos pela análise de co-segregação dos marcadores genéticos nos produtos da meiose. Os marcadores localizados em diferentes cromossomos devem segregar independentemente e os marcadores localizados no mesmo cromossomo são transmitidos conjuntamente, a menos que esta ligação seja quebrada por uma recombinação no gameta parental. A construção de mapas genéticos e posterior localização de QTLs associados a características de interesse agrônomico pode ser realizada com auxílio de

programas computacionais como JoinMap, Qgene, MapmakerQTL e baseia-se 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).

Liou (1990) estabeleceu grupos de ligação utilizando seis marcadores isoenzimáticos e trinta e seis marcadores moleculares RFLP em sessenta e cinco plântulas derivadas de um retrocruzamento entre LB 1-21 vs. tangerina ‘Clementina’. Foram estabelecidos oito grupos de ligação com trinta e cinco locos mapeados sendo 29 RFLP e 6 locos isoenzimáticos. As conclusões obtidas por Liou (1990) revelam que as inserções e deleções representam um importante mecanismo no polimorfismo encontrado em citros.

Durham (1990) relata que as inserções e deleções podem ser mais comuns em algumas espécies de citros, quando comparadas com outras do mesmo gênero. O mesmo autor trabalhando com o mapeamento de genes para tolerância ao frio avaliou sessenta e cinco progênes do retrocruzamento entre *C. grandis* como pai recorrente e *P. trifoliata* como pai doador. Cinquenta e seis marcadores, incluindo nove isoenzimáticos e quarenta e oito RFLP foram agrupados em onze grupos de ligação gerando um mapa de 553 cM. A tolerância ao frio foi correlacionada a sete QTLs, quatro deles possuindo influência positiva.

Roose et al. (1992) utilizaram sessenta progênes do cruzamento entre citrumelo (*C. paradisi* vs. *P. trifoliata*) e citrange ‘Troyer’ (*C. sinensis* Osbeck vs. *P. trifoliata*) para identificar marcadores ligados a genes controlando resistência ao CTV, queda de folhas, tempo de dormência, ocorrência de florescimento e circunferência do tronco. Os autores utilizaram construíram um mapa de ligação contendo 45 marcadores, 9 isoenzimáticos e 37 RFLP.

Jarrel et al. (1992) construíram um mapa de ligação baseados na segregação de oito locos isoenzimáticos, 1 proteína e 37 marcadores RFLP em 60 progênes do cruzamento intergenérico de citrumelo ‘Sacaton’ (*C. paradise* Macf. vs. *P. trifoliata*) e citrange Troyer (*C. sinensis* Osbeck. vs. *P. trifoliata*) largamente utilizado como porta enxerto. Foram obtidos 10 grupos de ligação contendo 38 dos 46 locos estudados. O tamanho do genoma foi estimado em 1700 cM. Aproximadamente 35% dos marcadores mapeados mostraram-se em torno de 10 cM e 58% dentro de 20 cM, oito locos em três grupos de ligação e 1 loco não ligado mostrou desvios significantes da segregação mendeliana.

Luro et al. (1994) trabalhando com marcadores isoenzimáticos, RFLP e RAPD em 52 plantas do cruzamento triplo de *C. grandis* vs. (*C. reshni* vs. *P. trifoliata* ‘Swingle’) estabeleceu um mapa de ligação contendo 95 marcadores distribuídos em 12 grupos de ligação, sendo que 12 marcadores não agruparam em nenhum grupo. Trinta e sete por cento dos 104 marcadores mostraram distorções significativas pelo teste de  $X^2$  ao nível de 5% de probabilidade em relação à segregação teórica de 1:1.

Em programas de melhoramento de espécies perenes a estratégia 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 RAPD e o outro parental apresentar formas alélicas não detectadas (genótipo nulo), a progênie  $F_1$  segrega na proporção de 1:1 para ausência e presença do segmento de RAPD detectado (Grattapaglia & Sederoff, 1994). Em resumo, a geração  $F_1$  obtida do cruzamento entre duas plantas de uma mesma espécie heterozigota lembra uma  $F_2$  ou um retrocruzamento nos modelos clássicos de culturas anuais (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

A eficiência da adoção do ‘pseudo testcross’ 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).

Cristofani et al. (1999) usando a estratégia de ‘pseudo testcross’ e marcadores moleculares do tipo RAPD construíram mapas de ligação de *C. sunki* e *P. trifoliata* ‘Rubidoux’ e localizaram o gene de resistência ao CTV (vírus da tristeza dos citros) no grupo de ligação I de *P. trifoliata* ‘Rubidoux’. A estratégia do ‘pseudo testcross’ foi empregada no mapeamento de QTLs associados às doenças em outras espécies lenhosas como *Vitis* sp. (Dalbó, 1998) e *Hevea* sp. (Lespinasse et al., 2000).

No intuito de agilizar a identificação de marcadores ligados a um gene ou a uma região genômica dois métodos podem ser utilizados: a análise em linhagens quase isogênicas (NIL’s - “near isogenic lines”) ou a análise de populações segregantes com

fenótipos contrastantes, pela técnica de BSA “Bulked Segregant Analysis” (Michelmore et al., 1991). O uso de linhagens quase-isogênicas em trabalhos de mapeamento genético de espécies perenes é limitado pelo longo ciclo de reprodução, pois demandam uma série retrocruzamentos sucessivos. A maioria dos casos de mapeamento de genes associados a resistência às doenças em plantas, principalmente, as anuais são baseados em NIL's (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

O uso da técnica da análise de mistura de DNA (‘bulcks’) ou BSA, associada ao marcador molecular ligado ao gene de interesse, tem sido bastante difundida no melhoramento de espécies anuais e perenes, principalmente, para caracteres qualitativos ligados a genes de resistência as doenças. O método do BSA se baseia no princípio de que se o polimorfismo detectado por um marcador molecular estiver associado à característica de resistência à doença, o DNA do grupo de plantas resistentes terá o mesmo padrão molecular do parental resistente, raciocínio análogo pode ser realizado para plantas suscetíveis e seus parentais (Michelmore et al. 1991). A técnica de BSA prevê a seleção de vários locos simultaneamente e permite analisar marcadores em desequilíbrio de ligação próximos ao gene alvo (Williams et al., 1993).

Mestre et al. (1997) encontraram sete marcadores RAPD ligados ao vírus da tristeza dos citros CTV utilizando a técnica de BSA. Ling et al. (2000), através de BSA determinaram a herança da resistência dos citros a *Tylenchulus semipenetrans*. A técnica do BSA tem sido recomendada para espécies perenes, onde a obtenção de retrocruzamento é inviável para os trabalhos de mapeamento genético, sendo uma técnica dependente de alta divergência genética entre os parentais (Michelmore et al., 1991).

Grande parte dos caracteres de importância econômica envolve a ação de poligenes que apresentam variação contínua no fenótipo, forte influência ambiental e herança quantitativa (QTL) de difícil manipulação. O estudo de poligenes usando marcador genético de herança simples associado a uma característica quantitativa foi primeiramente descrito no feijoeiro por Sax (1923).

Um grande número de associações entre marcadores moleculares e caracteres ligados a doenças de plantas que apresenta herança oligogênica já foram detectadas

(Melchinger, 1990; Young, 1996). No entanto, estudos envolvendo a detecção de marcadores genéticos e QTLs, em sistemas de herança complexa, por serem mais demorados, complicados e trabalhosos são reduzidos na literatura.

O mapeamento de QTLs é baseado em testes de ligação entre marcadores moleculares e características fenotípicas. Os métodos mais empregados na detecção da associação marcador-fenótipo são os modelos lineares de análise de variância e regressão linear. O método não requer a construção de mapas e apenas detecta associações entre marcadores e QTLs, sem localizar a posição no mapa (Edwards et al., 1987).

Diversas metodologias de mapeamento são empregadas envolvendo a análise dos mapas e a localização de QTLs de interesse agrônomo: mapeamento por marcador (por ponto, 'single marker' ou 'point analysis') [Tanksley, 1993]; mapeamento por intervalo (marcadores flanqueadores), desenvolvido por Lander & Botstein (1989); mapeamento por intervalo composto (Composite Interval Map) proposto por Zeng (1993, 1994) e o modelo de múltiplos QTLs (Jansen, 1993).

A detecção de QTL utilizando o método por marcador único ou por ponto é a forma mais simples de mapear QTLs. Um resultado significativo extraído de uma análise estatística que compara o valor do caráter e as classes genotípicas geradas pelo marcador denuncia a presença da ligação entre marcador e QTL. No entanto, este tipo de estratégia apresenta a desvantagem de detecção de QTLs falsos ou QTLs fantasmas (erro tipo I) problema que pode ser parcialmente sanado quando se promove um aumento no nível de significância. Ao realizar este procedimento pode-se ocorrer o risco da não detecção do QTL (erro tipo II), ou seja, deixar de declarar a associação, marcador x QTL, quando esta realmente existe. Outra desvantagem da análise por ponto é a tendência de subestimar os efeitos aditivos e de dominância devido à ocorrência de recombinação entre o QTL e o marcador molecular (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Young, 1996; Liu, 1998).

O mapeamento por intervalo é uma alternativa que aumenta o poder de detecção da associação QTL-fenótipo, pois, estima a magnitude do efeito e a posição do QTL. A metodologia se baseia na segregação dos marcadores moleculares usando a função de máxima verossimilhança para estimar a frequência de recombinação e o efeito do QTL no intervalo entre dois marcadores do mapa genético. O método testa a probabilidade de cada

intervalo do mapa ser detentora de um QTL através de testes estatísticos, considerando que a região possui um QTL. No entanto, o mapeamento por intervalo apresenta baixa resolução quando dois ou mais QTLs estão situados próximos nos grupos de ligação (Lander & Botstein, 1989).

A metodologia de mapeamento por intervalo composto (MIC) proposta por Zeng (1993, 1994) e o modelo de QTLs múltiplos (Jansen, 1993) utilizam informações de vários marcadores como cofatores, aumentando desta forma a precisão no mapeamento e detecção de QTLs que possam ocorrer em intervalos adjacentes no mesmo grupo de ligação. O MIC prevê um enfoque misto entre o método da máxima verossimilhança e as técnicas de regressão linear múltipla. O método do MIC permite analisar cada intervalo do mapa simultaneamente considerando as diferentes hipóteses e modelos de ocorrência de QTLs em intervalos adjacentes eliminando os efeitos de QTLs ligados no mesmo cromossomo na análise dos QTLs remanescentes (Jansen, 1993; Zeng, 1993, 1994).

Outras técnicas avançadas de mapeamento vêm sendo desenvolvidas como a técnica do mapeamento de múltiplas características que leva em consideração os efeitos de ligação entre os QTLs ou pleiotrópicos (Jiang & Zeng, 1995) e a técnica do mapeamento multiponto que incorpora parâmetros de epistasia no modelo de mapeamento do caráter em estudo (Kao et al., 1999).

As diferentes metodologias de mapeamento como por exemplo o mapeamento por um único marcador (por ponto ou 'single marker'), mapeamento por intervalo e mapeamento por intervalo composto estão disponíveis em pacotes reunidos em programas como QTLStat, JoinMap, Qgene, MapMaker, QTLCartographer e outros programas que possuem características peculiares de análise que consideram diversos aspectos de análises genéticas e estatísticas como delineamentos, técnicas moleculares empregadas no estudo e prevê ainda o mapeamento de poligenes responsáveis por vias metabólicas conhecidas 'a priori' que considera as relações biológicas com as fenotípicas. Este modelo foi denominado Modelo Metabólico Genético (Young, 1996; Liu, 1998).

O programa QTLCartographer foi desenvolvido nos EUA por Basten et al. (2000) e consiste num conjunto de programas para mapeamento de QTLs a partir de um mapa de ligação genético que pode ser obtido através do Mapmaker.

Os métodos de mapeamento por intervalo baseiam-se na estimativa da máxima verossimilhança dos parâmetros de frequência de recombinação, ordem dos marcadores e magnitude do efeito do QTL. O teste da máxima verossimilhança leva em consideração aproximações numéricas associadas a parâmetros populacionais desconhecidos oriundos de dados amostrais, podendo ser adotado ao estudo de associação de marcadores ou QTLs ligados ao caráter em estudo. O método se baseia num teste de hipótese definido por um valor limite conhecido como 'LOD score' (LOD - 'log of Odds'). O valor do LOD é então o logaritmo na base 10 da razão entre a hipótese de ligação marcadores-QTL, no intervalo em análise, e a hipótese da não existência da ligação (Lander & Botstein, 1989; Liu, 1998).

O valor do LOD é de abordagem estatística e relativa a cada amostragem. Para sua determinação considera-se o número de marcadores avaliados e o comprimento, em cM, do mapa em estudo e em geral varia entre 2,0 e 3,0. O valor de LOD obtido para um grupo de ligação candidato a conter um QTL deve ser superior ao valor de LOD estipulado para aquela região do mapa. Os picos de LOD indicam a presença de um QTL num segmento do genoma. A posição e magnitude dos efeitos de um QTL, a influência do ambiente e problemas de resolução do mapa que podem revelar QTL falsos-positivos são os principais fatores que podem limitar o mapeamento e detecção de QTLs em plantas (Lander et al., 1987).

O nível de significância para detecção de um QTL verdadeiro é expresso na forma de LOD que nada mais é do que a razão entre a probabilidade dos dados observados indicarem a presença de um QTL sobre a probabilidade de sua ausência. O limite de LOD acima do valor 3,0 é usualmente empregado na maioria dos trabalhos de mapeamento genético que envolve detecção de um QTL. A probabilidade de declarar a existência de um falso QTL está abaixo do nível de significância de 5% considerando no genoma completo em estudo (Churchill & Doerge, 1994).

No mapeamento de QTLs, um grande número de testes é realizado para detectar associações fenotípicas com os marcadores. No processo de cálculo dos valores de LOD a função de verossimilhança refere-se apenas a uma amostra de uma população, estimando os parâmetros de média e variância pelo teste de  $X^2$  com um grau de liberdade

apenas. Para aumentar o número de graus de liberdade pode-se considerar também o parâmetro  $r^2$ , frequência de indivíduos recombinantes o que pode gerar distorções na posição do LOD. Os testes paramétricos exigem uma distribuição dos dados de fenótipo como pressuposição para análises estatísticas que uma vez violadas podem gerar erros dos tipos I e II e de posição do QTL (Liu, 1998). Visando minimizar a ocorrência dos erros são propostos testes de permutação não-paramétricos baseados na re-amostragem ao acaso dos dados fenotípicos (Churchill & Doerge, 1994).

A técnica de permutações sucessivas ou embaralhamento dos dados fenotípicos, consiste em aleatorizar os dados de fenótipos vs. genótipos os mantendo fixos os resultados da marcação molecular. Um valor estável e máximo de LOD é obtido quando este processo é realizado um grande número de vezes. O teste de permutação é um instrumento poderoso na determinação dos níveis de significância para as ligações entre marcadores e QTLs que se ajustam a cada conjunto de dados fenotípicos analisados para cada experimento, mantendo fixos os níveis de significância (Churchill & Doerge, 1994). Basten et al., (2000) salientam que o resultado de testes de permutação realizados com 1.000 e 17.000 vezes é praticamente semelhante.

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, 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 (Young, 1996; Tinker & Mather, 1997). 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).

O total da variação fenotípica explicada pela segregação de um marcador molecular ou QTL associado ao caráter em estudo pode ser estimada pela análise de regressão linear múltipla através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) segundo Edwards et al. (1987). A contribuição de cada QTL sobre a característica em estudo apresenta variação.

Ferreira et al., (1995) encontraram um QTL associado à resistência a *Leptosphaeria* sp. em colza (*Bassica napus*) explicando 90% da variação fenotípica. Miklas et al. (1996) detectaram três QTLs ligados à resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* no feijoeiro, explicando 65, 58 e 46% da variação fenotípica em folhas, vagens e em avaliações de campo, respectivamente.

Os trabalhos envolvendo o mapeamento genético de características quantitativas em plantas lenhosas como os citros, com o uso de marcadores moleculares visando a seleção assistida indireta são muito recentes. Tozlu et al. (1999a), tentando identificar QTLs associados ao fator salinidade e analisaram indivíduos  $F_1$  e  $BC_1$  obtidos do cruzamento entre *C. grandis* e *P. trifoliata*. Os autores detectaram 73 QTLs associados à acumulação de  $Na^+$  e  $Cl^-$ , com LOD score  $> 3,0$ , usando como base um mapa com 1260 cM obtido de 161 marcadores isoenzimáticos, RAPD e RFLP. Foram detectadas 17 regiões de interesse associadas ao caráter salinidade e distribuídas em todo o genoma sendo que oito delas apresentavam QTLs de largo efeito e as demais de pequeno efeito.

Tozlu et al. (1999b), tentando localizar QTLs associados às características de crescimento e acumulação de massa seca em citros, analisaram 30 características morfológicas de mudas de citros submetidas a ambiente salino e não salino. Os indivíduos avaliados fazem parte de uma população  $F_1$  e  $BC_1$  obtidos do cruzamento entre *C. grandis* e *P. trifoliata*. Os autores detectaram 70 QTLs associados à acumulação de massa seca e ao crescimento sendo distribuídas em 16 regiões do genoma, seis das quais envolvidas no crescimento e na acumulação de massa seca, simultaneamente.

A herança da resistência dos citros ao nematóide *Tylenchulus semipenetrans* foi estudada por Ling et al., (2000). Os estudos revelaram 11 marcadores do tipo RAPD associados ao caráter e que um QTL de expressão maior é responsável pela resistência dos citros ao nematóide.

A identificação e o mapeamento de novos genes de resistência em *Citrus* spp. permitirá verificar se a organização dos genes de resistência (R) em citros e espécies correlatas segue o padrão agregado ('cluster') encontrado em espécies agrícolas como

amendoim (Choi et al., 1989), alface (Kesseli et al., 1993), videira (Dalbó, 1998) e em outras culturas (Hammond-kosack & Jones, 1997).

A biologia molecular está sendo um importante instrumento para elucidar fenômenos dentro do melhoramento de plantas como a sintenia que é um fenômeno de extrema importância no melhoramento vegetal trazendo grandes contribuições para o entendimento da organização do genoma, sua evolução. A hipótese da sintenia pressupõe que a posição relativa de genes é constante dentro de espécies relacionadas, ou seja, um gene ou QTL localizado numa espécie será facilmente localizado na região homóloga do genoma de uma espécie correlata. As implicações da sintenia no processo de obtenção de plantas superiores são potencializadas pelos processos de etiquetagem e clonagem de genes qualitativos de interesse agrônomico, principalmente, se estes genes estão agrupados formando "clusters", o que permite a clonagem de diversos caracteres simultaneamente (Lee, 1995).

A seleção assistida por marcadores (SAM) é uma forma de seleção indireta de indivíduos num programa de melhoramento e seu sucesso inicia na detecção de marcadores moleculares intimamente ligados ao gene de interesse que permite a visualização da variabilidade em nível de DNA sem que haja expressão gênica, devido à neutralidade fenotípica dos marcadores moleculares. A SAM tem sido sugerida para caracteres com baixa herdabilidade, no desenvolvimento de linhagens endogâmicas permitindo uma rápida avaliação da população F<sub>2</sub> e outras inúmeras aplicações no melhoramento vegetal e animal (Tanksley, 1993; Young, 1996).

Vega (1997) afirma que a SAM pode ser usada para selecionar caracteres qualitativos e quantitativos. No entanto, revela que o uso da SAM tem maior impacto no descobrimento da base genética de característica quantitativa. O mesmo autor levanta três aspectos sobre a necessidade da exata localização de QTL num determinado genoma: 1. segurança de que o QTL localizado é real e não um fato matemático-estatístico devido a dois ou mais genes ligados; 2. esperança de que tais QTLs possam ser úteis como vetores de grupos genéticos diretamente ligados com o rendimento das plantas (existência de QTL falso-positivo) e 3. necessidade de provar que a localização do QTL pode ser estendida as demais espécies correlatas (sintenia).

A eficiência de utilização de SAM no melhoramento vegetal está limitada pelo tamanho do fragmento de DNA em estudo. Em trabalhos de melhoramento envolvendo SAM, um fragmento de 15-20 cM pode ser um limite de resolução prático e aceitável, no entanto, no caso de clonagem e transformação de plantas são necessários fragmentos menores que 10cM. A eficiência da SAM seria maior para intervalos ou distâncias menores. No entanto, fragmentos muito reduzidos podem limitar as oportunidades de recombinação considerando os métodos de melhoramento e o tamanho da população geralmente empregados nos trabalhos de melhoramento (Gmelfarb & Lande, 1994).

Lee (1995) indica diversas situações onde a SAM pode ser mais eficaz que a seleção tradicional em se tratando de caracteres quantitativos: quando o caráter selecionado tem baixa herdabilidade, em distâncias genéticas menores que 5cM entre marcadores e o QTL, nas primeiras gerações de seleção fase anterior à fixação dos locos dos marcadores e quando grandes amostras são usadas para mapear e selecionar QTLs. No entanto, salienta que em poucos trabalhos de SAM de caracteres poligênicos tem demonstrado uma resposta positiva na seleção.

As vantagens da SAM no caso de plantas de ciclo longo são maiores devido à possibilidade de seleção precoce de indivíduos superiores (Ruiz et al., 2000). A localização de caracteres qualitativos ou quantitativos em mapas genéticos comparáveis poderá revelar posições de mapa similares entre caracteres relacionados em espécies diferentes podendo revelar alelos supra-específicos (Bennetzen, 1999).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Todos os trabalhos de casa de vegetação e laboratório foram desenvolvidos no Centro de Citricultura ‘Sylvio Moreira’ do Instituto Agrônomo de Campinas -CCSM/IAC, situado em Cordeirópolis, SP.

#### **3.1 Obtenção e manutenção de isolados de *Phytophthora parasitica***

Os isolados de *Phytophthora parasitica* foram cedidos pelo Laboratório Regional de Sanidade Animal e Vegetal do Instituto Biológico (LRSAV/IB) sediado em Sorocaba-SP, e pela Clínica Fitopatológica do CCSM/IAC situada em Cordeirópolis-SP. Os isolados foram mantidos no laboratório em B.O.D. (25<sup>0</sup>C, 24 h luz) sendo armazenados em tubos, contendo meio de cultura composto de batata-dextrose-ágar (BDA), até a data da repicagem visando as inoculações.

O Quadro 02 mostra a identificação dos isolados de *P. parasitica* obtidos de diferentes municípios do Estado de São Paulo, trazendo a identificação cultura (IB e IAC), procedência da cultura e data de isolamento.

Quadro 02. Isolados de *Phytophthora parasitica* de localidades do Estado de São Paulo, identificação da cultura (LRS e IAC) e data de isolamento.

Número	Identificação	Procedência	Data de isolamento
1	LRS 21/97	Matão	09/1997
2	LRS 23/97	Casa Branca	09/1997
3	LRS 05/98	Guarantã	04/1998
4	LRS 16/98	Sta. Cruz do Rio Pardo	08/1998
5	LRS 17/98	Colombia	08/1998
6	LRS 18/98	Itajobi	08/1998
7	LRS 27/98	São Lourenço do Rio Turvo	08/1998
8	LRS 28/98	Botucatu	08/1998
9	IAC 01/95	Cordeirópolis	1995
10	IAC 03/95	Cordeirópolis	1992
11	IAC 06/95	Taubaté	1994
12	IAC 09/95	Limeira	1993
13	IAC 10/95	Taubaté	1994
14	IAC 11/95	Jales	1992
15	IAC 16/95	Conchal	1993

### 3.2 Agressividade de isolados de *Phytophthora parasitica* em *Citrus limon* e *Citrus limonia*

A avaliação da agressividade de isolados de *P. parasitica* (Quadro 02) foi realizado visando selecionar o isolado mais agressivo, para ser utilizado posteriormente nos trabalhos de inoculação dos híbridos. A inoculação foi realizada em mudas de limão verdadeiro ‘Siciliano’ (*C. limon* Burmann), enxertado em limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck) e em mudas de limoeiro ‘Cravo’, porta-enxerto mais usado na citricultura brasileira e moderadamente suscetível ao patógeno (Feichtenberger, 2001).

As mudas de limoeiro ‘Siciliano’, gentilmente cedidas pela Companhia Agrícola Botucatu, foram cultivadas em substrato composto de terra + esterco + areia. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, receberam irrigação diária e adubação de reposição com fosfato monoamônico (MAP) e nitrocalcio, na dose de 500 e 300g, para cada 20 L de água, respectivamente, sempre que necessária.

Os experimentos foram desenvolvidos em casa de vegetação e o método empregado na inoculação foi o método do disco usado por Fawcett (1923) e descrito com detalhes por Rossetti (1947).

O método do disco consiste na inserção de um disco de meio de cultura (cenoura-ágar) colonizado com o patógeno e retirado de colônias com sete dias de idade. Primeiramente, um disco de 3,0 mm de diâmetro foi retirado da casca da planta com auxílio de um furador de metal. A seguir, um disco de igual diâmetro contendo meio de cultura e micélio foi retirado da placa de Petri e colocado junto ao ferimento, com a face do inóculo voltada para o lenho da planta. Posteriormente, o disco de casca é recolocado no local da inoculação. Após este procedimento a área correspondente a 2,0 cm acima e abaixo do ponto de inoculação foi protegida com esparadrapo e algodão umedecido e, finalmente, envolvida com fita adesiva.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dez repetições (hastes) para cada isolado (15) e para o tratamento testemunha sem o patógeno. As mudas de limão verdadeiro foram obtidas através de enxertia em limoeiro 'Cravo' aos 150 dias antes da data da inoculação. As plantas apresentavam alto vigor vegetativo, diâmetro variando entre 4,0 e 8,0 mm. Após a inoculação as plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura de 24 +/- 07<sup>0</sup>C e 70 +/- 10 % de umidade relativa.

A avaliação da doença foi realizada aos 14 dias após a inoculação, através da medida da área lesionada. Após a remoção da casca, foi aderida à área lesionada uma fita adesiva transparente. O perímetro da lesão foi transcrito para a fita adesiva com auxílio de uma caneta que foi colada em folhas de papel branco, estando apto para o cálculo da área da lesão.

A área da lesão provocada pelo patógeno foi obtida com auxílio de um planímetro de compensação Koizumi (N.<sup>o</sup> 25160). O segundo método de mensuração de área foi realizado através do uso de um equipamento que utiliza o sistema de planimetria digitalizada (SPLA3) para mensuração de área em superfícies planas. O equipamento é composto por uma mesa digitalizadora e uma caneta digital utilizada pelo operador, na tomada de dados do perímetro da área da figura. As áreas plotadas em papel são registradas e processadas em microcomputador acoplado à mesa digitalizadora usando programas específicos SUMMGRAPHICS e SUMMGRID 4.0. O equipamento pertence ao Departamento de Engenharia Rural da FCA/UNESP-Botucatu, onde foram realizadas as leituras das áreas das lesões. Nas análises estatísticas, as áreas obtidas pelos dois métodos foram transformadas em  $\sqrt{x + 0,5}$ .

Dos 15 isolados mencionados no item anterior, 10 foram escolhidos para serem novamente inoculados em plantas. O experimento foi realizado usando-se hastes de limoeiro ‘Siciliano’ (enxerto) e hastes do limoeiro ‘Cravo’ (porta-enxerto), dois meses após a primeira inoculação, usando-se as mesmas plantas. As hastes do limoeiro ‘Siciliano’ foram podadas em altura abaixo da lesão provocada pela inoculação anterior. A nova brotação do enxerto foi então usada para nova inoculação do patógeno.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com dez repetições (hastes) para cada isolado (10) e para o tratamento testemunha, sem o patógeno. Utilizou-se o mesmo método de inoculação (disco de micélio). A avaliação foi realizada aos 21 dias após a inoculação.

Estudos detalhados correlacionando os fatores: classes de diâmetro das hastes inoculadas vs. área das lesões, área lesionada vs. largura de lesão, área lesionada vs. comprimento de lesão, tanto em relação aos dois métodos de avaliação (mesa e planímetro) e os dois genótipos testados (‘Cravo’ e ‘Siciliano’) foram realizados com os dados das inoculações dos dez isolados de *P. parasitica* selecionados.

### **3.3 Métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica***

#### **3.3.1 Inoculação ‘in vitro’ de *Phytophthora parasitica***

Este ensaio teve como objetivo avaliar ‘in vitro’ a reação de porta-enxertos para citros a *P. parasitica* na avaliação precoce de gomose. Os genótipos avaliados foram: *P. trifoliata* ‘Davis A’, citrange ‘Carrizo’, limoeiro ‘Cravo’ e laranja ‘Caipira’.

As sementes dos genótipos foram lavadas em água corrente e desinfestadas superficialmente em álcool 70%, por 5 minutos, e em solução a 25% de hipoclorito de sódio. Após secagem foram colocadas assepticamente em meio de cultura específico para germinação e crescimento em condições ambientais.

As plântulas foram cultivadas em tubos de ensaio com capacidade de 20,0 mL contendo 3,0 mL de meio de cultura MT (Murashigue & Tucker, 1969), suplementado com 0,1 mg/L de Benzilamiloipurina (BAP) e 1 mg/L de ácido indol butírico (IBA) para induzir o enraizamento. As plântulas permaneceram em câmara de crescimento por

um período de quarenta dias. Nos dez primeiros dias foram mantidas a 27°C e mantidas na ausência de luz para estimular o estiolamento e logo após foram submetidas a fotoperíodo de 18 h na mesma temperatura.

A inoculação foi realizada com auxílio de agulha infestada com o micélio do patógeno retirado de colônias de *Phytophthora parasitica* com sete dias de idade. A agulha foi infestada através de seu contato com a cultura do patógeno em placa de Petri, em seguida, foram realizados pequenos ferimentos na região do colo das plântulas permitindo-se o contato do patógeno com o interior da plântula.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Para cada genótipo foram inoculadas 17 plantas (repetições) sendo 15 plantas úteis e duas testemunhas feridas com agulha estéril, perfazendo um total de 68 plantas inoculadas. A avaliação foi realizada aos dez dias após a inoculação do patógeno medindo-se o comprimento das lesões, em mm, das plantas doentes e a porcentagem de plantas mortas.

### **3.3.2 Inoculação de *Phytophthora parasitica* usando casca destacada**

Foram realizados dois experimentos com inoculação de *Phytophthora parasitica* usando-se secções de casca de plantas adultas de porta-enxertos de citros. Os genótipos testados foram: laranja 'Azeda' (*C. aurantium*), tangerina 'Sunki', *P. trifoliata* 'Rubidoux', laranja 'Caipira' (*C. sinensis* Osbeck), limoeiro 'Cravo' e citrumelo 'Swingle' (*P. trifoliata* vs. *C. paradisi*).

As inoculações foram realizadas na parte interna de secções de cascas medindo 9,0 x 3,0 cm, removidas de plantas com quatro anos de idade. As cascas foram primeiramente desinfestadas com álcool 70%, flambadas e em seguida inoculadas com um disco de meio de cultura cenoura-ágar (CA), infestado com micélio, medindo 3,0 mm de diâmetro, retirado de colônias do patógeno com idade de sete dias. O lado correspondente à colônia do patógeno foi colocado em contato com a parte central interna da casca, por 4 horas, e em seguida retirado com pinça asséptica.

Após a inoculação, as secções de cascas foram acondicionadas em sacos plásticos contendo algodão úmido e mantidas sobre bandejas plásticas em B.O.D. a 27°C sob luz fluorescente por 24 h. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente

casualizado. Foram utilizadas doze seções de casca para cada genótipo testado, sendo dez seções de casca com disco de meio de cultura infestado pelo patógeno e duas com o disco de meio CA. O experimento foi repetido. A avaliação foi realizada aos seis dias após a inoculação através da medida da área da lesão do patógeno, em cm<sup>2</sup>, feita com auxílio da mesa digitalizadora.

### **3.3.3 Inoculação de *Phytophthora parasitica* via método do disco, inserção sob casca e contato direto com tecido**

Todos os experimentos foram realizados com plantas obtidas de pé-franco micropropagadas, com aproximadamente dois anos de idade, mantidas em casa de vegetação. As plantas foram cultivadas em substrato comercial utilizado para formação de mudas cítricas ('Rendimax' + adubo peletizado de liberação lenta 'Osmocote', na formulação 18-05-09) recebendo irrigações diárias e adubação foliar de reposição com fosfato monoamônico (MAP) e nitrocalcio na dosagem de 500 e 300g para cada 20 L de água, respectivamente, sempre que necessário.

A inoculação foi realizada em hastes de plantas que apresentavam 5,0 a 7,0 mm de diâmetro. As hastes das plantas antes da inoculação foram superficialmente desinfestadas com algodão umedecido em álcool 70 %.

Os genótipos testados foram: tangerina 'Sunki' e 'Cleópatra', limoeiro 'Cravo', *P. trifoliata* 'Davis A' e 'Flying Dragon', citrumelos 'Sacaton' e 'Swingle' e citranges 'Carrizo' e 'Troyer'.

Nos três métodos de inoculação usou-se o mesmo isolado do patógeno LRS 23/97. Nos três métodos foram utilizados discos de meio CA contendo micélio, medindo 3,0 mm de diâmetro. Os discos foram retirados de colônias com sete dias, cultivadas em CA e mantidas em B.O.D. a 25°C e 24 h de luz. Todas as plantas após serem inoculadas foram mantidas em temperatura de 22 +/- 2°C e umidade relativa do ar em torno de 80 +/- 10%.

A metodologia do disco consiste na sua inserção nas hastes das plantas, em área cujo disco da casca tenha sido demarcada com auxílio de furador de metal, de diâmetro semelhante ao do disco de meio de cultura. Para tal, remove-se a casca, deposita-se o disco de meio de cultura e recoloca-se a parte da casca destacada conforme método descrito

por Rossetti (1947) apresentada no item 3.2. O método do disco descrito, primeiramente, por Fawcett (1923) é o mais o mais tradicionalmente utilizado em inoculações de *Phytophthora* em plantas no campo.

O método da inserção sob casca, descrito por Grimm & Hutchison (1973), usado com sucesso por Afek & Szejnberg (1990), consiste em introduzir um disco de meio de cultura infestado com micélio sob a casca da planta, sem destacar tecido vegetal semelhante ao processo de borbulhía de gemas. Os cortes em T invertido foram realizados com bisturi estéril e os discos contendo meio + micélio foram introduzidos sob a casca das plantas. Em seguida a casca foi pressionada e depois protegida com esparadrapo, algodão e gaze umedecidos e envolta com fita adesiva.

A metodologia definida como contato direto nos tecidos externos da casca, consistiu em colocar discos contendo meio + inóculo em contato externo com tecidos da casca, sem qualquer ferimento. O disco de meio de cultura contendo o patógeno foi pressionado junto à planta e sendo levemente pressionado no ponto de inoculação com auxílio de esparadrapo promovendo o contato patógeno-planta. A área de inoculação foi então protegida com gaze e algodão umedecido e recoberta com fita de enxertia.

Para cada genótipo testado (09) foram utilizadas 12 plantas e duas testemunhas, inoculadas com disco de meio de cultura, sem o inóculo, perfazendo um total de 326 plantas inoculadas. O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado. A avaliação foi realizada aos 14 dias após a inoculação através da medida do comprimento das lesões (mm).

### **3.3.4 Inoculação de *Phytophthora parasitica* utilizando o método do disco e do palito-de-dente infestado em porta-enxertos de citros**

O experimento comparando os métodos do disco e do palito-de-dente infestado pelo patógeno em porta-enxertos de citros foi realizado usando os genótipos: tangerina ‘Sunki’ e *P. trifoliata* ‘Rubidoux’. As plantas foram multiplicadas por sementes obtidas de frutos junto ao BAG-CCSM/IAC. As sementes foram semeadas em substratos contendo substrato comercial ‘Rendimax’ + ‘Osmocote’ (18-05-09), em sacos plásticos com capacidade de 2 L, recebendo irrigação diárias e adubação foliar quinzenal de reposição com

fosfato monoamônico (MAP) e nitrocálcio na dose de 500 e 300g, para cada 20 L de água, respectivamente. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até a data de inoculação, ou seja, aos onze meses de idade, cujo diâmetro das hastes dos genótipos apresentavam 5,0 a 7,0 mm, no ponto de inoculação.

A metodologia de inoculação consiste na introdução de um palito-de-dente de madeira infestado pelo patógeno na haste de plantas jovens. Este procedimento foi utilizado em citros, para inoculações de plântulas, por Aguilar-Vildoso & Pompeu Jr. (1997).

Os palitos-de-dente foram cortados a  $\frac{1}{4}$  do seu tamanho normal, afilados em uma das extremidades, esterilizados com álcool 70%, fervidos em água por três vezes, com sucessivas trocas de água visando, extrair possíveis substâncias tóxicas e finalmente autoclavados. A seguir, os palitos foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultura (CA) juntamente com discos de meio de cultura infestados com *P. parasitica*, por sete dias. No momento em que o micélio de *P. parasitica* recobriu todos os palitos considerou-se que se mostravam prontos para a inoculação.

A inoculação consistiu na inserção do palito infestado com o patógeno nas hastes de plantas a uma altura de 3,0 a 5,0 cm do colo. No ponto de inoculação, os tecidos foram perfurados com agulha estéril para facilitar a entrada do palito. O palito infestado permaneceu na planta até a avaliação. A área foi recoberta com algodão e gaze umedecidos sendo diariamente aspergida com água visando manter o local sempre úmido até a avaliação.

A metodologia do disco empregada neste ensaio foi a mesma descrita anteriormente no 3.3.3. Nos dois métodos de inoculação testados usou-se o mesmo isolado do patógeno LRS 23/97.

Todas as plantas após serem inoculadas foram mantidas em temperatura de  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa do ar em torno de  $90 \pm 5\%$ . O delineamento estatístico empregado foi o inteiramente casualizado usando-se 26 plantas de cada genótipo. As plantas foram inoculadas aos onze meses de idade e apresentavam entre 6,9 e 8,6 mm de diâmetro, no ponto de inoculação, para os genótipos *C. sunki* e *P. trifoliata* 'Rubidoux', respectivamente. Passados 10 dias da inoculação um grupo de 16 plantas de cada genótipo foi avaliado. A avaliação final foi realizada aos 21 dias, em um grupo de dez plantas restantes de cada genótipo, removendo a casca na área lesionada e medindo o comprimento da lesão.

### 3.3.5 Metodologia de inoculação de *Phytophthora parasitica* em plantas jovens usando palito-de-dente e agulha infestados

O experimento foi realizado avaliando-se 28 genótipos pertencentes ao BAG-citros do CCSM/IAC (Quadro 03), onde se incluem ‘Citrandarins’ (*Poncirus* vs. tangerinas) e ‘Citranges’ (*Poncirus* vs. laranja doce). Os genótipos *P. trifoliata* ‘Rubidoux’ e ‘Davis A’; limoeiro ‘Cravo’; limão ‘Siciliano’ e tangerina ‘Sunki’ atuaram como testemunhas de resistência, moderada resistência e suscetibilidade a *P. parasitica*, respectivamente (Salibe, 1974; Feichtenberger, 2001).

As plantas foram obtidas através de sementes extraídas de frutos da safra 1998/99. As sementes após extração, beneficiamento e tratamento com fungicida quintozene-pentacloronitrobenzeno (PCNB), em pó molhável, na dose de 400g/100 kg semente foram semeadas em tubetes. Uma parte das sementes armazenada em câmara a 5°C.

Para a semeadura empregou-se tubetes contendo substrato comercial ‘Plantimax’, usado na formação de porta-enxerto de citros com adição de adubo peletizado na formulação 18-05-09, na dose de 40g de adubo para cada 10L de substrato. As bandejas contendo tubetes foram mantidas em casa de vegetação, recebendo irrigação diária com água isenta de inóculo do patógeno e sem reposição de adubo.

A metodologia de produção de inóculo e inoculação das plantas utilizando um palito infestado com o patógeno foi idêntica àquela descrita no item 3.3.3. A inoculação em si consistiu na inserção do palito infestado com o patógeno aproximadamente a altura de 3,0 cm do colo das plântulas com 98 dias de idade. O palito infestado permaneceu espetado nas plântulas sem proteção externa até a avaliação.

O método de inoculação da agulha infestada com o patógeno é realizado com auxílio de uma agulha de metal ou através de espinhos de plantas cítricas desinfestadas com álcool 70%. No caso específico usou-se a agulha que foi infestada com estruturas do patógeno no momento da sua passagem em colônias de *P. parasitica* (LRS 23/97) desenvolvida em meio CA, com idade de sete dias. A haste da planta foi perfurada a altura de 2 cm do colo introduzindo-se a agulha até a extremidade oposta e em seguida, inseriu-se a agulha infestada no ponto de inoculação sendo retirada, posteriormente. O ponto de inoculação foi protegido com algodão umedecido e vedado com auxílio fita de enxertia.

Quadro 03. Relação de genótipos testados, em relação a *Phytophthora parasitica*, usando os métodos de inoculação da agulha e do palito de dente infestado.

CCMS/IAC	HRS*	Genótipos
CN** 385	-	citrange 'Troyer' ( <i>C. sinensis</i> vs. <i>P. trifoliata</i> )
CN 387	-	citrange 'Carrizo' ( <i>C. sinensis</i> vs. <i>P. trifoliata</i> )
CN 1696	-	citrange 'Morton' ( <i>C. sinensis</i> vs. <i>P. trifoliata</i> )
CN 1698	881	citrange 'Troyer tetraploide' ( <i>C. sinensis</i> vs. <i>P. trifoliata</i> )
CN 1702	880	citrange 'Carrizo tetraploide' ( <i>C. sinensis</i> vs. <i>P. trifoliata</i> )
CN 1519	-	tangerina 'Sunk' vs. <i>P. trifoliata</i> 'English'
CN 1518	-	tangerina 'Cleópatra' ( <i>C. reticulada</i> ) vs. <i>P. trifoliata</i> 'Swingle'
CN 717	-	limão 'Cravo' vs. citrange 'Carrizo'
CN 1532	-	tangerina 'Cleópatra' vs. <i>P. trifoliata</i>
CN 710	-	tangerina 'Cleópatra' vs. <i>P. trifoliata</i> 'English'
CN 1524	-	tangerina 'Cleópatra' vs. <i>P. trifoliata</i> 'Swingle'
CN 715	-	tangerina 'Cleópatra' vs. <i>P. trifoliata</i> 'Swingle'
CN 1522	-	tangerina 'Clementina' ( <i>C. reticulata</i> ) vs. <i>P. trifoliata</i>
CN 712	-	tangerina 'Cleópatra' vs. <i>P. trifoliata</i> 'Christhian'
CN 1660	-	tangerina 'Cleópatra' vs. <i>P. trifoliata</i> 'Rubidoux'
CN 1711	852	tangerina 'Changsha' ( <i>C. reticulata</i> ) vs. <i>P. trifoliata</i> 'English large'
CN 1699	802	torange 'Siamese' vs. <i>P. trifoliata</i> 'Gotha-road'
CN 1710	801	tangerina 'Changsha' vs. <i>P. trifoliata</i> 'English small'
CN 1695	827b	limão 'Cravo' vs. <i>P. trifoliata</i> 'Swingle'
CN 1697	812	tangerina 'Sunk' vs. <i>P. trifoliata</i> 'Benecke'
CN 1693	850	(laranja doce 'Shamouti' vs. laranja doce 'Mediterranean') vs. <i>P. trifoliata</i> 'Christiansen'
CN 1694	847	tangerina 'Miaray' ( <i>C. reticulada</i> )
CN 1707	827a	limão 'Cravo' vs. <i>P. trifoliata</i> 'Swingle'
CN 291	-	limão 'Siciliano' - testemunha suscetível
RG*** 38	-	Tangerina 'Sunki' - testemunha suscetível
RG 47	-	limão 'Cravo' - medianamente resistente
RG 47	-	<i>P. trifoliata</i> 'Rubidoux' - testemunha resistente
RG 47	-	<i>P. trifoliata</i> 'Davis A' - testemunha resistente

\* Código do Horticultural Research Station (HRS), \*\* Clone novo e \*\*\* Registro geral.

As plantas foram inoculadas aos 98 dias após a semeadura em tubetes. Nesta fase, apresentavam entre 12,0 e 15,0 cm de altura e 2,0 a 3,0 mm de diâmetro. Após a inoculação as plantas foram mantidas em câmara úmida com 90 +/- 5 % de umidade relativa do ar e temperatura de 24 +/- 2°C. A avaliação foi realizada aos 32 dias após a inoculação medindo o comprimento das lesões.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado constituído de dois métodos e 28 genótipos. Para cada genótipo e métodos testados foram

inoculadas dez plantas, sendo oito plantas úteis e duas testemunhas que sofreram ferimentos de agulha e palito estéreis, perfazendo um total de 560 plantas inoculadas. As médias obtidas foram transformadas em  $\sqrt{x+0,5}$ .

### 3.4 Multiplicação e manutenção de híbridos e parentais

Uma vez definido, o isolado de *P. parasitica* a ser usado nos trabalhos de inoculação e a metodologia de inoculação e avaliação de gomose a ser adotada, procedeu-se a multiplicação de plantas para os trabalhos de inoculação e avaliação parentais e híbridos F<sub>1</sub>.

No experimento empregaram-se 98 híbridos que foram obtidos de polinização controlada realizada em setembro de 1993. Os indivíduos fazem parte de uma população de 316 indivíduos F<sub>1</sub> obtidos do cruzamento entre os parentais *C. sunki* vs. *P. trifoliata* 'Rubidoux' que pertencem ao BAG-citros do CCSM/IAC. Uma parte dos indivíduos da progênie (80) foi utilizada no trabalho de mapeamento genético do vírus da tristeza dos citros realizado por Cristofani (1997). As plantas foram estabelecidas em campo em 'pé franco' desde setembro de 1994, apresentando alto vigor vegetativo estando algumas em pleno processo reprodutivo.

A multiplicação das plantas para inoculação foi realizada usando-se 98 indivíduos da progênie. Os parentais e as progênies foram enxertadas em limoeiro 'Cravo', via enxertia. Vinte borbulhas coletadas de cada genótipo do campo foram enxertadas, no primeiro semestre de 1999, em plantas do porta-enxerto limoeiro 'Cravo EEL' com seis meses de idade. As plantas enxertadas foram cultivadas em casa de vegetação protegida contra insetos e afídeos até a data inoculação, realizada no segundo semestre do mesmo ano.

As plantas foram cultivadas em sacos plásticos com capacidade de 2,0 L contendo substrato comercial 'Plantmax', com adição de adubo peletizado, na formulação 18-05-09 na dose de 40g de adubo para cada 10,0 L de substrato. As plantas receberam irrigação diária e adubação de reposição de fosfato monoamônico (MAP) e nitrocálcio na dose de 400 e 250 g, respectivamente. Cada planta recebeu aproximadamente 1,0 a 2,0 g da mistura, quinzenalmente.

### 3.4.1 Avaliação da resistência

A progênie foi resultante de um cruzamento controlado entre o genitor suscetível, *C. sunki* e o genitor resistente, *P. trifoliata* 'Rubidoux', geneticamente divergentes entre si para o caráter de resistência a gomose.

A inoculação e avaliação dos híbridos e parentais obtidos por enxertia foram realizadas em câmara úmida que consiste numa sala em alvenaria com luz artificial e natural. Foram utilizadas dez plantas de cada genótipo (repetições). Foram utilizados no experimento 98 indivíduos da progênie. Por razões operacionais, o experimento foi dividido em três ensaios. Em cada ensaio foram inoculados e avaliados blocos de 300, 400 e 300 plantas (híbridos) que corresponde aos ensaios 1, 2 e 3 os quais foram realizados nos meses de fevereiro, março e abril de 2000. Em cada ensaio um grupo de 10 plantas de cada parental foi inoculado e avaliado.

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. As plantas com 180 dias de idade foram inoculadas, artificialmente com *P. parasitica* (LRS 23/97) pelo método do disco, medindo 3,0 mm de diâmetro. No ponto de inoculação promoveu-se uma prévia desinfecção superficial das hastes com algodão umedecido em álcool 70%.

O método de inoculação consistiu na inserção de um disco de micélio obtido de colônias do patógeno cultivado em meio cenoura-ágar, com sete dias de idade nas hastes das plantas, que apresentavam de 5,0 a 7,0 mm de diâmetro. Após inoculação as plantas foram mantidas em câmara úmida a 25°C e 90 +/- 05% de umidade relativa do ar até a data da avaliação, recebendo irrigação três vezes por semana. A avaliação da doença foi realizada aos 30 dias após inoculação, medindo-se o comprimento da lesão em mm.

Foi realizada ainda uma análise estatística conjunta dos ensaios 1, 2 e 3 analisando os fatores época, reação dos genótipos ao patógeno e a interação época x genótipos. As análises foram realizadas pelo programa SAS (SAS Institute, 1995).

### 3.5 Mapeamento de QTLs ligados ao caráter de resistência a gomose dos citros

O processo de construção dos mapas de ligação consistiu na extração de DNA a partir de folhas maceradas em solução tampão (CTAB-Sarcosyl), quantificação e

qualificação em gel de agarose e amplificação via PCR do DNA genômico dos indivíduos  $F_1$  (zigóticos) e parentais. Em seguida, as amostras de DNA dos indivíduos  $F_1$  foram submetidas a reações de RAPD usando-se 170 'primers' com seqüência arbitrária de nucleotídeos. As reações de amplificações foram conduzidas de acordo com o protocolo de Williams et al. (1993).

Os grupos de ligação foram construídos com auxílio do programa Mapmaker (Lander et al., 1989) que agrupou, ordenou e analisou os marcadores polimórficos segregantes obtidos por RAPD e montou o mapa genético constituído do conjunto de grupos de ligação. O programa Mapmaker executa a análise de ligação de marcadores segregando em cruzamentos experimentais, estimando todas as frações recombinantes dos dados fornecendo um mapa de ligação de um conjunto de marcadores ligados geneticamente com conhecidas freqüências de recombinação. Em seguida, empregou-se a estratégia do 'pseudo-testcross' que permite utilizar a segregação dos marcadores na  $F_1$  para gerar os mapas de ligação dos parentais.

Os mapas de ligação (*C. sunki* e *P. trifoliata* 'Rubidoux') usados neste trabalho para o mapeamento do caráter de resistência a gomose foram obtidos de Cristofani et al. (1999). A análise da co-segregação de marcadores RAPD foi analisada usando uma progênie constituída de 80 indivíduos de uma população  $F_1$  com auxílio de programa Mapmaker<sup>®</sup> versão 02 (Lander et al., 1989) para Macintosh, utilizando um LOD de 3,0 para ligação e 0,4 para a fração de recombinação. As distâncias genéticas entre os marcadores RAPD foram obtidas a partir da freqüência de recombinação utilizando a função de mapeamento de Kosambi (Kosambi, 1944).

A análise estatística por ponto foi empregada visando estabelecer uma relação entre marcadores e o fenótipo, resistência a gomose. Nesta análise, cada marcador molecular foi analisado individualmente. O teste estatístico F foi realizado utilizando 170 marcadores do tipo RAPD como variável independente. A variável fenotípica dependente utilizada foi média do comprimento das lesões obtidas pelos 98 indivíduos inoculados com *P. parasitica*. As análises foram realizadas pelo programa SAS (SAS Institute, 1995) que determinou os marcadores associados à variável dependente através da análise de variância (ANOVA).

A planilha de dados para análise foi construída com os marcadores dispostos na abscissa e os indivíduos (híbridos) na ordenada. As lacunas foram preenchidas com os números 1 e 2 que representavam, respectivamente, ausência e presença de bandas polimórficas reveladas pelas reações de RAPD de cada indivíduo quando comparadas com a presença ou ausência das bandas nos parentais. Assim, cada banda polimórfica gerada pelos marcadores e detectada em determinado híbrido e presente no parental *P. trifoliata* 'Rubidoux' a lacuna correspondente ao híbrido recebia a letra R. Analogamente, se a banda do híbrido era comum ao parental *C. sunki*, a lacuna da planilha (híbrido x marcador molecular) correspondente deste híbrido recebeu a letra S.

Nos casos em que não havia informação de marcadores moleculares, obtida das reações de RAPD, para um determinado híbrido ou naqueles onde a bandas polimórficas geradas estavam presentes ou ausentes nos dois parentais, as lacunas da planilha foram preenchidas com o sinal de ponto final. Os marcadores moleculares que no trabalho de mapeamento genético apresentaram distorção na segregação mendeliana esperada (1:1) (Cristofani et al., 1999) também foram considerados nesta análise.

As análises estatísticas e genéticas foram realizadas adotando o método da análise da variância para detecção de marcadores moleculares ligados ao caráter fenotípico de resistência a gomose dos citros, utilizando-se o teste estatístico F confrontando dados de marcadores com os dados fenotípicos. Na avaliação dos dados fenotípicos foram avaliados considerando a média bruta do dado fenotípicos (lesão em mm) obtidos pelas plantas dos três ensaios.

A detecção de QTLs foi realizada pelo mapeamento por intervalo composto (MIC) segundo (Zeng, 1993,1994) através do uso do programa QTLCartographer (Basten, et al. 2000). O método de análise pelo MIC é baseado em função de máxima verossimilhança associado a métodos de regressões lineares múltiplas aplicadas aos marcadores e aos dados fenotípicos para detectar marcadores ligados a QTLs associados ao caráter em estudo (resistência a gomose).

A associação dos métodos baseia-se na modelagem de um QTL de cada vez em um intervalo do mapa usando parte dos marcadores como cofatores e eliminando o efeito dos QTLs remanescentes. A metodologia de declaração da presença do QTL no

intervalo entre dois marcadores baseia-se na num teste de hipótese definido por um valor limite conhecido como LOD.

As análises estatísticas e genéticas foram realizadas empregando programas computacionais específicos visando detectar as regiões dos genomas de *P. trifoliata* 'Rubidoux' e *C. sunki* responsáveis pelo caráter de resistência a gomose dos citros. O programa utilizado na detecção dos QTLs foi o QTLCartographer, versão 1.14, está disponível, gratuitamente, na rede mundial de computadores no sítio <http://statgen.ncsu.edu>.

No ambiente do programa QTLCartographer foi fornecido um conjunto de programas, cujos arquivos que contêm os grupos de ligação (data.mps) originários do Mapmaker e o arquivo 'data.raw', que contém a planilha dos indivíduos, marcadores moleculares e os dados fenotípicos de cada indivíduo do caráter quantitativo a ser mapeado, neste caso, resistência a gomose.

A metodologia das permutações ou embaralhamento dos dados fenotípicos e genotípicos proposta por Churchill & Doerge (1994) foi utilizada no ambiente do QTLCartographer. A localização mais provável do QTL foi estimada usando a função de verossimilhança e análise de regressão sendo gerada uma curva para cada intervalo do mapa, analisado em valores de LOD, com auxílio do programa QTLCartographer. A análise foi realizada através da modalidade mapeamento por intervalo composto. No menu de opções dentro do MIC foi definido o modelo aleatório para controle das marcas 'standard model', precisão de caminamento de 3cM e análise considerando intervalos a cada 10cM do mapa. O nível de significância de 0,05% foi adotado para os testes de 1000 permutações e a probabilidade de 0,05% para declaração de presença de QTL (Churchill & Doerge, 1994) e previamente definidas no programa.

O modelo de análise da regressão escolhido foi 'forward & backward method'. O método 'forward' é um algoritmo onde o modelo se inicia com os marcadores de maior significância estatística sendo que os demais marcadores vão se ajustando, posteriormente, com todas as variáveis no modelo de regressão múltipla. A opção 'backward' é aquele onde o modelo, primeiramente, considera todas os marcadores e os marcadores não significativos vão sendo eliminados sucessivamente do modelo original. Na análise de regressão múltipla, considera apenas do valor da constante  $\theta_0$ , parâmetro desconhecido do modelo de regressão (Basten et al., 2000).

Na primeira etapa da análise cada mapa genético (somatória dos grupos de ligação) de cada parental foi analisado separadamente. Numa segunda etapa os grupos de ligação que apresentavam picos indicando a presença de QTL foram analisados individualmente. Seguiram-se, então, vários testes de permutação até que fosse atingido valores estáveis de máximo LOD. Uma vez fixado o valor de máximo LOD o próprio programa gerou gráficos de saída com os dados de distância em cM na abscissa e valores de LOD ou 'threshold', quando se usa a regressão linear, na ordenada. Uma linha de corte reta, acima da qual indica a presença de QTL, é traçada e uma linha ondulada indicando a posição do QTL no grupo ou mapa analisado é apresentada.

A proporção da variância fenotípica explicada pelos marcadores que geraram QTLs associados à resistência a gomose dos citros foi estimada pelo valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), proposto por Edwards et al., (1987). Os valores de  $R^2$  foram fornecidos diretamente pelo programa QTLCartographer para cada segmento de mapa analisado (Basten et al. 2000). O QTLCartographer emprega o modelo de regressão linear múltipla para estimar o total da variação fenotípica do caráter em estudo considerando os efeitos aditivos para cada QTL detectado.

As análises de variância foram realizadas pelo programa SAS (SAS Institute, 1995). A determinação dos coeficientes de correlação fenotípica e genotípica foi realizada pelo programa QTL Cartographer, conforme Basten et al. (2000). A estimativa da herdabilidade no sentido amplo, ou seja ao nível das médias obtidas pelos genótipos, foi determinada segundo Falconer (1989) conforme a seguinte fórmula:

$$h^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + \sigma^2/r} \quad \text{onde,}$$

$\sigma_g^2$  = estimador da variância genotípica;  $\sigma^2$  = estimador da variância ambiental ou residual e  $r$  = número de repetições.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Agressividade de isolados de *Phytophthora parasitica* em *Citrus limon* e *Citrus limonia*

No Quadro 04 encontram-se os dados da inoculação em plantas de limoeiro 'Siciliano', realizadas pelo método do disco, com 15 isolados de *P. parasitica*, procedentes de diversas localidades do Estado de São Paulo. Os dados da área das lesões provocadas pelo patógeno e medida pelo método do planímetro e mesa digitalizadora, estão apresentados em cm<sup>2</sup>.

No Quadro 05 encontram-se os dados da inoculação em hastes de limoeiro 'Siciliano' e 'Cravo', realizadas pelo método do disco, com dez isolados de *P. parasitica* procedentes de diversas localidades do Estados de São Paulo. Os dados da área das lesões provocadas pelo patógeno, calculadas pelo método do planímetro e mesa digital, estão apresentados em cm<sup>2</sup>.

Quadro 04. Agressividade de 15 isolados de *Phytophthora parasitica*, procedentes de localidades do Estado de São Paulo, inoculados em plantas de limão 'Siciliano', avaliada mediante dois métodos de mensuração.

Identificação	Procedência	Mesa	Planímetro
LRS 21/97	Matão	1,962* a	2,670 a
LRS 23/97	Casa Branca	1,441 abc	1,300 b
LRS 05/98	Guarantã	0,669 bc	0,770 b
LRS 16/98	Sta. Cruz do Rio Pardo	1,445 abc	1,570 ab
LRS 17/98	Colômbia	1,176 abc	1,670 ab
LRS 18/98	Itajobi	0,837 abc	1,040 b
LRS 27/98	São Lourenço do Rio Turvo	1,673 ab	1,670 ab
LRS 28/98	Botucatu	0,549 bc	0,890 b
IAC 01/95	Cordeirópolis	0,448 c	0,810 b
IAC 03/95	Cordeirópolis II	0,718 bc	1,110 b
IAC 06/95	Taubaté I	0,581 bc	0,820 b
IAC 09/95	Limeira	0,490 bc	0,850 b
IAC 10/95	Taubaté II	0,382 c	0,790 b
IAC 11/95	Jales	0,346 c	0,710 b
IAC 16/95	Conchal	0,495 bc	0,750 b
Média	-	1,328	1,700
CV	-	22,39	28,79

Médias seguidas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% probabilidade. \*área em cm<sup>2</sup>.

Os experimentos se analisados separadamente sugerem que é possível distinguir isolados de *P. parasitica* quanto à agressividade. No entanto, quando os experimentos são observados em conjunto, nota-se uma inversão na ordem dos isolados quanto à agressividade (Quadros 04 e 05).

No primeiro experimento, os isolados procedentes de Matão, São Lourenço do Rio Turvo, Casa Branca e Santa Cruz do Rio Pardo apresentaram maiores áreas lesionadas para os dois métodos de mensuração. No caso do segundo experimento, o isolado procedente de Casa Branca foi o que causou a maior área lesionada, considerando os dois

genótipos e os métodos de medida de áreas. As posições seguintes foram ocupadas alternadamente pelos demais isolados testados, seguindo ordenação aleatória, com destaque para os isolados procedentes de Itajobi e Matão, que ocuparam posições entre os cinco primeiros (Quadro 05).

Quadro 05. Agressividade de 10 isolados de *Phytophthora parasitica*, procedentes de localidades do Estado de São Paulo, inoculados em hastes de limão 'Siciliano' e 'Cravo', avaliadas mediante dois métodos de mensuração.

Procedência	Planímetro		Mesa digitalizadora	
	'Cravo'	'Siciliano'	'Cravo'	'Siciliano'
Matão	1,240* bcd	5,110 abc	1,253 abc	4,029 bc
São L. R. Turvo	1,100 cd	2,360 d	0,999 bcde	2,547 bcd
Sta. C. R. Pardo	0,730 cd	2,380 d	0,688 e	2,288 d
Colombia	1,310 abc	3,250 bcd	1,165 bcd	3,080 bcd
<b>Casa Branca</b>	<b>1,820 a</b>	<b>6,960 a</b>	<b>1,660 a</b>	<b>6,512 a</b>
Cordeirópolis	1,073 d	4,200 bcd	0,768 cde	4,610 ab
Itajobi	1,790 ab	5,590 ab	1,433 ab	4,407 bc
Botucatu	1,020 cd	3,020 cd	0,714 de	2,817 cd
Limeira	1,340 abc	2,640 d	1,223 abc	3,813 bcd
Taubaté	1,010 cd	2,920 cd	0,729 e	2,848 cd
Média	2,136 p	3,843 q	1,801 p	3,695 q
CV	31,86	44,10	32,27	46,40

Médias seguidas das mesmas letras na vertical para o fator origem do isolado e na horizontal para a média geral, não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. \*área em cm<sup>2</sup>.

Considerando os resultados dos dois experimentos, o isolado LRS 23/97, foi escolhido para ser usado nas inoculações subseqüentes. Os dados confirmam a maior suscetibilidade do limoeiro 'Siciliano' se comparado ao limoeiro 'Cravo', conforme já relatado na literatura (Rossetti, 1947; Carlos, 1997) para a maioria dos isolados utilizados.

Rossetti (1947), estudando diversas espécies de *Phytophthora* e a reação de espécies cítricas e gêneros correlatos aos citros para reação de resistência ao

patógeno não observou respostas concretas sobre a patogenicidade diferencial entre isolados. Segundo o autor foram verificadas variações do tamanho das lesões entre e dentro das espécies e cultivares testadas.

Nos dois experimentos (Quadros 04 e 05), a média geral obtida quando se utilizou o método do planímetro foi maior que a média observada quando se usou a mesa digitalizadora. Considerando-se que o resultado do teste estatístico para métodos versus genótipos não foi significativo ( $F = 0,03$  <sup>n.s.</sup>), conclui-se que qualquer um dos dois métodos pode ser empregado para mensurar áreas das lesões.

O tempo despendido nas leituras e anotações usando o planímetro, após treinamento adequado, foi de aproximadamente 12 horas para 200 lesões. A metodologia de medição de áreas usando o planímetro é inteiramente manual e demorada, no entanto, exige equipamento simples e de menor custo. Nas leituras realizadas com auxílio de mesa digitalizadora foram gastas 06 horas para medir e registrar um total de 200 lesões. Este método foi mais prático e rápido.

Araújo (1998), trabalhando com mudas em casa de vegetação utilizou métodos de mensuração de lesão de *P. parasitica* em citros usando o aparelho integrador de área foliar 'Automatic Area Metter' e, com auxílio de 'Scanner' e programas específicos, obteve a estimativa da área doente com mais precisão, quando comparados a métodos tradicionais de mensuração.

No Quadro 06 são apresentados os dados referentes às classes de diâmetro, número de hastes por diâmetro, média de área lesionada considerando métodos de medida de área lesionada por *P. parasitica* (planímetro e mesa) e dois genótipos de citros testados ('Cravo' e 'Siciliano') utilizando os dados das inoculações dos dez isolados de *P. parasitica* selecionados.

No Quadro 07 encontram-se os dados do estudo das relações existentes entre os fatores diâmetro de hastes e área das lesões provocadas por *P. parasitica* para os dois métodos de mensuração de lesão e genótipos avaliados.

Analisando-se conjuntamente os dados demonstrados nos Quadros 06 e 07 nota-se que não houve aumento proporcional da área da lesão em função do aumento do diâmetro das plantas inoculadas, independente dos métodos de mensuração e genótipos avaliados.

Quadro 06. Classes de diâmetro, número de hastes por diâmetro, média de área lesionada considerando métodos de medida de área lesionada por *Phytophthora parasitica* (planímetro e mesa) e os genótipos de citros testados ('Cravo' e 'Siciliano').

Classes de diâmetro (mm) 'Cravo'	Número de hastes por diâmetro	Área média das lesões (cm <sup>2</sup> )		Classes de diâmetro (mm) 'Siciliano'	Número de hastes por diâmetro	Área média das lesões (cm <sup>2</sup> )	
		Planímetro	Mesa			Planímetro	Mesa
10	06	1,133	0,945	07	10	3,584	3,096
11	16	1,125	0,789	08	21	3,428	3,082
12	42	1,223	0,987	09	34	3,473	3,135
13	25	1,400	1,202	10	23	4,521	4,106
14	11	1,309	1,072	11	12	4,541	3,781

Quadro 07. Coeficiente de correlação, equação da curva de regressão linear e valor de F para curva de regressão das interações entre os fatores diâmetro de hastes vs. área das lesões provocadas por *Phytophthora parasitica* considerando dois métodos de medição os genótipos limoeiro 'Cravo' e 'Siciliano'.

Variáveis	R	Equação de regressão linear	Valor de F
Diâmetro vs área (planím.) – Cravo	0,71	$Y = 0,6640 + 0,0429X$	7,92 ns
Diâmetro vs. área (mesa)- Cravo	0,68	$Y = 0,1986 + 0,0667X$	2,71 ns
Diâmetro vs. área (planím.) - Siciliano	0,69	$Y = 0,1951 + 0,0315X$	7,90 ns
Diâmetro vs. área (mesa) – Siciliano	0,63	$Y = 0,1285 + 0,2394X$	4,27 ns

No Quadro 08 encontram-se demonstrados os dados referentes aos valores do coeficiente de correlação entre os fatores área lesionada vs. largura de lesão, área vs. comprimento de lesão, considerando os dois métodos de avaliação (mesa e planímetro) e os dois genótipos testados ('Cravo' e 'Siciliano'), correspondentes à inoculação de dez isolados de *P. parasitica*.

Quadro 08. Matrizes de correlação entre as variáveis: largura, comprimento da lesão, métodos de avaliação (mesa e planímetro) e dois genótipos de citros testados ('Cravo' e 'Siciliano') usando dados da inoculação de dez isolados de *Phytophthora parasitica*\*.

		Tamanho		Área
Siciliano		Comprimento	Planímetro	Mesa
Tamanho	Largura	0,7649**	0,7160	0,6983
	Comprimento		0,7546	0,7919
Área	Planímetro			0,9105
Cravo				
Tamanho	Largura	0,5712	0,4435	0,4810
	Comprimento		0,6913	0,7360
Área	Planímetro			0,9016

\*Os valores de  $P < 0,0001$  das correlações das variáveis expressos em r.

Analisando-se os dados apresentados no Quadro 08, observa-se que o comprimento da lesão, quando comparado com a largura, correlacionou-se mais fortemente com a área lesionada, independente dos métodos de mensuração ou genótipos testados. Os métodos de medição (planímetro e mesa) apresentaram alta correlação, acima de 0,90, para os dois genótipos, indicando que ambos podem ser usados nos trabalhos de medição de área lesionada pelo patógeno. Ainda de acordo com o Quadro 08, observa-se que a variável comprimento da lesão é a que melhor correlacionou com a área total da lesão, considerando os dois métodos de medição para os dois genótipos testados.

A medição de área total da lesão produzida pelo patógeno, comum em trabalhos de campo, é possível de ser realizada em plantas com diâmetro maior, que apresentam lesões que não chegam a coalescer no sentido da largura. Em trabalhos com plantas jovens opta-se pela medição do comprimento da lesão em detrimento da largura que nem sempre é possível mensurar devido ao coalescimento das bordas, anelando o caule no ponto da inoculação. Os trabalhos com gomose em plantas jovens, em inoculações em ambiente protegido utilizam o comprimento das lesões para avaliar e quantificar a doença (Klotz et al., 1958; Afek & Szejnberg, 1990; Matheron et al., 1998).

Rossetti & Bitancourt (1951) demonstraram que o comprimento das lesões de *P. citrophthora* é a medida representativa do desenvolvimento do patógeno em tronco de citros, em plantas adultas no campo. Oliveira (1976) tentou definir um modelo estatístico matemático aplicado a experimentos de gomose realizados em condições de campo, isolando-se o fator planta. O autor concluiu que a medida mais indicada é a largura da lesão e que quando se usam medidas como comprimento e área, ocorre interferência significativa da planta nos efeitos dos tratamentos. Em contrapartida, Mello et al., (1971) trabalhando com dados de inoculações de campo notaram que as lesões produzidas por *P. parasitica* se desenvolvem mais em largura e no caso de *P. citrophthora* as lesões foram maiores em comprimento.

Considerando a maior correlação observada entre a variável comprimento da lesão vs. área lesionada (Quadro 08) e o impedimento casual de se obter a medida real da largura, visto que em muitos casos pode ocorrer o anelamento da lesão do caule das plantas, a medida do comprimento da lesão foi a adotada em trabalhos de avaliação em inoculações realizadas com *P. parasitica* em plantas.

## **4.2 Metodologias de inoculação de *Phytophthora parasitica* em citros**

### **4.2.1 Avaliação ‘in vitro’ da resistência de porta-enxertos de citros a gomose**

A porcentagem de plantas doentes para os genótipos *P. trifoliata* ‘Davis A’; citrange ‘Carrizo’; limoeiro ‘Cravo’ e laranja ‘Caipira’ foram: 6,0; 7,0; 38,0 e 73,0% respectivamente. O comprimento médio das lesões das plantas doentes para os genótipos testados foi 2,00; 3,00; 31,15 e 46,83 mm para os genótipos *P. trifoliata* ‘Davis A’, citrange ‘Carrizo’, limoeiro ‘Cravo’ e laranja ‘Caipira’, respectivamente (Figura 01).

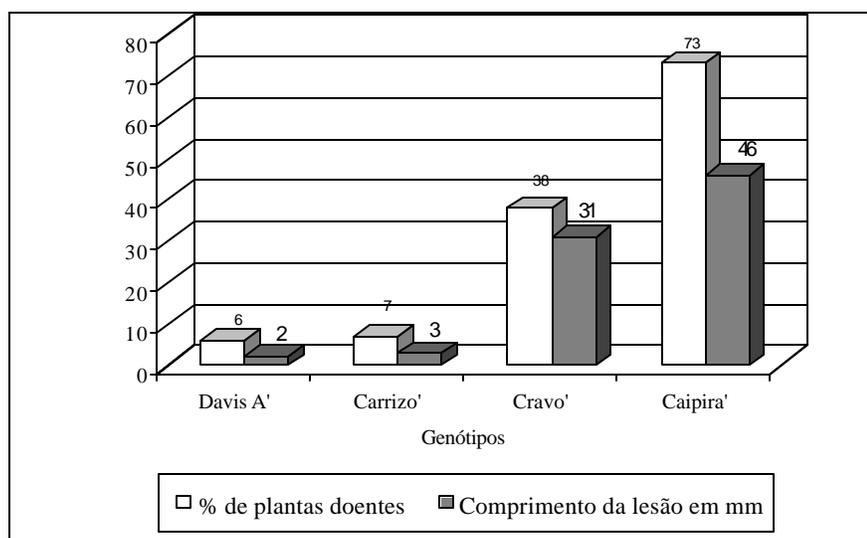


Figura 01. Incidência de plantas doentes e comprimento médio de lesões causadas *P. parasitica* em quatro porta-enxertos de citros via inoculação 'in vitro'.

O método de inoculação 'in vitro' distinguiu genótipos de porta-enxerto para citros quanto à resistência a *P. parasitica* e pode ser utilizado na seleção precoce na fase de plântulas. Os resultados da reação de resistência/suscetibilidade dos genótipos em campo citados na literatura (Carlos et al., 1997) estão em concordância com as reações encontradas 'in vitro'.

O método permite avaliar um grande número de genótipos em pequeno espaço físico e de tempo. Entre as desvantagens do método está a exigência de laboratório e mão-de-obra especializada, envolvendo custos, e o fato de que o genótipo a ser selecionado deve ser produzindo-se sementes, o que leva à seleção tardia de material, nem sempre desejável em programas de melhoramento de citros. O fator custo é relativo quando comparado ao custo dos tratamentos culturais dispensados na formação de mudas e condução das plantas no campo. As inoculações em mudas e em plantas adultas de citros, no campo, são realizadas geralmente após quatro anos. Utilizando o método de inoculação em condições axênicas, a partir das sementes das plantas, num prazo de 40 dias conseguiu-se obter resposta de reação de resistência dos genótipos ao patógeno. A técnica pode ser de grande utilidade em trabalhos envolvendo seleção de resistência varietal de genótipos ao patógeno.

A literatura não acusa trabalhos envolvendo a seleção 'in vitro' de genótipos no patossistema citros-*Phytophthora*. Vardi et al. (1986) usaram filtrados de *P.*

*citrophthora* em calos de quatro genótipos de citros, visando à seleção ‘in vitro’ de genótipos para a resistência à doença, no entanto, não obtiveram sucesso nos experimentos.

#### 4.2.2 Avaliação de gomose dos citros em inoculação em casca destacada

No Quadro 09 são apresentados os dados do tamanho das lesões em cm<sup>2</sup>, provocadas pela inoculação de *P. parasitica* quando inoculado em cascas destacadas de diferentes genótipos.

Quadro 09. Tamanho médio de lesões provocadas pela inoculação de *Phytophthora parasitica* inoculado em casca destacada em porta-enxertos para citros.

Genótipos	Ensaio 1	Ensaio 2
tangerina ‘Sunki’ (S)	9,662* a	8,554 a
laranja ‘Azeda’ (R)	9,506 a	9,817 a
laranja ‘Caipira’(S)	7,991 ab	-
citrumelo ‘Swingle’ (R)	5,773 bc	8,016 a
limoeiro ‘Cravo’ (MS)	5,148 c	8,733 a
<i>P. trifoliata</i> ‘Rubidoux’ (R)	-	8,176 a
D.M.S.	2,284	1,952
CV	23,61	19,58

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. \* em cm<sup>2</sup>. (S = suscetível, MS = moderadamente suscetível e R = resistente, segundo Pompeu Jr. (1991) e Feichtenberger (2001)).

Analisando-se os dados da primeira inoculação (Ensaio 01) observa-se que o comportamento apresentado pelos genótipos não coincidiu com a reação de resistência/suscetibilidade relatadas na literatura (Pompeu Jr., 1991; Feichtenberger, 2001). Os genótipos, laranja ‘Azeda’, citrumelo ‘Swingle e o limoeiro ‘Cravo’, respectivamente, resistentes e moderadamente resistentes ao patógeno, comportaram-se como suscetíveis nos dois experimentos. Dados semelhantes foram também observados na segunda inoculação (Ensaio 02) onde todos os genótipos se comportaram igualmente suscetíveis ao patógeno, não havendo diferenças significativas entre si no tamanho das lesões produzidas. Os resultados

demonstram que esta metodologia não foi adequada para discriminar genótipos de citros quanto a gomose.

#### 4.2.3 Avaliação das inoculações de *Phytophthora parasitica* via método do disco, inserção sob casca e contato em porta-enxertos de citros

As plantas inoculadas pelo método de contato entre o tecido externo da casca e o patógeno e ainda as plantas testemunhas não apresentaram lesões de *P. parasitica*, sendo desconsideradas na análise estatística. As médias do comprimento das lesões em mm, obtidas pelos genótipos testados usando dois métodos de inoculação de *P. parasitica* estão demonstradas no Quadro 10.

Quadro 10. Comprimento médio de lesões (mm), provocadas por *Phytophthora parasitica* em porta-enxertos de citros usando os métodos do disco e de inserção sob casca.

Genótipos	Disco	Inserção sob casca	Média
tangerina ‘Sunki’ (S)	14,75	15,88	15,31 a
limoeiro ‘Cravo’ (MS)	9,91	12,58	11,24 b
<i>P. trifoliata</i> ‘Davis A’ (R)	8,33	12,50	10,41 bc
citrange ‘Troyer’ (R)	6,75	12,06	9,67bc
tangerina ‘Cleópatra’ (MS)	6,25	11,50	8,87 bc
citrumelo ‘Sacaton’ (R)	7,25	9,91	8,58 bc
citrumelo ‘Swingle’ (R)	6,33	10,17	8,25 c
citrange ‘Carrizo’ (R)	5,16	8,25	6,70 c
<i>P. trifoliata</i> ‘F. Dragon’ (R)	5,91	7,41	6,66 c
Média para método	7,06 A	10,02 B	-
CV			36,31
Método x genótipo			1,277 <sup>n.s.</sup>

Médias seguidas das mesmas letras na vertical não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. (S = suscetível, MS = moderadamente suscetível; R = resistente, segundo Fawcett (1936) e Feichtenberger (2001)).

Através dos resultados deste ensaio pode-se verificar que o patógeno necessita de ferimento para penetrar na planta e causar doença. Os métodos da inserção sob casca e do disco se equivaleram revelando que ambos podem ser usados na avaliação de porta-enxertos de citros quanto à resistência a gomose (Quadro 10).

O método do disco usado desde o início do século passado em inoculações de *Phytophthora* spp. por Klotz & Fawcett, (1930) e Rossetti (1947), em plantas adultas no campo, mostrou-se eficiente para avaliar a resistência ao patógeno em plantas jovens em casa de vegetação.

O método da inserção sob casca, descrito por Grimm & Hutchison (1973) e usado em Israel por Afek & Sztejnberg (1990), gerou lesões de comprimento significativamente maiores em comprimento, quando comparado com o método do disco (Quadro 10).

O maior comprimento das lesões observado pelo método da inserção sob casca pode ser atribuído ao fato de que, no momento da incisão e abertura da casca para inserção do disco de meio de cultura + micélio, a área do descolamento da casca e a exposição do lenho tornarem-se maiores quando comparada com a área de exposição provocada pelo disco ( $\cong 7,05 \text{ mm}^2$ ). O controle da homogeneidade da área da casca da planta exposta/descolada para inoculação, via inserção sob casca, depende de fatores como genótipo e estado fisiológico da planta. Algumas plantas, mesmo sendo submetidas aos mesmos tratamentos culturais, são mais sensíveis ao descolamento da casca do lenho do que outras. Considerando-se estes fatos o método do disco foi o adotado nas inoculações de plantas em casa de vegetação para avaliação da resistência de gomose devido a sua uniformidade.

Os genótipos *P. trifoliata* 'Flying Dragon', limoeiro 'Cravo', *P. trifoliata* 'Rubidoux' e tangerina 'Sunki' apresentaram comprimento médio de lesão 6,67, 10,83 e 15,06 mm, respectivamente, confirmando a alta resistência de *P. trifoliata* 'Rubidoux' e a alta suscetibilidade de *C. sunki*. Os métodos de inoculação via disco e de inserção sob casca mostraram-se eficientes na discriminação de genótipos em relação à resistência a gomose.

#### **4.2.4 Inoculações de *Phytophthora parasitica* usando o método do disco e palito-dente infestado em porta-enxertos de citros**

No Quadro 11 encontram-se apresentados os dados das inoculações de *P. parasitica* usando dois métodos de inoculação e duas épocas da avaliação.

Quadro 11. Médias de lesão de gomose de *Phytophthora* em mm, obtidas em dois genótipos usando-se dois métodos de inoculação em duas épocas de avaliação.

Genótipo	14 dias		21 dias	
	palito	disco	palito	disco
<i>P. trifoliata</i> 'Rubidoux'	4,954 b	6,075 b	5,434 b	6,772 b
<i>C. sunki</i>	8,171 a	9,375 a	8,459 a	10,635 a
CV	24,57		26,17	

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Analisando-se o Quadro 11, nota-se que os dois métodos de inoculação foram eficientes na discriminação de genótipos quanto à resistência a gomose. A avaliação realizada aos 14 dias, em pouco diferiu daquela realizada aos 21 dias notando-se pouco aumento no tamanho da lesão nesse tempo. As médias do tamanho das lesões de *P. parasitica* obtidas pelas inoculações com o método do disco foram maiores que o tamanho das lesões provocadas pelo método do palito. Não foi registrado efeito de genótipo vs. método, nos dois experimentos, revelados pelos valores de  $F = 0,037^{ns}$  e  $0,067^{ns}$ , para os experimentos de 14 e 21 dias, respectivamente.

Considerando os fatores produção de inóculo, tempo despendido na inoculação e condução dos experimentos, o método do disco apresentou maior praticidade e produziu lesões de maior tamanho. O método do palito pode ser empregado na inoculação *P. parasitica* em plântulas (Aguilar-Vildoso & Pompeu Jr., 1997) e em mudas sendo uma alternativa ao método do disco. Importante salientar que o ponto de inoculação deve ser bem protegido do meio externo, com algodão e gaze e mantido sempre umedecido, característica que torna o método mais trabalhoso.

#### 4.2.5 Inoculação de *Phytophthora parasitica* em plantas jovens usando palito-dente e agulha infestada

Os dados das inoculações com o palito-de-dente infestado com *P. parasitica* foram descartados da análise estatística devido ao número excessivo de plântulas que não apresentaram lesões. Observou-se que no ponto de inoculação, no momento da inserção do palito ocorre um fendilhamento das hastes das plântulas que contribui para cicatrização dos tecidos. No Quadro 12 encontram-se as médias de comprimento da lesão, em cm, provocadas por *P. parasitica* em plântulas de diversos genótipos, utilizando o método da agulha.

Quadro 12. Comprimento da lesão provocada por *Phytophthora parasitica* em plântulas de diferentes genótipos utilizando o método da agulha infestada.

Genótipos	Tamanho da lesão (cm)
Citrange ‘Troyer’ ( <i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> )	0,858 e
Citrange ‘Carrizo’ ( <i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> )	1,015 dce
Citrange ‘Morton’ ( <i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> )	0,984 dce
Citrange ‘Troyer tetraploide’	1,141 dce
Citrange ‘Carrizo tetraploide’	1,018 dce
tangerina ‘Sunki’ vs. <i>P. trifoliata</i> ‘English’	0,982 dce
tangerina ‘Cleópatra’ vs. <i>P. trifoliata</i> ‘Swingle’	0,959 dce
limão ‘Cravo’ vs. citrange ‘Carrizo’	0,875 e
tangerina ‘Cleópatra’ vs. <i>P. trifoliata</i>	1,112 dce
tangerina ‘Cleópatra’ vs. <i>P. trifoliata</i> ‘English’	0,999 dce
tangerina ‘Cleópatra’ vs. <i>P. trifoliata</i> ‘Swingle’	0,957 e
tangerina ‘Cleópatra’ vs. <i>P. trifoliata</i> ‘Swingle’	0,939 e
tangerina ‘Clementina’ ( <i>C. reticulata</i> ) vs. <i>P. trifoliata</i>	1,190 dce
tang. ‘Cleópatra vs. <i>P. trifoliata</i> ‘Christhian’	1,227 dc
tangerina ‘Cleópatra’ vs. <i>P. trifoliata</i> ‘Rubidoux’	0,982 dce
tangerina ‘Changsha’ vs. <i>P. trifoliata</i> ‘English large’	1,154 dce
Toranga Siamese vs. <i>P. trifoliata</i> ‘Gotha-road’	1,282 c
tangerina ‘Changsha’ vs. <i>P. trifoliata</i> ‘English small’	1,181 dce
limão ‘Cravo’ vs. <i>P. trifoliata</i> ‘Swingle’	1,198 dce
tangerina ‘Sunki’ vs. <i>P. trifoliata</i> ‘Benecke’	0,968 dce
(laranja ‘Shamouti’ vs. lar. ‘Mediterranean’) x <i>P. trifoliata</i> ‘Christiansen’	0,866 dce
tangerina ‘Miaray’ ( <i>C. reticulata</i> )	0,962 dce
limão ‘Cravo’ vs. <i>P. trifoliata</i> ‘Swingle’	1,595 b
limão ‘Siciliano’ – suscetível*	2,139 a
tangerina ‘Sunki’ – suscetível*	3,303 a
limão ‘Cravo’ – média resistência*	1,187 dce
<i>P. trifoliata</i> ‘Rubidoux’ – resistente*	0,861 e
<i>P. trifoliata</i> ‘Davis A’ – resistente*	0,996 dce

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. \* Segundo Fawcett (1923) e Rossetti (1947).

Analisando-se os dados do Quadro 12, observou-se que os cinco genótipos usados como padrão, ou seja, *P. trifoliata* ‘Rubidoux’ e ‘Flying Dragon’ (altamente resistentes); limoeiro ‘Cravo’ (moderadamente resistente) e limoeiro ‘Siciliano’ e tangerina ‘Sunki’ (altamente suscetíveis a *P. parasítica*) apresentaram médias de 0,86; 0,99; 1,19; 1,59 e 3,30 cm de comprimento, respectivamente. O método mostrou-se seguro e eficiente na discriminação da resistência dos genótipos quanto à reação de resistência ao patógeno, concordando com as reações obtidas sob as condições de campo (Fawcett, 1923; Rossetti, 1947). Os demais genótipos testados apresentaram reações intermediárias de resistência para gomose.

O método da agulha mostrou-se, prático, rápido e eficiente na discriminação de plantas jovens para gomose, podendo ser utilizado em programas de melhoramento onde se busca a avaliação precoce de material genético. O método do palito, nas condições deste experimento, apresentou um grande número de plantas sem sintomas impedindo a análise estatística dos dados pela técnica da análise de variância.

Dos genótipos de citrandarins testados alguns vêm sendo testados no campo em ensaio de porta-enxertos instalado na Fazenda Raios do Sol em São Carlos-SP, com destaque para os híbridos de tangerina ‘Sunki’ vs. *P. trifoliata* ‘Benecke’ e tangerina ‘Changsha’ vs. *P. trifoliata* ‘English Small’, que também têm apresentado boa produção de frutos (Pompeu Jr. et al., 2001). Wutscher & Bowman (1999) testaram 21 porta-enxertos de citros, entre os quais alguns citrandarins, na região central da Florida (EUA), usando como copa a laranja ‘Valência’. O genótipo HRS 812 - tangerina ‘Sunki’ vs. *P. trifoliata* ‘Benecke’, CN 1697 no BAG/CCSM, apresentou o segundo lugar em produção de frutos (kg/ha) e o primeiro em sólidos solúveis/ha, destacando-se como um genótipo com grande potencial como porta-enxerto para citros.

Carvalho (2000) testando diversas combinações de híbridos de citros para resistência e tolerância a *P. parasítica* concluiu que os mais promissores para resistência a gomose são aqueles representados pelos híbridos entre *C. sunki* vs. *P. trifoliata* e seus recíprocos. Isto vem reforçar o fato de que a escolha dos parentais intergenéricos e altamente contrastantes para o caráter de resistência a gomose, utilizados neste estudo foi correta.

### 4.3 Inoculação de *Phytophthora parasitica* em *C. sunki*, *P. trifoliata* ‘Rubidoux’ e híbridos

Os dados das inoculações de *P. parasitica* em *C. sunki*, *P. trifoliata* ‘Rubidoux’ e em 98 híbridos F<sub>1</sub> encontram-se no Quadro 13 e graficamente apresentados na Figura 02.

Quadro 13. Comprimento médio de lesão, em mm, causada por *Phytophthora parasitica*, em 98 híbridos obtidos do cruzamento entre *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* ‘Rubidoux’ (média de 10 repetições).

Híbrido	Média	Híbrido	Média	Híbrido	Média	Híbrido	Média	Híbrido	Média
1	9,8	47	14,6	109	8,0	133	9,3	156	7,8
2	14,8	49	9,2	110	10,7	134	13,1	160	9,0
4	10,4	54	11,1	111	14,4	135	10,3	161	12,9
5	9,6	56	13,6	113	11,7	136	14,1	163	10,1
6	13,0	57	10,3	114	9,3	137	12,2	165	9,9
7	9,2	59	10,7	115	13,9	139	12,5	166	12,4
8	11,0	62	9,9	116	9,8	140	11,4	172	12,7
10	14,1	68	12,1	117	11,7	141	12,1	173	10,4
11	9,9	70	12,3	118	11,7	142	12,5	176	11,6
14	12,5	73	13,6	119	10,7	143	9,5	177	12,6
15	11,8	77	12,1	121	12,9	144	12,8	179	13,3
17	13,9	80	13,4	123	12,0	145	12,5	183	12,9
18	10,0	81	17,3	124	12,0	146	14,4	184	13,5
19	13,6	101	10,7	125	9,4	147	10,0	187	10,6
20	12,3	102	10,9	126	13,0	148	13,5	189	10,9
23	11,4	104	15,2	127	13,0	149	11,4	191	13,4
26	10,3	105	12,9	128	10,8	150	12,0	192	14,5
31	9,4	106	9,8	129	12,7	151	10,7	193	8,2
37	13,6	107	13,5	130	13,9	152	12,7	‘Rubidoux’	5,3
42	13,8	108	11,0	132	10,6	154	9,8	‘Sunki’	18,1

Através da Figura 02, encontra-se ilustrado, graficamente, a distribuição do comportamento dos parentais e 98 híbridos inoculados com *P. parasitica*. Os dados foram posteriormente utilizados no trabalho de mapeamento genético da resistência a gomose.

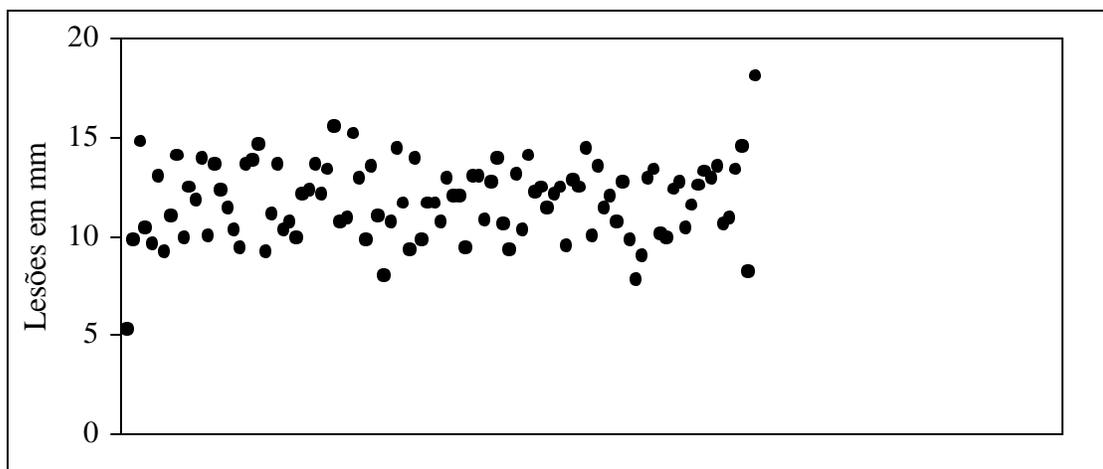


Figura 02. Distribuição das médias de lesões de gomose causadas por *Phytophthora parasitica* em híbridos e parentais.

Na Figura 03, conforme histograma apresentado, observam-se os resultados da reação dos genótipos à inoculação com *P. parasitica* e a curva de distribuição normal esperada resultante da inoculação de *C. sunki* e *P. trifoliata* 'Rubidoux' e de 98 híbridos do cruzamento.

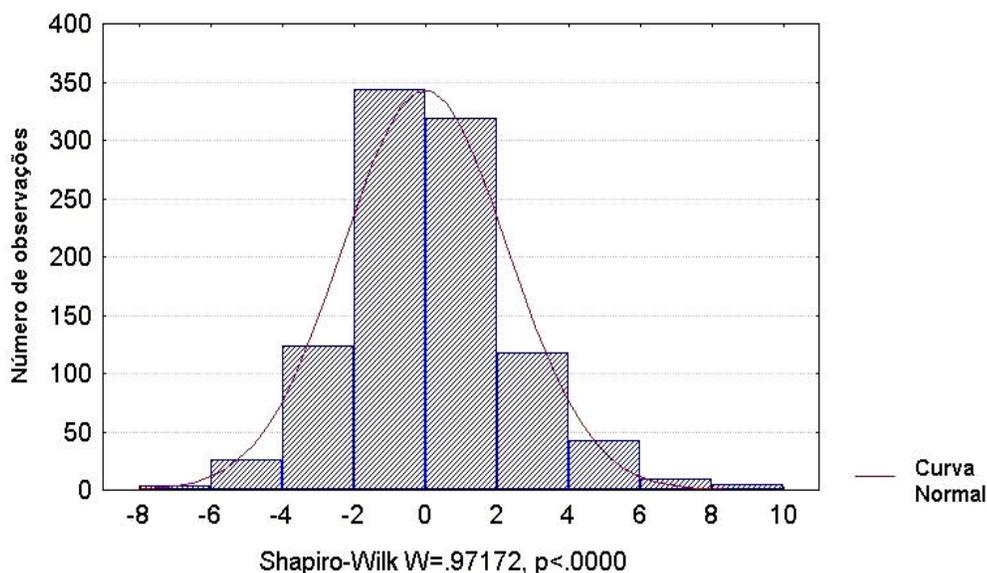


Figura 03. Histograma mostrando a distribuição normal das observações fenotípicas dos híbridos  $F_1$  resultante do cruzamento entre *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux' inoculados com *Phytophthora parasitica*.

Observando o Quadro 13 e a Figura 02, constatou-se que a maioria dos 98 híbridos testados apresentou médias entre 10 e 15 mm de comprimento de lesão. Os parentais *C. sunki* e *P. trifoliata* 'Rubidoux', que representam os pontos extremos na Figura 02, apresentaram comprimento médio da lesão de 18,10 e 5,30 mm, respectivamente. As médias extremas da progênie F<sub>1</sub> do cruzamento variaram entre 7,8 e 15,2 mm de comprimento.

No Quadro 14 encontram-se os dados da análise de variância (ANOVA) dos dados de fenotípicos dos híbridos inoculados com *P. parasitica* nos três ensaios experimentais.

Quadro 14. Quadro de análise de variância dos dados da inoculação de *Phytophthora parasitica* em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux'.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F
Ensaio	2	204,9013468	13,55*
Genótipo	97	3102,0759106	4,19*
Ensaio x genótipo	196	2858,1986532	1,93*
Resíduo	693	5239,0000	
Total	988		
CV	23,34		

No Quadro 15 encontram-se os dados da análise de variância (ANOVA) das médias dos três ensaios realizados em épocas distintas envolvendo a inoculação dos híbridos.

Quadro 15. Quadro de análise de variância dos ensaios montados em três diferentes épocas para inoculação de *Phytophthora parasitica* em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux'.

Fonte de variação	GL	Média	Soma de quadrados	Coefficiente de variação	Valor de F
Ensaio 1	97	11,3267	2607,3201	25,37	3,16*
Ensaio 2	97	11,6163	1850,7821	22,36	2,74*
Ensaio 3	97	12,4356	2249,8283	22,55	1,93*
Resíduo	602		4550,5218		
Total	979				

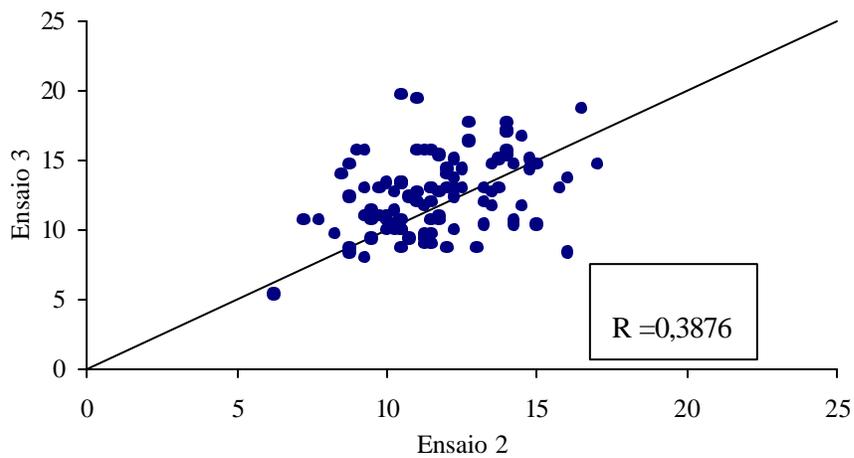
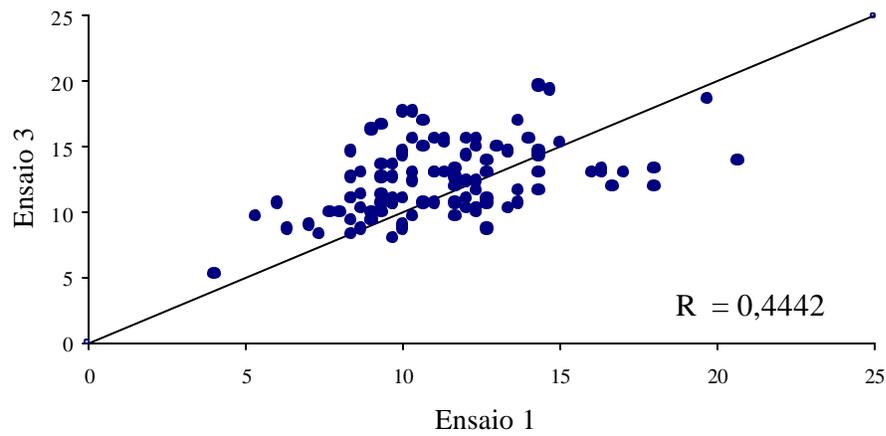
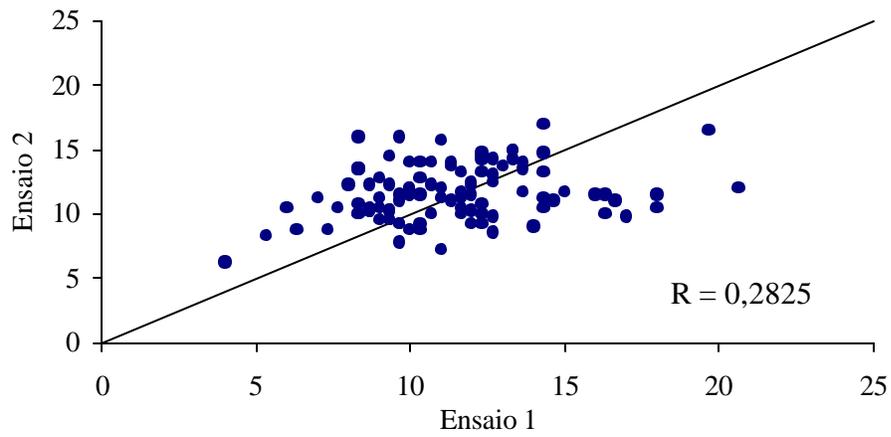


Figura 04. Gráficos das relações entre os três ensaios e os índices de correlação (R): ensaios 1 vs. 2 = 0,2825; 1 vs. 3 = 0,4442 e 2 vs. 3 = 0,3876.

As relações entre os ensaios 1, 2 e 3 estão demonstradas na Figura 04 que mostra graficamente as relações entre os três ensaios e os resultados dos coeficientes de correlação 0,2825 para os ensaios 1 x 2; 0,4442 para os ensaios 1 x 3 e 0,3876 para os ensaios 2 x 3.

Analisando-se globalmente os resultados das inoculações causadas por *P. parasitica* nos parentais *C. sunki* e *P. trifoliata* 'Rubidoux' e em 98 indivíduos da progênie F<sub>1</sub> constatou-se o comportamento intermediário dos híbridos F<sub>1</sub> com relação à resistência a gomose dos parentais. No entanto, observou-se pelas análises estatísticas que houve efeito de ensaio, de genótipos e de ensaio vs. genótipos.

O efeito do genótipo é explicado pela segregação dos genes na população avaliada fato que possibilitou a detecção de marcadores e QTLs associados ao caráter de resistência ao patógeno. Furr & Carpenter (1961), Laville (1975) e Hutchison (1985), observaram o mesmo fenômeno em cruzamentos distintos avaliados anteriormente.

A característica quantitativa das reações de genótipos de citros e gêneros correlatos, no patossistema citros-*Phytophthora*, apresentadas dentro de um mesmo genótipo num experimento, é um fenômeno comum em inoculações de campo e de casa de vegetação, conforme observado por diversos autores (Klotz & Fawcett, 1930; Rossetti, 1947; Carpenter & Furr, 1962; Matheron et al., 1998; Carvalho, 2000).

O efeito do ensaio é explicado pelas diferenças entre as médias apresentadas nos três ensaios (Quadro 15). As alterações, mesmo que pequenas no ambiente, ou mesmo, o próprio efeito do QTL, que é muito vulnerável às mudanças de ambiente na expressão fenotípica do caráter associado ao efeito do inoculador, o crescimento diferencial do patógeno nas placas de Petri e outros fatores residuais não controlados podem gerar efeitos pronunciados nas respostas individuais dos genótipos quando as inoculações são realizadas em épocas distintas.

Embora as condições do ambiente da câmara úmida tenham sido mantidas quase constantes (UR do ar e temperatura), foi detectado um efeito de ensaio vs. genótipo atribuído às diferenças respostas dos genótipos submetidos a épocas de inoculação distintas (efeito ambiental). A influência das condições de ambiente na expressão da

resistência de genótipos no patossistema citros-*Phytophthora* é um fator já conhecido e descrito por Fawcett, (1923) e Matheron et al. (1998).

O ambiente exerce influência na variação fenotípica (genótipo + ambiente) principalmente quando se trata de caracteres quantitativos, como é o caso da resistência de citros a gomose (Hearn, 1974; Graham & Castle, 1993).

Em estudos de seleção de genótipos, o ideal seria isolar a influência da interação genótipo vs. ambiente. Isto é possível apenas em sistemas quando a herança é qualitativa e apresenta genes aditivos com 100% de penetrância e expressividade, fato raro na natureza. As estratégias para eliminar este efeito seriam conduzir ensaios em diferentes ambientes, tentando comprovar a estabilidade de expressão ou aumentar o número de indivíduos da população segregante, ambas de alto custo (Tinker & Mather, 1997).

O Quadro 16 traz os dados de esperanças matemático-estatísticas para os fatores ensaio, genótipo e ensaio x genótipo (resíduo), necessários para a estimativa da herdabilidade ( $h^2$ ) do caráter (Falconer, 1989).

Quadro 16. Quadro das esperanças dos quadrados médios para ensaio, genótipos e ensaios x genótipos (resíduo).

Fonte de variação	Esperança dos QM	Quadrados médios*
Ensaio	$s^2 + 3,3 \cdot s^2_{e.g} + 326,7 \cdot s^2_e$	102.450,6734
Genótipo	$s^2 + 3,2727 \cdot s^2_{e.g} + 9,8182 \cdot s^2_g$	31,6538358
Ensaio x genótipo	$s^2 + 3,3 \cdot s^2_{e.g}$	14,5926462

\* Obtidos da ANOVA

A herdabilidade ( $h^2$ ) no sentido amplo, que considera a variação entre plantas ao nível de médias e ainda definida como a fração da variância fenotípica que pode ser atribuída a causas genotípicas, foi estimada considerando pela seguinte forma:

$$s^2_g = \text{Variância genotípica} = \frac{\text{QM (gen)} - \text{QM (ens. x gen.)}}{9,9182}$$

$$s^2_g = \frac{31,6538358 - 14,5926462}{9,9182} = 1,738729$$

$$s^2_r = \text{QM (res.)} = 7,5598846$$

$$h^2 = \frac{s^2_g}{s^2_g + s^2_E} = \frac{1,738729}{1,738729 + 7,5598846} = 0,1870 = 18,7\%$$

O fato da média das lesões provocadas por *P. parasitica* apresentadas pelos híbridos inoculados se situarem ao redor da média geral do experimento (11,77 mm) e equidistante da média dos parentais já denuncia o caráter quantitativo e herança de natureza complexa do caráter de resistência a gomose. O baixo valor da herdabilidade do caráter de resistência a gomose (18,7%) e apresentas variação contínua no fenótipo confirma que a doença é governada por poligenes.

#### **4.4 Mapeamento de marcadores moleculares e QTLs ligados ao caráter de resistência a gomose dos citros**

##### **4.4.1 Identificação de marcadores ligados à resistência a gomose dos citros**

Os dados das análises realizadas pelo teste F e os resultantes do confronto de 170 marcadores RAPD com os dados fenotípicos encontram-se demonstrados no Quadro 17. No teste de associação entre marcadores moleculares e a característica fenotípica (gomose) foi considerada a média bruta dos dados fenotípicos obtidos pelas plantas nos três ensaios.

Quadro 17. Identificação de ‘primers’ que geraram marcadores ligados à resistência a gomose dos citros em *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata* ‘Rubidoux’ utilizando o teste F.

‘Primer’	Níveis de significância	Grupos de ligação ‘Rubidoux’	Grupos de ligação de <i>C. sunki</i>
A04_480	0,0308*	I	
E16_519	0,0075	I	
E20_510	0,0098	I	
N05_1300	0,0006	II	
AV16_1400	0,0483	II	
AV03_250	0,0054	II	
M11_300	0,0041	II	
Q14_2200	0,0034	II	
A12_980	0,0176	II	
U08_1600	0,0148	II	
ATO3_1600	0,0019	III	
Q12_490	0,0439	IV	
UO3_1550	0,0180	IV	
C05_1500	0,0314	V	
C19_380	0,0016	V	
Z_680	0,0027	V	
U05_740	0,0043	V	
C06_990	0,0020	V	
AT07_3000	0,0015	VII	
Q05_500	0,0288		I
N06_1590	0,0112		II
C14_650	0,0086		II
AT07_1700	0,0016		III
R07_1610	0,0029		IV
C05_750	0,0035		IV
A01_980	0,0254		IV
AV05_900	0,0031		VII
C10_1030	0,0001		VII
N09_1550	0,0416		IX
A09_710	0,0001		Não mapeado**
A09_980	0,0025		Não mapeado
N13_1400	0,0040		Não mapeado
N11_500	0,0186		Não mapeado
Q14_620	0,0155		Não mapeado
U05_750	0,0235		Não mapeado
C06_1050	0,0216		Não mapeado

\* Valores obtidos pelo teste F, considerando os dados brutos das avaliações fenotípicas.

\*\*Marcadores não mapeados nos grupos de ligação dos mapas construídos por Cristofani et al. (1999).

Analisando-se o Quadro 17 observa-se que 36 marcadores estão associados à resistência a gomose em citros, apresentando co-segregação em relação aos valores fenotípicos da doença ao nível de significância de 5% de probabilidade. Dos 36

marcadores detectados, 29 marcadores encontram-se nos mapas de ligação construídos por Cristofani et al. (1999) dentre os quais 19 estão localizados em grupos de ligação de *P. trifoliata* 'Rubidoux' e 10 em grupos de ligação de *C. sunki*, conforme apresentado nas Figuras 05 e 06, respectivamente.

As análises estatísticas realizadas pelo teste paramétrico F revelaram alta associação entre marcadores RAPD e os valores fenotípicos de gomose, sendo possível identificar marcadores ligados à resistência a gomose em grupos de ligação de *C. sunki* e *P. trifoliata* 'Rubidoux' (Quadro 17). Importante notar que o grupo de ligação I de *P. trifoliata* 'Rubidoux' abriga também o gene de resistência ao CTV, detectado por Cristofani et al, 1999.

Os genes de resistência a patógenos, geneticamente não relacionados, podem estar fisicamente próximos, como verificado entre genes de resistência a nematóides e vírus (Roupe van der Voort et al., 1999) ou a nematóides e fungos (Meksem et al., 1999). Os rearranjos no DNA, tais como a duplicação e posterior expansão do gene de resistência, criam famílias multigênicas e possibilitam a recombinação intra e intergênica, permitindo a evolução dos genes de resistência em plantas (Richter & Ronald, 2000).

Resultados recentes de pesquisas indicam que um gene que confere resistência a determinado patógeno pode também atuar para outra espécie de patógeno. Rossi et al. (1998) demonstraram que o gene *Mi*, que confere resistência a *Meloidogyne incognita* e a outras espécies de nematóides da galha em tomateiro, também confere resistência a um afídeo da batateira.

Deng et al. (1997) trabalhando com mapeamento do gene de resistência a tristeza dos citros (CTV) especulam que uma mesma região do genoma de *P. trifoliata* pode abrigar a resistência ao nematóide dos citros *Tylenchulus semipenetrans* e ao CTV, simultaneamente. Hammond-kosack & Jones (1997) reportaram que diversas espécies vegetais podem apresentar regiões do genoma ricas em genes ligados a resistência a doenças, denominadas 'Resistance - gene rich region'.

A resistência genética em patossistemas na cultura dos citros onde não se observa a co-evolução planta- patógeno foi descrita, em *Poncirus*, por Deng et al., (1997). No entanto, a resistência nestes casos pode ser conferida por genes de resistência a patógenos similares, encontrados no local de origem do hospedeiro em questão. É interessante notar a presença da co-evolução entre patógeno e hospedeiro no patossistema citros - *Phytophthora*.

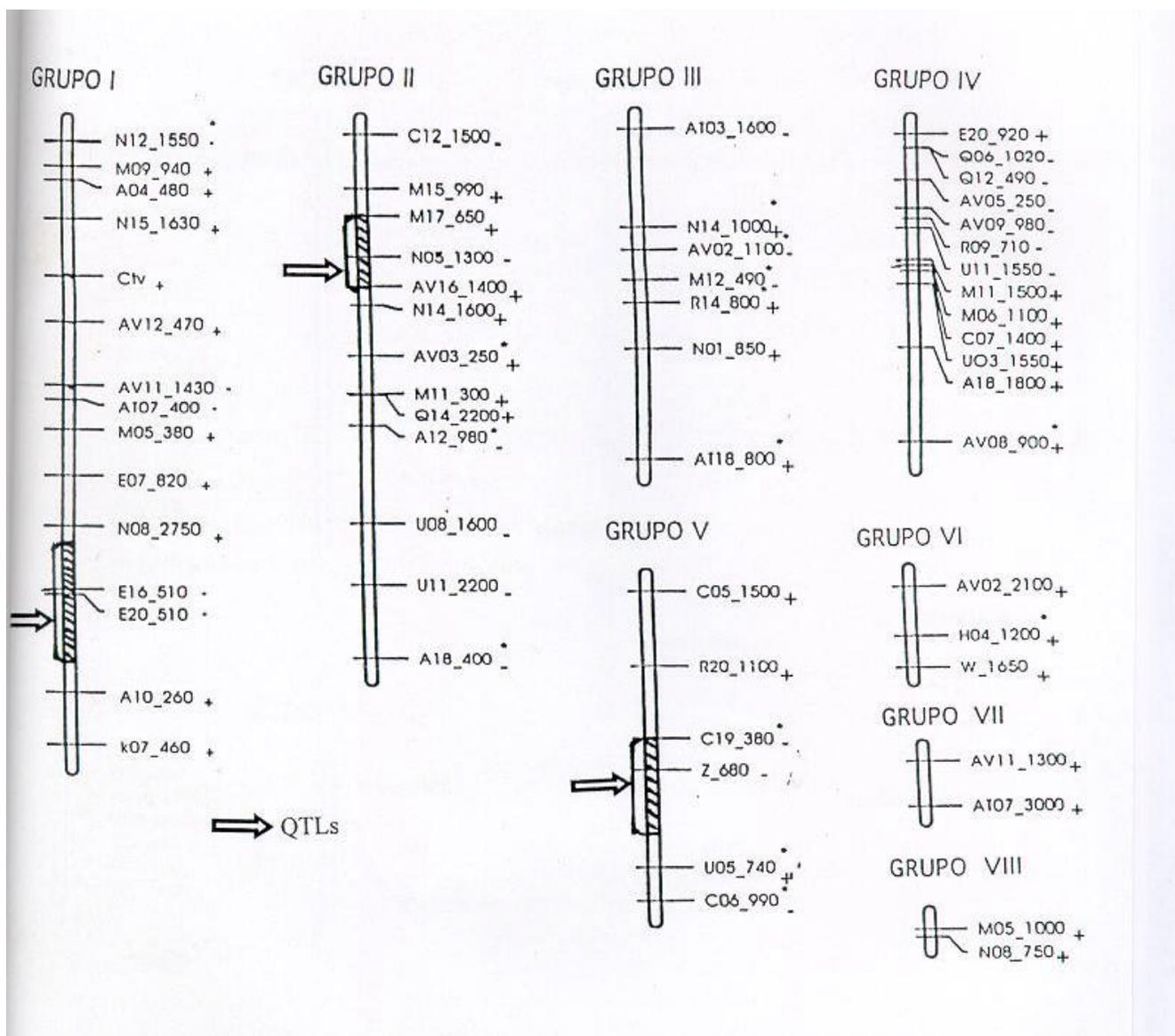


Figura 05. Mapa genético de *Poncirus trifoliata*. Os sinais + e - indicam as fases de ligação dos marcadores RAPD. Locos com distorção da taxa de segregação esperada de 1:1, estão indicados com asterisco. Setas indicam a posição do QTL (Adaptado de Cristofani et al., 1999).

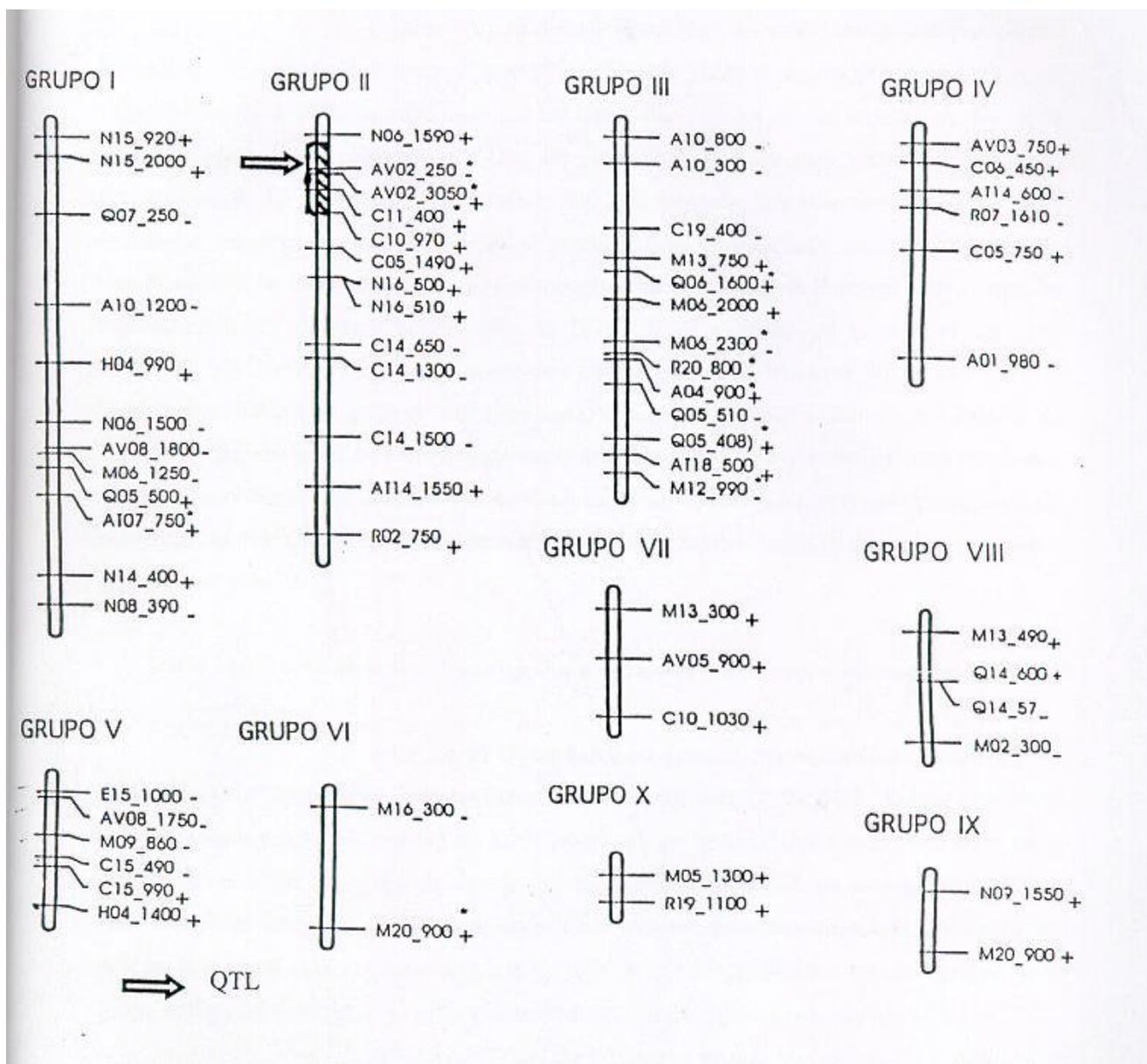


Figura 06. Mapa genético de *Citrus sunki*. Os sinais + e - indicam as fases de ligação dos marcadores RAPD. Locos com distorção da taxa de segregação esperada de 1:1 estão indicados com asterisco. Setas indicam a posição do QTL de resistência a gomose (Adaptado de Cristofani et al., 1999).

Os citros, originário do Sudeste asiático, foram introduzidos no Brasil há mais de 500 anos e o patógeno, *P. parasitica*, descrito como patógeno de centenas espécies vegetais (Erwin & Ribeiro, 1996), ocorre em citros na América do Sul há mais de 100 anos (Averna-Saccá, 1917; Fawcett, 1923). No caso da gomose dos citros, o patógeno provavelmente, foi introduzido na América do Sul, via solo infestado, em introduções de mudas de cultivares de copa importadas no passado. Esta possibilidade invalida a hipótese de que *P. parasitica*, embora um patógeno altamente polífago (Erwin & Ribeiro, 1996), tenha se especializado em genótipos introduzidos no Brasil. Provavelmente, os genes que conferem resistência a gomose dos citros que atuam nas plantas cultivadas no Brasil são os mesmos que conferem resistência a gomose em genótipos em outras regiões citrícolas no mundo. É importante salientar que a resistência genética às doenças em hospedeiros que aparentemente não experimentaram um histórico de co-evolução com o patógeno pode ser decorrente da existência de genes de resistência diferentes daqueles já suplantados por parasitas localmente adaptados (Ladle, 1992).

#### **4.4.2 Detecção de marcadores ligados a QTLs de resistência a gomose dos citros**

A detecção de QTLs ligados a gomose dos citros feita com auxílio do programa QTLCartographer pode ser visualizada pelas Figuras 07, 08, 09 e 10. Nas ordenadas está disposta a escala dos valores do LOD para cada grupo de ligação analisado. Na abcissa está a representação do grupo de ligação ‘cromossomo’ e as distâncias em centiMorgans. A linha ondulante demonstra o resultado da análise realizada pelo programa QTLCartographer. A linha horizontal indica o valor dos ‘LOD score’ limite de significância estatístico para cada grupo de ligação analisado. A região acima do limite ‘LOD score’ é considerada QTL.

Nas Figuras 07, 08, 09 e 10 estão demonstrados os QTLs associados à característica resistência a gomose dos citros detectados pela metodologia do mapeamento por intervalo composto, usando o programa QTLCartographer (Zeng, 1993, 1994). A presença do QTL foi considerada apenas quando foram obtidos picos do LOD para cada grupo de ligação analisado nos dois mapas de ligação.

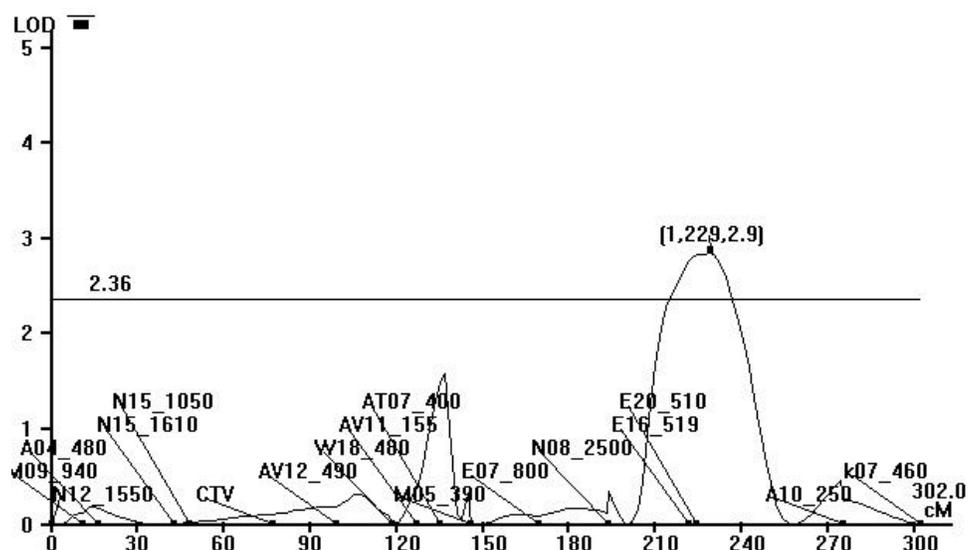


Figura 07. Análise do grupo de ligação I do mapa de *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux' mostrando a presença de QTL entre 210 e 240 centiMorgans (LOD = 2,9).

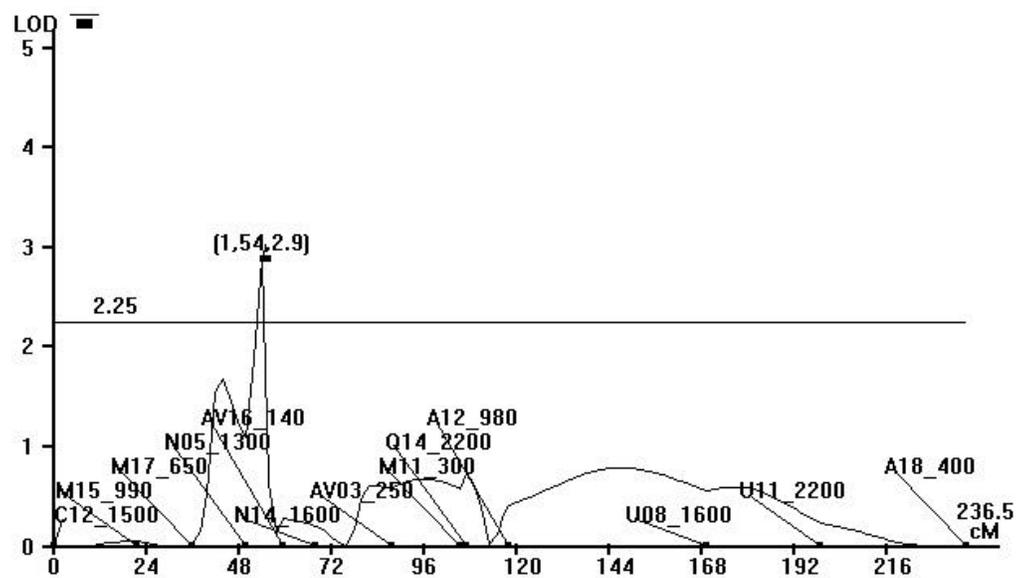


Figura 08. Análise do grupo de ligação II do mapa de *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux' e a presença de QTL entre os marcadores N05\_1300 e AV16\_1400 (LOD = 2,9).

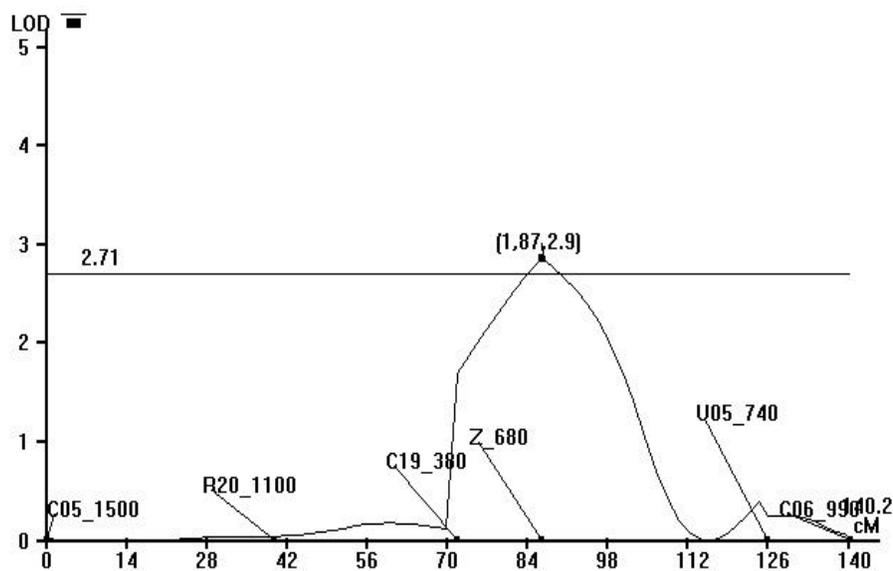


Figura 09. Análise do grupo de ligação V do mapa de *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux' e a presença de QTL entre 70 e 112 centiMorgans (LOD = 2,9).

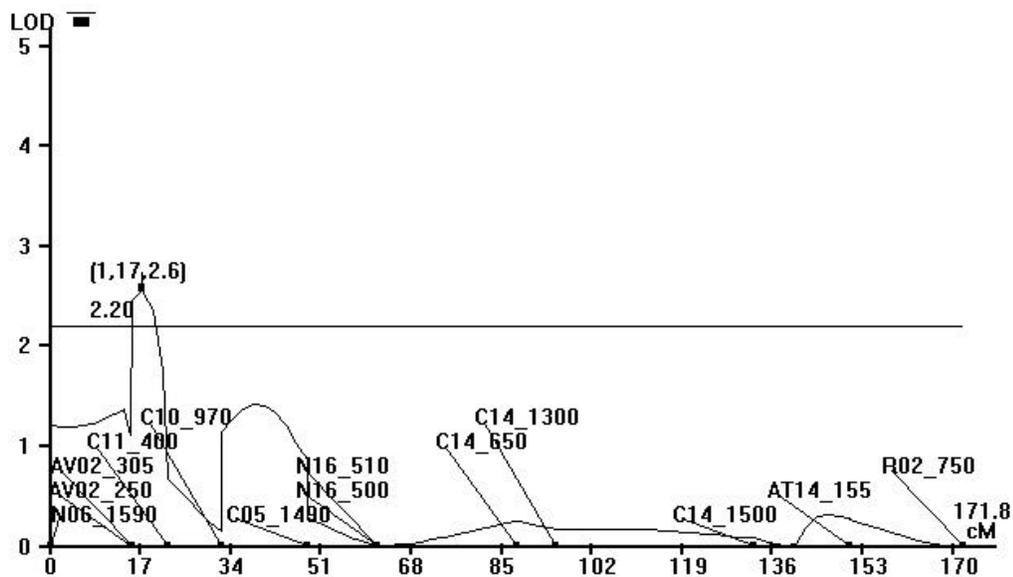


Figura 10. Análise do grupo de ligação II do mapa de *C. sunki* e a presença de QTL entre 17 centiMorgans e a posição do marcador C11\_400 (LOD = 2,6).

Analisando-se as Figuras 07, 08, 09 verifica-se a presença de três QTLs em *P. trifoliata* 'Rubidoux' o que reforça os dados de literatura de que este gênero é uma das mais importantes fontes de resistência às doenças que atacam os citros incluindo a resistência a gomose dos citros (Quadro 01) consistindo numa grande fonte de fatores genéticos de resistência a fitopatógenos (CTV, nematóides) e a outros caracteres de importância agrônômica, como tolerância ao frio.

A Figura 10 revela a presença de apenas um QTL ligado à resistência de *C. sunki* ao patógeno. O porta-enxerto *C. sunki* é classificado como medianamente suscetível a gomose por alguns autores (Quadro 01), fato que justificaria a presença do QTL, embora a resistência de *C. sunki* ao patógeno seja menor que a resistência apresentada pelo limoeiro 'Cravo', um genótipo classicamente de resistência moderada ao patógeno, em campo e no viveiro, como geralmente reportado por produtores e viveiristas.

Comparando-se a localização dos QTLs nas Figuras 07, 08, 09 e 10 e as posições nos mapas de ligação da maioria dos marcadores moleculares associados à resistência a gomose (Figuras 05 e 06) observa-se que há forte ligação entre a ocorrência de marcadores e QTLs.

No Quadro 18 estão dispostos os valores da estimativa da variação fenotípica explicada pelo QTL, representada pelo valor de  $R^2$  considerando-se os dois mapas de ligação analisados (*P. trifoliata* 'Rubidoux' e *C. sunki*) e obtidos das análises estatísticas realizadas pelo arquivo de saída Zmapqtl do programa QTL Cartographer (Basten et al., 2000). O programa forneceu ainda para cada grupo de ligação dos dois mapas, a posição absoluta do QTL (em Morgans) no cromossomo a partir do telômero esquerdo e o resultado do teste de  $X^2$  em relação ao valor tabelado para um grau de liberdade (3,84).

Quadro 18. Grupo de ligação dos parentais, marcadores moleculares entre o intervalo de mapeamento do QTL, posição absoluta do QTL a partir do telômero esquerdo, em Morgans, proporção da variação fenotípica explicada pelo QTL ( $R^2$ ) e efeito aditivo. (Dados fornecidos pelo QTL Cartographer).

Grupo de ligação	Marcadores associados ao intervalo	Posição absoluta do QTL	Valor do LOD	Valor do $X^2$ *	$R^2$ do pico	Efeito aditivo (a)
I de <i>P. trifoliata</i> 'Rubidoux'	E20_510 E16_519	2,2884	2,9	6,949	0,14	- 1,57
II de <i>P. trifoliata</i> 'Rubidoux'	N05_1300 AV16_1400	0,5392	2,9	5,839	0,60	+ 2,78
V de <i>P. trifoliata</i> 'Rubidoux'	Z_680 C19_380	0,8670	2,9	8,246	0,17	- 1,57
II de <i>C. sunki</i>	N06_1590	0,1733	2,6	10,910	0,18	- 0,58

\* Valor maior ou igual a 3,84 com 01 grau de liberdade para o intervalo do mapa nos grupos de ligação evidenciando a presença de QTL.

Os QTLs detectados nos grupos de ligação I, II e V de *P. trifoliata* 'Rubidoux' denominados de *Ppr-Pt1*, *Ppr-Pt2*, *Ppr-Pt3* (*Ppr* – *Phytophthora parasitica resistance*) são responsáveis por 14, 60 e 18% da variação fenotípica total de *P. trifoliata* 'Rubidoux' a gomose dos citros, respectivamente. O QTL *Ppr-Cs* detectado no grupo de ligação II de *C. sunki* explica 18% da variação fenotípica total do genótipo ao patógeno (Quadro 18). A detecção de QTLs controlando mais de 20% da variação fenotípica não é um fenômeno raro. A ação gênica pode ser avaliada para cada QTL detectado e uma variação expressiva com distribuição contínua tem sido verificada em poligenes (Tanksley, 1993).

A presença de marcadores moleculares e QTLs ligados ao caráter resistência a gomose dos citros e ao CTV em um mesmo grupo de ligação (I) [Figura 07] de *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux' indicam que esta região é de grande interesse na seleção de genótipos com resistência múltipla a doença pois revela que os genes podem estar associados em agregado 'clusters'. O seqüenciamento e o mapeamento fino desta região pode a vir elucidar esta teoria.

A detecção de vários locos de resistência a gomose dos citros em *P. trifoliata* 'Rubidoux' e a reação dos indivíduos da progênie em relação à resistência *P.*

*parasítica*, indica que este caráter é de natureza complexa, concordando com as teorias defendidas por Furr & Carpenter (1961), Hutchison (1985) e Graham & Castle (1993).

O baixo valor da herdabilidade (18,7%) corrobora a hipótese de que a herança da resistência a *P. parasítica* é governada por poligenes. O efeito aditivo, observado em apenas um dos QTLs ligados à resistência a gomose dos citros, contribui negativamente no valor da herdabilidade do caráter e reforça a tese da natureza quantitativa da doença (Falconer, 1989).

Diversos marcadores moleculares do tipo RAPD apresentaram forte ligação genética com os QTLs associados à resistência a gomose (*Ppr-Pt*) (*Phytophthora parasítica* resistance – *P. trifoliata*). Em função desta ligação, os marcadores podem ser úteis na seleção e manipulação dos genes *Ppr-Pt* em cruzamentos com genótipos superiores suscetíveis a gomose, permitindo discriminar nas progênies os indivíduos que herdaram genes de resistência.

A variação existente na resposta de genótipos de citros à *P. parasítica* pode ser atribuída à presença ou ausência do QTL nos indivíduos da progênie. Plantas portadoras da combinação favorável de QTLs, presença de dois ou os três QTLs, apresentariam resistência a *P. parasítica*, analogamente, em que plantas com uma combinação desfavorável seriam suscetíveis ao patógeno.

Em outras doenças dos citros, a base genética da resistência aos fitopatógenos tem se mostrado de herança simples e oligogênica, como nos patossistemas CTV – *P. trifoliata* (Mestre et al., 1997; Cristofani et al., 1999), *T.semipenetrans* - *P. trifoliata* (Ling et al., 2000). 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 (elicitor) é reconhecido pelo produto do gene de resistência do hospedeiro (receptor), que desencadeia uma resposta de resistência na planta.

No presente trabalho foram encontrados marcadores do tipo RAPD ligados à resistência a *P. parasítica* associados a quatro QTLs. Um dos QTLs se encontra localizado no mesmo grupo de ligação em que foi mapeado o gene de resistência ao CTV por Cristofani et al. (1999). A disponibilidade de marcadores moleculares fortemente ligados a mais de uma característica de interesse agrônômico, como verificado entre os marcadores e QTLs ligados à resistência a gomose dos citros e ao CTV pode permitir ao melhorista de citros

selecionar quais indivíduos devem permanecer num programa de melhoramento, por identificar plantas resistentes e suscetíveis, mesmo em períodos desfavoráveis à ocorrência da doença.

A natureza dominante dos marcadores RAPD impede a distinção entre indivíduos resistentes homozigotos e heterozigotos, no entanto, outras técnicas moleculares como o desenvolvimento de ‘primers’ do tipo SCAR (Paran & Michelmore, 1993) permitirá discriminar indivíduos hetero e homozigotos.

O patossistema *Phytophthora*-citros constitui um sistema modelo para a aplicação da seleção assistida por marcadores em espécies perenes, face às seguintes características: o alto nível de polimorfismo dentro e entre espécies, facilidade de obtenção de híbridos interespecíficos férteis que mostram grande efeito da heterose e regeneração via embriogênese somática (Machado et al., 1997).

A descoberta de marcadores moleculares localizados próximos aos QTLs de interesse agrônômico pode ser um ponto de partida para estudos mais detalhados como o seqüenciamento da região genômica que contém os genes de interesse (Tanksley et al., 1989). A disponibilidade de marcadores moleculares fortemente ligados a QTLs para uma característica de interesse, permite ao melhorista decidir com mais eficiência e segurança quais indivíduos devem permanecer num programa de melhoramento, identificando indiretamente as plantas resistentes e suscetíveis, dispensando inoculações artificiais ou mesmo realizar a seleção em períodos desfavoráveis à ocorrência da doença.

## 5. CONCLUSÕES

1. Os isolados de *Phytophthora parasitica* apresentaram variação na agressividade quando inoculados em *Citrus limon* Burmann. e *C. limonia* Osbeck, destacando-se o isolado LRS 23/97, como mais agressivo aos dois genótipos.

2. A avaliação de resistência de genótipos a gomose pode ser realizada em plântulas “in vitro”, através de inserção de agulha infestada com o patógeno e através do método do disco e inserção sob casca do patógeno em plantas jovens.

3. Os híbridos F<sub>1</sub> inoculados, artificialmente através do método do disco, apresentaram lesões intermediárias em relação aos parentais e a baixa herdabilidade (18,7%) indicando que a herança da resistência a gomose é de natureza quantitativa. Esta hipótese foi

confirmada pela detecção de mais de um QTL envolvido na herança da resistência a gomose dos citros.

4. Foram identificados 36 marcadores moleculares do tipo RAPD associados ao caráter de resistência a gomose dos citros, dos quais, 19 marcadores foram mapeados nos grupos de ligação do mapa de *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux' e 10 distribuídos em diversos grupos de ligação do mapa de *Citrus sunki*

5. Foram detectados quatro locos controladores para características quantitativas (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*, confirmando a herança de natureza quantitativa da doença.

6. Os QTLs detectados, denominados *Ppr-Pt1*, *Ppr-Pt2*, *Ppr-Pt3* (resistência a *Phytophthora parasitica* em *Phytophthora trifoliata*), são responsáveis por 14, 60 e 17% da variação fenotípica de *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux' a gomose dos citros, respectivamente. O QTL *Ppr-Cs*, de resistência a *Phytophthora parasitica* detectado em *C. sunki*, controla 18% da variação fenotípica de *C. sunki* ao patógeno.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFEK, U., SZTEJNBERG, A. A rapid method for evaluating citrus seedlings for resistance to foot rot caused by *Phytophthora citrophthora*. *Plant Dis.*, v.74, p.66-8, 1990.

AFEK, U., SZTEJNBERG, A. Effects of Fosetyl-Al and phosphorus acid on scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathology*, v.79, p.736-9, 1989.

AGOSTINI, J.P. TIMMER, L.W., CASTLE, W.S., MITCHELL, D.J. Effect of citrus rootstocks on soil populations of *Phytophthora parasitica*. *Plant Dis.*, v.75, p.296-300. 1991.

AGRIOS, G.N. *Plant pathology*. San Diego: APS Press, 1997. 635p.

- AGUILAR-VILDOSO, C.I. *Caracterização genética de estirpes de Phytophthora parasitica, isoladas de plantas cítricas no Estado de São Paulo*. Piracicaba, 1997. 98p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo.
- AGUILAR-VILDOSO, C.I., POMPEU JUNIOR, J. Inoculação de *Phytophthora parasitica* em caules de variedades cítricas pelo método do palito. *Fitopatol. Bras.*, v.22, p.240, 1997.
- AMARO, A.A. Citricultura. *Inf. Econ.*, v.29, p.65-74, 1999.
- AMORIM, E.P.D. *Controle biológico de Phytophthora parasitica var. nicotianae Dastur e Phytophthora citrophthora (Sm. & Sm.) Leonian em plântulas de citros*. Botucatu, 1997. 111p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.
- ARAÚJO, J.R.G. *Caracterização química, bioquímica e horticultural de microtangerinas (Citrus spp.), de valor potencial como porta-enxertos*. Botucatu, 1998. 157p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.
- AUSTIN, D.F., LEE, M. Genetic resolution and verification of quantitative trait loci for flowering and plant height with recombinant inbred lines of maize. *Genome*, v.39, p.957-68. 1996.
- AVERNA-SACCÁ, R. Moléstias da laranjeira. *Bol. Agríc.*, v.18, p.334-346, 1917.
- BARRET, H.C., RHODES, A.M. A numerical study of affinity relationships in cultivated in *Citrus* and its close relatives. *System. Bot.*, v.1, p.105-36, 1976.

- 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.
- BENNETZEN, J.L. The use of comparative genome mapping in the identification, cloning, and manipulation of important plant genes. In: SOBRAL, B.W.S. (ed.). *Impact of plant molecular genetics*. Boston: Birhauser. 1999, p.71-85.
- BLAKER, N.S., McDONALD, J.D. The role of salinity in the development of *Phytophthora* root rot of citrus. *Phytopathology*, v.76, p.970-5, 1986.
- BRIEGER, F.G., MOREIRA, S. Experiências de cavalos para citrus II. *Bragantia*, v.5, n.10, p.597-653, 1945.
- BROADBENT, P. *Phytophthora* diseases of citrus: a review. *Proc. Int. Soc. Citricult.*, v.3, p.986-92, 1977.
- BROADBENT, P., GOLLONOW, B.I. Selecting disease-resistant citrus rootstocks. *Austr. J. of Exp. Agric.*, v.33, p.775-80, 1993.
- BROEMBSSEN, S.L., DEACON, J.W. Calcium interference with zoospore and infectivity of *Phytophthora parasitica* in nutrient irrigation solutions. *Phytopathology*, v.87, p.522-8, 1997.
- CAI, Q., GUY, C.L., MOORE, G.L. Extension of the linkage map in citrus using random amplified polymorphism DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold acclimation responsive loci. *Theor. Appl. Genet.*, v.89, p.606-14, 1994.

- CAMERON, J.W., FROST, H.B. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: REUTHER, W., BATCHELOR, L.D., WEBBER, (eds.), *The Citrus Industry*. California:University of California, 1968. p.325-70.
- CARLOS, E.F., STUCHI, E.S., DONADIO, L.C. Porta-enxertos para a citricultura paulista. *Bol. Citric.*, FUNDAÇÃO DE ESTUDOS E PROJETOS/UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, n.1, p.1-47, 1997.
- 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. *Theor. Appl. Genet.*, 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.
- CARVALHO, M.L.T. *Reação de porta-enxertos híbridos de citros à infecção de tronco e raízes por Phytophthora parasitica*. Campinas, 2000, 82p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular/Genética Vegetal e Melhoramento) - Universidade Estadual de Campinas.
- CASTLE, W.S., TUCKER, D.P.H., KREZDORN, A.H., YOUTSEY, C.O. Rootstocks for Florida citrus: rootstocks selection - The first step to success. 2a. ed. Orlando:IFAS, University of Florida, 1993. 92p.
- CERVERA, M.T., GUSMÃO, J., STEENACKERS, M., PELEMAN, J., STORME, V., VANDEN BROECK, A., VAN MONTAGU, M., BOERJAN, W. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*. *Theor. Appl. Genet.*, v.93, p.733-7. 1996.

- CHENG, F.S., ROOSE, M.L. Origin and inheritance of dwarf by the *Citrus* rootstocks *Pontius trifoliata* 'Flying Dragon'. *Journal of American Hort. Science*, v.120, p.286-91, 1995.
- CHOI, S.H., GREEN, S.K., LEE, D.R. Linkage relationship between two genes conferring resistance to peanut strip virus and soybean mosaic. *Euphytica*, v.44, p.163-6, 1989.
- CHURCHILL, G.A., DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, v.138, p.963-71, 1994.
- COHEN, M., GRIMM, G.R., BISTLINE, F.W. Foot rot in young groves. *Proc. Fl. State Hortic. Soc.*, v.22, p.45-53, 1964.
- CRISTOFANI, M., TARGON, M.L.P.N., COLLETA FILHO, H.D., MACHADO, M.A. Identification of zygotic and nucellar embryos of poliembryonic varieties of citrus using RAPD markers. *Braz. J. of Genet.*, v.19, p.231, 1996.
- 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.
- CRUTE, I.R., PINK, D.A.C. Genetics and utilization of pathogen resistance in plants, *Plant Cell*, v.8, p.1747-55, 1996.
- DALBÓ, M. A. *Genetic mapping, QTL analysis and marker-assisted selection for disease resistance loci in grapes*. Ithaca, 1998, 120p. Thesis (Ph. & Dr. Agronomy) – Cornell University.

- DAVIES, F., ALBRIGO, L.G. Taxonomy, cultivars and breedings. In: GMITTER, J., GROSSER, J.W., MOORE, G.A. (eds.). *Citrus*, Waalingford:CAB International. p.345-78, 1994.
- DENG, Z., HUANG, S.Y., XIAO, S., GMITTER, C.M. Development and characterization of SCAR markers linked to the citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genome*, v.40, p.697-704, 1997.
- DURHAM, R.E., LIOU, P.C., GMITTER, F.G., MOORE, G.A. Linkage of restriction fragment polymorphisms and isozymes in *Citrus*. *Theor. Appl. Genet.*, v.84, p.39-48, 1992.
- DURHAM, R.E. *Mapping genes involved in freezing tolerance in a backcross of Citrus and Poncirus using a linkage map of isoenzymes and restriction fragment length polymorphisms*. Gainesville, 157p. 1990. Thesis (Ph. & D. Agronomy) - University of Florida.
- EDWARDS, M.D., STUBER, C.W., WENDELL, J.F. Molecular-marker facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. *Genetics*, v.116, p.113-25, 1987.
- ERWIN, D.C., RIBEIRO, O.K. *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul:APS Press, 1996. 562p.
- FALCONER, D.S. *Introduction to quantitative genetics*. England:Logman Scientific and Technical, 1989. 438p.
- FARIH, J.A., MENGE, J.A., TSAO, P.H. OHR, H.D. Metalaxyl and efosite aluminium for control of *Phytophthora* gummosis and root rot of *Citrus*. *Plant Dis.*, v.65, p.654-7, 1981.
- FAWCETT, H.S. Gummosis on citrus. *J. of Agric. Res.*, v.24, p.235-55, 1923.

- FAWCETT, H.S. *Citrus disease and their control*. New York: McGraw-Hill, 1936. 656p.
- FAWCETT, H.S., BITANCOURT, A.A. Occurrence, pathogenicity, and temperature relations of *Phytophthora* species on citrus in Brazil and other South American countries. *Arq. Inst. Biol.*, v.11, p.107-19, 1940.
- FEICHTENBERGER, E., ROSSETTI, V. POMPEU JR, J. TEOFILO SOBRINHO, J. FIGUEIREDO, J.O. Evaluation of tolerance of *Phytophthora* species scion rootstocks combinations of citrus in Brazil - A review. In: *Proc. of the International of Citricul. Congress*, 7<sup>th</sup>, v.2, Acireali, Italy, p.854-8, 1992.
- 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.
- FEICHTENBERGER, E., TRAVEL, A.P. Efeito de fungicidas sistêmicos e fosfitos no desenvolvimento de lesões de *Phytophthora parasitica* em laranjeiras 'Hamlin'. *Fitopat. Bras.*, v.24, p.289. 1999.
- FELD, S.J., MENGE, J.A., STOLZY, L.H. Influence of drip and furrow irrigation n *Phytophthora* root rot of citrus under field and greenhouse conditions. *Plant Dis.*, v.74, p.24-7, 1990.
- FERREIRA, M.E., RIMMER, S.R., WILLIAMS, P.H., OSBORN, T.C. Mapping loci controlling *Brassica napus* resistance to *Leptosphaeria maculans* under different screening conditions. *Phytopathology*, v.85, p.213-7, 1995.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPLAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética*. 2.ed. Brasília:EMBRAPA-CENARGEM, 1996. 220p.

- FRASER, L. *Phytophthora* root rot of citrus. *J. of Austr. Inst. Agric. Science*, v.8, n.2, p.101-8, 1942.
- FURR, J.R., CARPENTER, J.B. Program for breeding citrus rootstocks tolerant to *Phytophthora* root rot. *Proc. Flor. State Horticult. Society*, v.18, p.18-23, 1961.
- GAUTAM, Y., CAHILL, D.M., HARDAM, A.R. Development of a quantitative Immunodipstick assay for *Phytophthora nicotianae*. *Food Agric. Immunol.*, v.11, p.229-42. 1999.
- GMELFARB, A., LANDE, R. Simulation of marker assisted selection in hybrids populations. *Genet. Res.*, v.63, p.39-47, 1994.
- GMITTER, F.G., XIAO, S.Y., HUANG, S., HU, X.L., GARNSEY, S.M., DENG, Z. A localized linkage map of the citrus virus resistance gene region. *Theor. Appl. Genet.*, v.92, p.688-95.1996.
- GMITTER, F., DENG, Z., MOORE, G.A. Utilization of DNA markers in citrus breeding programs. *Fruits, Paris*, v.53, p.303-6, 1998.
- GOODWIN, P.H., KIKPATRICK, B.C., DUNIWAY, J.M. Cloned DNA probes for identification of *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology*, v.79, p.716-21, 1989.
- GRAHAM, J.H. Evaluation of tolerance of *Citrus* rootstocks to *Phytophthora* root rot in chlamydospores infested soil. *Plant Dis.*, v.74, p.743-46, 1990.
- GRAHAM, J.H., CASTLE, W.S. Screening citrus genotypes for tolerance to *Phytophthora* root rot on chlamydospore infects soil. In.: CONGRESS OF INTERNATIONAL CITRUS NURSERYMEN (ISCN), 4, 1993, Johannesburg: ISCN, 1993. p.307-15.

- GRAHAM, J.H., TIMMER, L.W. *Phytophthora* disease of citrus. In: KUMMER, J. (Ed.). *Plant diseases of international importance*. N. Jersey: Prentice-Hall, 1992, v.3, p.250-69.
- GRAHAM, J.H. Root regeneration and tolerance of *Citrus* rootstocks to root rot caused by *Phytophthora nicotianae*. *Phytopathology*, v.85, p.111-7, 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.170-7, 1994.
- GRIMM, G.R., ALEXANDER, A.F. Citrus leaf pieces as traps for *Phytophthora parasitica* from slurries. *Phytopathology*, v.63, p.540-1, 1973.
- GRIMM, G.R., HUTCHISON, D.J. A procedure for evaluating resistance of citrus seedlings to *Phytophthora parasitica*. *Plant Dis.*, v.57, 669-72, 1973.
- GRIMM, G.R., WHIDDEN, R. Range of pathogenicity of Florida cultures of foot rot fungus. *Proc. Fl. State of Horticulture Soc.*, v.1, p.73-4, 1962.
- GROSSER, J.W., GMITTER, F.G. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germplasm enhancement and cultivars developments. *HortScience*, v.25, p.147-51, 1990.
- HAMMOND-KOSACK, K.E., JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.*, v.48, p.575-607, 1997.
- HAWKSWORTH, P.M., KIRK, P.M., SUTTON, B.C., PEGLER, D.N. *Dictionary of the Fungi*. Wallingford: Mycological Institute, 1995. 616p.

- HEARN, C.J., HUTCHISON, D.J., BARRETT, H.C. Breeding citrus rootstocks. *Horts.*, v.9, p.357-8, 1974.
- HEARN, C.J. Citrus scion improvement program. *Fruit Var. J.*, v.39, p.34-37, 1985.
- HERRERO, R., ASINS, M.J., CARBONELL, E.A. NAVARRO, L. Genetic diversity in orange subfamily *Aurantioideae* I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theor. Appl. Genet.*, v.92, p.599-609, 1996.
- HOUGH, A., MULDNER, N.J., LA GRANJE, J.M. Heat treatment for the control of *Phytophthora* gummosis in citrus. *Plant Dis.*, v.63, p.40-3, 1979.
- HUTCHISON, D.J. Rootstocks development screening and selection for disease tolerance and horticultural characteristics. *Fruit Var. J.*, v.39, p.21-5, 1985.
- IPPOLITO, A., NIGRO, F. LIMA, G. Influence of scion on the response of sour orange rootstock to experimentally induced *Phytophthora* gummosis and root rot. In.: *Proceed. Int. Soc. Citricult.*, v.1, p.385-8, 1996.
- JANSEN, R.C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics*, v. 135, p.201-11, 1993.
- JARRELL, D.C., M.L. ROOSE, S.N. TRAUGH, R.S. KUPPER. A genetic map of citrus based on segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross. *Theor. Appl. Genet.*, v.84, p.49-56, 1992.
- JIANG, C., ZENG, Z.B. Multiple trait analysis of genetic mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, v.140, p.1111-27, 1995.

- KAO, C.H., ZENG, Z.B., TEASDALE, R.D. Multiple interval mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, v.152, p.1203-16, 1999.
- KESSELI, R., WITSENBOER, H., STANGUELLINI, M., VANDERMARK, G., MICHELMORE, R. Recessive resistance to *Plasmopara lactucae-radicis* by bulked segregant analysis to a cluster of dominant disease resistance genes in *Lettuce*. *Molecular Plant-Microbe interactions*, v.6, p.722-8, 1993.
- KLOTZ L.J., FAWCETT, H.S. The relative resistance of varieties and species of citrus to *Pythiacystis* gummosis and other bark diseases. *J. of Agricult. Res.*, v.2, p.415-25, 1930.
- KLOTZ, L.J., DeWOLFE. Tetrazolium, an indicator of extent of infection in *Phytophthora* root rot citrus. *Plant Dis.*, v.49, p.423-4. 1965.
- KLOTZ, L.J., BITTERS, W.P., DeWOLFE, T.A. GARBER, M.J. Some factors in resistance of citrus to *Phytophthora* spp. *Plant Dis.*, v.52, p.952-5, 1968.
- KLOTZ, L.J., DeWOLFE, T.A., WONG, P.P. Influence of two varieties of citrus scions on the pathogenic of three isolates of *Phytophthora parasitica* to sweet orange rootstocks. *Phytopathology*, v.48, p.520-1, 1958.
- KOLLER, L., LINCHTEMBERG, L.A., FROSI, J.F. Porta-enxertos e altura de enxertia como forma de reduzir o ataque de gomose em limão (*Citrus limon* Burm.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7, 1983. Florianópolis. Anais., Florianópolis: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1983, p.710-20.
- KOSAMBI, D.D. The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugene*, v.12. p.172-5, 1944.

- KURAMAE-IZIOKA, EE., LOPES, C.R., SOUZA, N.L., MACHADO, M.A. Morphological characterization of *Colletotrichum* spp. from citrus orchards affected by postbloom fruit drop in Brazil. *Europ. J. of Plant Pathol.*, v.103, p.323-9, 1997.
- LADLE, R.J. Parasites and sex: catching the Red Queen. *Trees*, v.7, p.405-8, 1992.
- 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.
- LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. *Advances in Agronomy*, v.55, p.265-344, 1995.
- LESPINASSE, D. GRIVET, L., TROISPOUX, V., RODIER-GOUNG, M., PINARD, F., SEGUIN, M. Identification of QTLs involved in the resistance to South American leaf blight (*Mycrocyclis ulei*) in the rubber tree. *Theor. Appl. Genet.*, v.100, p.975-84, 2000.
- LING, P., DUNCAM. L.W., DENG, Z., DUNN, D., HU, X., HUANG, S., GMITTER, F.G. Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. *Theor. Appl. Genet.*, v.100, p.1010-7, 2000.

- LIOU, P.C. *A molecular study of citrus genome through restriction fragment length polymorphism and isozyme analysis*. Gainesville, 1990. 178p. Thesis (Ph.& D. Agronomy) - University of Florida.
- LIU, B.H. *Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis*. Boca Raton: CRC Press, 1998. 854p.
- LURO, F.F., LAIGRET, BOVÉ, J.M. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to citrus genetics taxonomy. *Proc. Int. Soc. of Citricult.*, v.2, p.225-8, 1992.
- LURO, F.M., LOURIEUX, F., BOVÉ, J.M., OLLITRAULT, P. Genetic mapping of an intergeneric *Citrus* hybrid using molecular markers. *Fruits*, n.49/50, p.404-8, 1994.
- LUTZ, A., MENGE, J.A. Population fluctuations and the numbers and types of propagules of *Phytophthora parasitica* that occur in irrigated citrus groves. *Plant Dis.*, v.75, p.173-9, 1991.
- MACHADO, M.A. Melhoramento de citros. In: SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1, 1997. *Anais.*, Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1997. p.199-207.
- MACHADO, M.A., COLLETTA FILHO, H.D., TARGON, M.L.P.N., POMPEU JR., J. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. *Euphytica*, v.92, p.321-6, 1996.
- MATHERON, M.E., MATEJKA, J.C. Effects of temperature on sporulation and growth of *Phytophthora citrophthora* and *Phytophthora parasitica* and development of foot and root rot on citrus. *Plant Dis.*, v.76, p.1103-9, 1992.

- MATHERON, M.E., WRIGHT, G.C., PORCHAS, M. Resistance to *Phytophthora citrophthora* and *Phytophthora parasitica* and nursery characteristics of several citrus rootstocks. *Plant Dis.*, v.82, p.1217-25, 1998.
- MAY, L.L. *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. *Rev. Bras. de Genética*, v.16, p.703-11, 1993.
- MEKSEM, K., DOUBLER, T.W., CHANCHAROENCHAI, K., NJITI, V.N., CHANG, S.J.C., RAO ARELLI, A.P., CREGAN, P.E., GRAY, L.E., GIBSON, P.T., LIGHTFOOT, D.A. Clustering among loci underlying soybean resistance to *Fusarium solani*, SDS and SCN in near-isogenic lines. *Theor. Appl. Genet.*, v.96, p.1131-42, 1999.
- MELCHINGER, A.E. Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breed.*, v.104, p.1-19, 1990.
- 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-enxertos para laranja 'Hamlin' de clone nucelar e clone velho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 1, 1971, *Anais.*, Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1971, p.489-503.

- MESTRE, P.F., ASINS, M.J., PIA, J.A., CARBONELL, E.A., NAVARRO, L. Molecular markers flanking citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Theor. Appl. Genet.*, v.94, p.458-64, 1997.
- MICHELMORE, R.W., PARAN, I., KESSELY, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.88, p.988-92, 1991.
- MICHELMORE, R.W. Isolation of disease resistance genes from crops plants. *Curr. Opinion Biotechnol.*, v.6, p.144-52, 1995.
- MIKLAS, P.N., JOHNSON, E., STONE, V., BEAVER, J.S., MONTOYA, C., ZAPATA, M. Selective mapping of QTL conditioning disease resistance in common bean, *Crop Science*, v.36, p.1344-51, 1996.
- MOORE, G.A., CASTLE, W.S. Morphological and isozymic analysis open-pollinated *Citrus* rootstocks population. *J. of Hered.*, v.70, p.59-63, 1988.
- MÜLLER, G.W., COSTA, A.S. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: ROSSETTI, V., MÜLLER, G.W., COSTA, A.S. (Eds.). Doenças dos citros. Campinas: Fundação Cargill, 1993. p.55-84.
- MURASHIGUE, T., TUCKER, W. F. Growth factor requirements of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1, 1968, Proc., Riverside, v.3, p.1155-66, 1992.

- MURRAY, M.G., THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.*, v.8, p.4321-5, 1980.
- OLIVEIRA, D.A. *Definição de modelo estatístico matemático adequado à experimentação de gomose dos citros*. Piracicaba, 1976. 80p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Experimentação e Estatística) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo.
- OLIVEIRA, A.A.R., SANTOS FILHO, W.S. Reação de híbridos e citros à infecção natural por gomose de *Phytophthora*. *Rev. Bras. de Fruticult.*, v.22, p.367-71, 2000.
- ORTUÑO, A., BOTIA, J.M., FUSTER, M.D. PORRAS, I., DELRIO, J.A. Effect of scoparone (6,7 Dimethoxycoumarin) Biosynthesis on the resistance of tangelo nova, *Citrus paradisi* and *Citrus aurantium* fruits against *Phytophthora parasitica*. *J. of Agric. Cult. and Food Chem.* v.45, p.2740-3, 1997.
- PARAN, I., MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance gene in lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, v.85,p.985-93, 1993.
- POMPEU JR, J. Porta-enxerto. In: RODRIGUEZ, O., VIEGAS, F., POMPEU JR, J., AMARO, A.A. (Eds.). *Citricultura brasileira*. 2.ed., Campinas:Fundação Cargill, 1991, v.1, p.116-52.
- POMPEU JR, J., LARANJEIRA, F.F, BLUMER, S. Laranjeiras 'Valência' enxertadas em híbridos de trifoliata em Pirassununga, São Paulo. *Scientia Agric.*, v.35, p.27-35, 2001.
- RICHTER, T.E. , RONALD, P.C. The evolution of disease resistance genes. *Plant Mol. Biol.*, v.42, p.195-204, 2000.

- RONDON, A., HUNG, G., SOLORZANO, R. Reacción de patrones cítricos a *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, en condiciones de umbráculo. *Agron.Trop.-Maracay*, v.43, p.117-25, 1993.
- ROOSE, M.L. Isoenzymes and DNA restriction fragment length polymorphisms in *Citrus* breeding and systematic. IN: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 6, 1988, *Proc.*, Tel Aviv:ICS, 1988, p.155-65.
- ROOSE, M.L., D.C. JARRELL, R.S. KUPPER. Genetic mapping in *Citrus* x *Poncirus* F<sub>2</sub> population. *Proc., Int. Soc. of Citricult.*, v.1, p.210-3, 1992.
- ROSSETTI, V. Estudos sobre a gomose de *Phytophthora* dos citros I - Suscetibilidade de diversas espécies cítricas a algumas espécies de *Phytophthora*. *Arq. Inst. Biol.*, v.18, p.97-124, 1947.
- ROSSETTI, V., BITANCOURT, A.A. Estudos sobre a gomose de *Phytophthora* dos citros II Influência do estado de vegetação do hospedeiro nas lesões experimentais. *Arq. do Inst. Biol.*, v.20, p.73-94, 1951.
- ROSSI, M., GOGGIN, F.L., MILLIGAN, S.B., KALOSHIAN, I., ULLMAN, D.E., WILLIAMSON, V.M. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc. Nalt. Acad. of Sci.*, v.95, p.9750-4, 1998.
- ROUPPE VAN DER VOORT, J., KANYUKA, K., VAN DER VOSSEN, E., BENDAHDANE, A., MOOIJMAN, P., KLEIN-LANKHORST, R., STIEKEMA, W., BAULCOMBE, D., BAKKER, J. Tight physical linkage of the nematode resistance gene *Gpa2* and the virus resistance gene *Rx* on a single segment introgressed from the wild species *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 into cultivated potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, v.12, p.197-206, 1999.

- RUIZ, C. BRETO, M.P., ASINS, M.J. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica*, v.112, p.89-94, 2000.
- SALIBE, A. A. *Curso de especialização em citricultura a nível de pós-graduado*. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 3.ed., 1974, 190p. (Apostila)
- SAS Institute. Inc. *Release 6.11 of the SAS system for Windows*. Raleigh, 1995.
- SAX, K. The association of size differences with seedlings pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*, v.8, p.341-50, 1923.
- SCHUTTE, G.C., BEZUIDENHOUT, J.J., KOTZÉ, J.M. Timing of application of phosphonate fungicides using different application methods as determined by means of gas-liquid-chromatography for *Phytophthora* root rot of citrus. *Phytophylactica*, v.23, p.69-71, 1991.
- SHEA, S.R., BROADBENT, P. Developments in cultural and biological control of *Phytophthora* diseases. In.: ERWIN, D.C. (Coord.). *Phytophthora, its biology, taxonomy, ecology and pathology*, St. Paul: American Phytopathological Society, 1983, p.335-50.
- SIVIERO, A., BOAVA, L., FURTADO, E.L., MASUDA, Y., MACHADO, M.A. Avaliação precoce de gomose de *Phytophthora* em plantas jovens de citros. *Fitopatol. Bras.*, v.25, p. 425, 2000.
- SMITH, G.S., HUTCHISON, D.J., HENDERSON, T. Screening sweet orange citrus cultivars for relative susceptibility to *Phytophthora* foot rot. *Proc. Fl. State Hortic. Sci.*, v.110, p.64-6. 1987.

- SMITH, G.S., HUTCHISON, D.J., HENDERSON, T. Comparative use of soil infested with Chlamydozoospores to screen for relative susceptibility to *Phytophthora* foot rot in citrus cultivars. *Plant Dis.*, v.75, p.402-5, 1991.
- SMITH, G.S., TEAGUE, P.W. Economic thresholds for *Phytophthora* foot rot of citrus using estimates of value of tree loss and chemical control costs. *J. of Agric.* v.2, p.184-9, 1989.
- STASKAWICZ, B. J., AUSUBEL, F.M., BAKER, B.J., ELLIS, J.G. JONES, D.G. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, v.268, p.661-7, 1995.
- STOLZI, L.H., LETEY, J., KLOTZ, L.J., LABANAUKAS, C.K. Water and aeration as factors in root decay of *Citrus sinensis*, *Phytophatology*, v.55, p.270-5, 1965.
- SUGAWARA, K., A. OOWADA. Identification of *Citrus* chimeras by RAPD markers. *Horts.*, v.30, p.1276-8, 1995.
- SULISTYOWATI, L., KEANE, P.J., ANDERSON, J.W. Accumulation of the phytoalexin, 6,7 dimethoxycoumarin, in roots and stems of citrus following inoculation with *Phytophthora citrophthora*. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.*, v.37, p.441-61, 1990.
- TANKSLEY, S.D., YOUNG, N.D., PATERSON, A.H. BONIERBALI, M.W. RPFL Mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Bio'technol*, v.7, p.257-64, 1989.
- TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. *Annu. Rev. of Gen.*, 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:Ceres. 1991, p.25-31.

- TIMMER, L.W., MENGE, J.A., ZITKO, E.S., POND, E., MILLER, S.A., JOHNSON, E.L.V.  
Comparison of ELISA techniques and standard isolation methods for *Phytophthora* detection in citrus orchards in Florida and California. *Plant Dis.*, v.77, p.791-6, 1993.
- TIMMER, L.W., GARNSEY, S.M., GRAHAM, J.M. *Compendium of citrus diseases*. St. Paul:APS Press: 2000. 80p.
- TINKER, N.A., MATHER, D.E. MQTL: Software for simplified composite interval mapping of QTL in multiple environments. *J. of QTL*, p.22-7, 1997.
- TOZLU, I., GUY, C.L., MOORE, G.A. QTL analysis of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> accumulation related traits in an intergeneric BC<sub>1</sub> progeny of *Citrus* and *Poncirus* under saline and nonsaline environments. *Genome*, v.42, p.692-705, 1999a.
- TOZLU, I., GUY, C.L., MOORE, G.A. QTL analysis of morphological traits in an intergeneric BC<sub>1</sub> progeny of *Citrus* and *Poncirus* under saline and nonsaline environments. *Genome*, v.42, p.1020-9, 1999b.
- TSAO, P.H., FANG, J.G., SZTEJNBERG, A., DAFT, G.C. Biological control with Fungi Antagonist against *Phytophthora* root rot of *Citrus*. *Proc. Int. Soc. of Citricult.*, v.1, p.394-6, 1996.
- TSAO, P.H., OCANA, G. Selective isolation of species of *Phytophthora* from natural soils on an improved antibiotic medium. *Nature (London)*, v.23, p.636-8, 1969.
- VARDI, A., EPSTEIN, E., BREIMAN, A. Is the *Phytophthora citrophthora* culture filtrate a reliable tool for in vitro selection of resistant *Citrus* variants?. *Theor. Appl. Genet.*, v.72, p.569-74, 1986.

- VARDI, A. Conventional and novel approaches to citrus breeding. *Proc. of Int. Soc. of Citricult.*, p.39-43, 1992.
- VEGA, M.P. De La, El uso de marcadores moleculares en genética vegetal y mejora. Investigación Agraria. *Produc. Prot. Vegetale*, v.12, p.33-60, 1997.
- VANDERWEYMEN, A. Influence de la variete D'agrumes sur la sensibilite du porte-greffe a la gommose a *Phytophthora*. *Al-Awamia*, v.60, p.67-80, 1980.
- VERNENGI, A., RAMIANDRASOA, F., CHUILON, S. RAVISE, A. Phytoalexines des citrus: seseline proprietés inhibitrices et nodulation de synthese. *Fruits*, v.42, p.103-11, 1987.
- WATANABE, T. *Pictorial atlas of soil and seed fungi*. Boca Raton: CRS Press:1994. 411p.
- WATHERHOUSE, G.M. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Davis:Conm. Myc. Papers, 1963. 22p.
- WELSH, J., McCLELLAND, M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Res.*, v.19, p.303-6, 1991.
- WHITESIDE, J.O. Some factors affecting the occurrence and development of foot rot on citrus trees. *Phytophatology*, v.61, p.1233-8, 1971.
- WHITESIDE, J.O. Zoospore-inoculation techniques for determining the relative susceptibility of citrus rootstocks to foot rot. *Plant Dis.*, v.58, p.713-7, 1974.

- WIDMER, T. L., GRAHAM, J.H., MITCHELL, D.J. Composted municipal waste reduces infection of citrus seedlings . *Plant Dis.*, v.82, p.683-8, 1998.
- WIDMER, T. L., GRAHAM, J.H., MITCHELL, D.J. Histological comparison of fibrous root-infection of disease-tolerant and susceptible citrus hosts by *Phytophthora nicotianae* and *P. palmivora*. *Phytopathology*, v.88, p.389-95, 1998.
- WILLIAMS, J.G.K., M.K. HANAFEY, J.A. RAFALSKI , S.V. TINGEY. Genetic analysis using random amplified DNA markers. In: R. WU, R. (Ed.) *Methods in enzymology, recombinant DNA*. San Diego:Academic Press:1993, p.218-28.
- WUTSCHER, H.K., BOWMAN, K.D. Performance of 'Valencia' Orange on 21 rootstocks in Central Florida. *Horts.*, v.34, p.622-4, 1999.
- YOUNG, N.D. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v.34, p.479-501, 1996.
- ZENG, Z.B. Theoretical basis of precision mapping of quantitative trait loci. *Proc. Natl. Acad. Sci 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, p.11-3, 1991.