



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

**REAÇÃO DE HÍBRIDOS DE CITROS À INOCULAÇÃO COM  
*Alternaria alternata* E ESTUDOS GENÉTICOS ASSOCIADOS**

**THAIS HELENA VILLA MICHIELIN**

**Araras**

**2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

**REAÇÃO DE HÍBRIDOS DE CITROS À INOCULAÇÃO COM  
*Alternaria alternata* E ESTUDOS GENÉTICOS ASSOCIADOS**

**THAIS HELENA VILLA MICHIELIN**

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIÂNGELA CRISTOFANI-YALY

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. MARINÊS BASTIANEL

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Produção  
Vegetal e Bioprocessos Associados  
como requisito parcial à obtenção do  
título de MESTRE EM PRODUÇÃO  
VEGETAL E BIOPROCESSOS  
ASSOCIADOS

Araras

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M624r Michielin, Thais Helena Villa  
Reação de híbridos de citros à inoculação com  
Alternaria alternata e estudos genéticos associados  
/ Thais Helena Villa Michielin. -- São Carlos :  
UFSCar, 2016.  
86 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2016.

1. Tangerinas. 2. Fungo. 3. Melhoramento. 4.  
Citricultura. 5. Mma. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos  
Associados

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Thaís Helena Villa Michielin, realizada em 17/06/2016:

---

Prof. Dra. Mariângela Cristofani-Yaly  
IAC

---

Prof. Dra. Carolina Munari Rodrigues  
IAC

---

Prof. Dr. Sérgio Alves de Carvalho  
IAC

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Às minhas orientadoras, Mariângela Cristofani-Yaly e Marinês Bastianel por me ajudarem de todas as maneiras, pela paciência e trocas de e-mail, por serem exemplos de profissionais e de mulheres os quais sempre levarei para a vida.

Aos meus pais, Rosângela Aparecida Villa Michielin e Mario Luis Baggio Michielin, por todo amor e carinho, paciência e incentivo.

Aos amigos de trabalho, Evandro Henrique Schinor pela ajuda, apoio e crédito depositado em mim ao longo dos anos e Fernando Alves de Azevedo, pela ajuda e sugestões para realização do trabalho.

Às colegas de trabalho, Kelly Aparecida Fernandes de Campos, Maiara Curtolo e Tatiany Aparecida Teixeira Soratto e a todas as pessoas que ajudaram na montagem e na realização dos experimentos e análises, sem os quais não teria sido possível a realização do mesmo.

À Banca Examinadora, pelas correções e sugestões que foram de grande valia para este trabalho.

A todos os colegas e professores da Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, pela Universidade Federal de São Carlos.

A todos os colegas e profissionais do Centro de Citricultura Sylvio Moreira CCSM/IAC, pela ajuda, apoio e amizade em todos esses anos.

A todos que de uma maneira ou outra colaboraram para que a realização deste trabalho se tornasse possível.

## SUMÁRIO

	Página
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	ii
<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>OBJETIVOS</b> .....	05
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	06
1    Tangerinas.....	06
2    Laranjas.....	08
3    Mancha marrom de alternaria.....	09
4    Melhoramento genético de citros .....	17
5    Mapeamento genético de citros.....	18
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	20
<b>CAPÍTULO 1. Reação de híbridos de citros à inoculação com <i>Alternaria alternata</i></b> .....	31
1    Resumo.....	32
2    Introdução.....	32
3    Materiais e Métodos.....	34
3.1    Material Vegetal.....	34
3.2    Isolado do fungo e preparo do inóculo.....	36
3.3    Inoculação de <i>Alternaria alternata</i> .....	36
3.4    Avaliação de sintomas de mancha marrom de alternaria.....	37
3.5    Avaliação das características físico químicas de frutos.....	39
3.6    Análises estatísticas.....	40
4    Resultados e Discussão.....	40
4.1    Avaliação dos sintomas de mancha marrom de alternaria.....	40
4.2    Avaliação das características físico-químicas.....	53
5    Conclusões.....	57
6    Literatura citada.....	57

<b>CAPÍTULO 2. Identificação de marcadores moleculares associados à resposta à mancha marrom de alternaria em híbridos de citros.....</b>	<b>62</b>
1    Resumo.....	62
2    Introdução.....	63
3    Materiais e Métodos.....	66
3.1    Material Vegetal.....	66
3.2    Isolado do fungo e preparo do inóculo.....	67
3.3    Inoculação de <i>Alternaria alternata</i> .....	68
3.4    Avaliação de sintomas de mancha marrom de alternaria.....	68
3.5    Análises estatísticas da severidade da doença.....	68
3.6    Associação entre marcadores e dados fenotípicos.....	69
4    Resultados e Discussão.....	69
4.1    Avaliação dos sintomas de mancha marrom de alternaria.....	69
4.2    Identificação de marcadores moleculares associados à resposta à mancha marrom de alternaria.....	71
4.3    Conteúdo gênico na região genômica associada à resistência a <i>A. alternata</i> .....	75
5    Conclusões.....	79
6    Literatura citada.....	79
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85





## ÍNDICE DE TABELAS

Página

### Capítulo 1

Tabela 1. Relação e classificação dos híbridos avaliados quanto à resposta à <i>Alternaria alternata</i> . TC: tangerina Cravo, LP: laranja Pera, TO: tangelo Orlando, TM: tangor Murcott, LV: laranja Valência, TP: tangerina Ponkan, MR: mexerica do Rio.....	35
Tabela 2. Severidade (%) e área abaixo da curva de progresso (AACPD) da mancha marrom de alternaria avaliadas após inoculações <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de <i>Alternaria alternata</i> em híbridos, seus genitores e variedades de citros.....	43
Tabela 3. Médias de massa do fruto, relação altura/diâmetro (A/D), rendimento de suco (RS), número de frutos por caixa dos genótipos (Itapetininga-SP, 21 de maio de 2015) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD).....	54

### Capítulo 2

Tabela 1. Parâmetros genéticos estimados com base em 52 híbridos F <sub>1</sub> da progênie do cruzamento TM x LP (tangor Murcott x laranja Pera) após três tempos da inoculação com <i>Alternaria alternata</i> .....	71
Tabela 2. Identificação de marcadores moleculares associados à resposta à mancha marrom de alternaria no grupo de ligação (GL) 3 do mapa genético integrado de tangor Murcott e laranja Pera.....	72
Tabela 3. QTL detectado para a característica e os modelos gênicos preditos observados nos intervalos genômicos correspondentes na versão atual do genoma de referência de <i>Citrus sinensis</i> .....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Morfologia da colônia de <i>A. alternata</i> em meio de cultura BDA após (A) uma semana de crescimento e (B) Microscopia óptica de <i>A. alternata</i> mostrando conídios em cadeia típicos da espécie.....	12
Figura 2. Sintomas característicos de mancha marrom de alternaria em (A) folha e (B) fruto de tangelo Nova.....	15
<b>Capítulo 1</b>	
Figura 1. Híbridos de citros mantidos em vasos em estufas teladas nas Coleções de BAG (Banco Ativo de Germoplasma) do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC (Cordeirópolis/SP).....	35
Figura 2. Representação de escala diagramática de dez níveis para determinar a porcentagem de área foliar com sintoma da mancha marrom de alternaria causada por <i>Alternaria alternata</i> , desenvolvida por Martelli (2011).....	38
Figura 3. Colônia de <i>A. alternata</i> (A); placas com meio de esporulação (B); transferência para esporulação (C); filtragem (D); contagem de esporos em microscópio óptico (D); visualização de esporos em câmara de Neubauer (F); estrutura reprodutiva do fungo (G); suspensão diluída (H) inoculação de folhas destacadas (I) e sintomas em folhas destacadas (J).....	38
Figura 4. Sintomas de MMA em folhas dos genótipos tangerina Dancy, tangor Murcott e do híbrido TM x TP 02, em 24 e 48 horas após a inoculação do fungo.....	41
Figura 5. Sintomas de MMA em folhas jovens de plantas dos híbridos (A) TM x TP 258, (B) TM x LP 225, (C) TM x LP 265 e planta assintomática de (D) LP 107 em 72 horas após a inoculação do fungo.....	42
Figura 6. Curva de correlação entre as avaliações <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> da inoculação do fungo <i>Alternaria alternata</i> . No eixo x, valores de severidade em folhas destacadas (média dos três tempos de avaliação) e no eixo y, valores de severidade em plantas.....	45
Figura 7. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) no grupo de (A) tangores, (B) tangerinas e (C) laranjas .....	47

Figura 8. Severidade da doença (%) em (A) folhas destacadas ( <i>in vitro</i> ) e (B) em plantas ( <i>in vivo</i> ), após 72 horas de avaliação, dos híbridos pertencentes ao grupo tipo Murcott, genitores e testemunha resistente (Fremont) e suscetível (Dancy).....	50
Figura 9. Severidade da doença (%) em (A) folhas destacadas ( <i>in vitro</i> ) e (B) em plantas ( <i>in vivo</i> ), após 72 horas de avaliação, dos híbridos pertencentes ao grupo tipo tangerina, genitores e testemunha resistente (Fremont) e suscetível (Dancy).....	51
Figura 10. Severidade da doença (%) em (A) folhas destacadas ( <i>in vitro</i> ) e (B) em plantas ( <i>in vivo</i> ), após 72 horas de avaliação, dos híbridos pertencentes ao grupo tipo laranja, genitores e testemunhas resistente (Fremont) e suscetível (Dancy).....	52
Figura 11. Dendrograma utilizando o método de agrupamento UPGMA e a distância Euclidiana com base nas médias das avaliações de 9 características morfológicas e químicas e porcentagem de área foliar lesionada após três tempos da inoculação de 82 genótipos de citros (G1 a G82) com <i>Alternaria alternata</i> .....	56

## Capítulo 2

Figura 1. Distribuição dos valores de AACPD em laranja Pera, tangor Murcott e híbridos.....	70
Figura 2. Grupo de ligação 3 do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera e a localização da região genômica associada à resistência a <i>Alternaria alternata</i> .....	73

# **REAÇÃO DE HÍBRIDOS DE CITROS À INOCULAÇÃO COM *Alternaria alternata* E ESTUDOS GENÉTICOS ASSOCIADOS**

**Autora: THAIS HELENA VILLA MICHIELIN**

**Orientadora: Profa. Dra. MARIÂNGELA CRISTOFANI-YALY**

**Co-orientadora: Profa. Dra. MARINÊS BASTIANEL**

## **RESUMO**

A mancha marrom de alternaria (MMA), causada pelo fungo *Alternaria alternata*, que produz uma toxina específica ao hospedeiro (Host Specific Toxin, HST) é uma doença de grande importância nos pomares de tangerinas em muitas regiões produtoras no mundo. A seleção de variedades resistentes à doença é de grande importância econômica. Neste trabalho foram avaliados diferentes híbridos de citros, obtidos por cruzamentos dirigidos e pré-selecionados, por apresentarem características agrônômicas que os tornam potenciais novas variedades de laranjas e tangerinas, tanto para a citricultura industrial, quanto de mesa. A avaliação destes novos genótipos é uma etapa imprescindível para a liberação de novas variedades. Setenta e nove híbridos juntamente com seus genitores foram submetidos à inoculação com um isolado de *A. alternaria* em folhas destacadas e em plantas. A severidade da doença foi mensurada através de escala descrita na literatura. A avaliação da segregação mendeliana nos híbridos de tangor Murcott e laranja Pera, avaliados em maior número, permitiu inferir acerca da herdabilidade genética da resistência a MMA e mapear a região genômica associada à resposta das plantas ao fungo em um mapa genético integrado dos genitores previamente obtido. Foram observadas diferentes respostas à inoculação controlada do fungo. Foram selecionados cinco híbridos tipo mexerica, seis híbridos tipo tangerina, três híbridos tipo tangor Murcott e 21 híbridos tipo laranja resistentes a MMA, ou que apresentaram poucos sintomas da doença. Os valores elevados de herdabilidade e variabilidade genotípica mensurados indicam que a seleção de plantas resistentes na progênie pode ser realizada com sucesso. Marcadores ligados à região associada à resposta à infecção com *A. alternata* foram localizados no grupo de ligação 3 do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera. Os genótipos selecionados se constituem em materiais potenciais para plantio comercial, visando ao controle da doença no campo.

## **CITRUS HYBRIDS REACTION TO INOCULATION WITH *A. alternata* AND GENETIC STUDIES ASSOCIATED**

**Author: THAIS HELENA VILLA MICHIELIN**

**Adviser: Profa. Dra. MARIÂNGELA CRISTOFANI-YALY**

**Co-adviser: Profa. Dra. MARINÊS BASTIANEL**

### **ABSTRACT**

*Alternaria* Brown Spot (ABS), caused by *Alternaria alternata* a fungus which produces a host specific toxin (HST), is a disease of huge importance in mandarin orchards in many producing regions in the world. The selection of varieties resistant to disease is of great economic importance. In this study different hybrids of citrus were evaluated. These hybrids were obtained by directed crosses and preselected by agronomic characteristics that make them potential new varieties of oranges and mandarins, for industry or fresh fruit. The evaluation of these new genotypes is an essential step for the release of new varieties. Seventy-nine hybrids and their parents were subjected to inoculation with an isolated from *A. alternaria* in detached leaves and plant assays. The severity of disease was measured by the scale described in the literature. The evaluation of Mendelian segregation in hybrids of Murcott tangor and Pera sweet orange, evaluated in greater numbers, allows inference about the genetics of resistance heritability of ABS and to map the genomic region associated with the fungus using an integrated genetic map previously obtained. Different responses were observed after the fungus inoculation. Five hybrids of Willowleaf mandarin like, six hybrids of mandarin like, three hybrids of Murcott like and 21 hybrids of orange like, resistant to ABS, or with few symptoms of the disease were selected. High values of heritability and genetic variability measured indicate that the selection of resistant plants in the progeny can be successful. A resistance gene and molecular markers associated with it were located in the same linkage group 3 of integrated map of Murcott and Pera. The selected genotypes constitute potential material for commercial planting and for the control of disease in the field.

## INTRODUÇÃO

A cultura dos citros é de extrema importância econômica no Brasil, visto que o país é maior produtor de suco de laranja (*Citrus sinensis* Osbeck), na modalidade FCOJ (*Frozen Concentrated Orange Juice*) e o maior exportador desse produto, representando 80% do total do comércio internacional. Com base no volume de exportação, via porto de Santos, o Brasil exportou no ano de 2015 mais de 1 milhão de toneladas de FCOJ, segundo o relatório divulgado no primeiro bimestre de 2016, houve um aumento de 44% em relação ao mesmo período do ano de 2015 (CITRUSBr, 2016).

O mundo produz 24 milhões de toneladas de tangerina, e o Brasil destaca-se como o quarto maior produtor mundial da fruta (FAOSTAT, 2016), atrás apenas da China, Espanha e Turquia. Produzidas para consumo *in natura*, as tangerinas ocupam uma área plantada de 52 mil hectares, com produção estimada em cerca de 1 milhão de toneladas, principalmente nas regiões Sudeste e Sul do país. Os estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Rio Grande do Sul juntos totalizaram o equivalente a 86% da produção nacional de tangerinas em 2012 (IBGE, 2016). Embora a maior parte da produção seja destinada ao consumo interno de frutas frescas, o Brasil exporta 2 mil toneladas, o que equivale a mais de 2 milhões de dólares (IBRAF, 2016).

O segmento de frutas cítricas *in natura* tem grande potencial de crescimento, sendo as variedades pertencentes ao grupo das tangerinas, ótimas opções de consumo como frutas frescas de mesa, pela facilidade de descasque (GOLDENBERG et al., 2014) e separação dos gomos. Novas variedades devem atender a um consumidor cada vez mais exigente em qualidade de fruto. O estado de São Paulo é o maior produtor nacional de tangerinas, concentrando em maior volume as variedades Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) e tangor Murcott (*C. sinensis* x *C. reticulata*), seguido das mexericas (*C. deliciosa* Tenore) e tangerina Cravo (*C. reticulata*) (CASER; AMARO, 2006; BASTIANEL et al., 2014a).

A cultura dos citros é afetada por várias doenças, dentre elas as de origem bacterianas, fúngicas e virais, as quais já fizeram com que muitos pomares fossem erradicados em diferentes períodos ao longo do tempo desde que a citricultura se tornou uma cultura comercial de grande importância e valor econômico. Alguns exemplos importantes de doenças que afetam os pomares brasileiros são a tristeza, causada pelo CTV (*Citrus tristeza virus*), a leprose, causada pelo *Citrus leprosis virus*, a Clorose Variegada dos citros, causada pela *Xyllela fastidiosa*, o cancro cítrico, causado pela *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, e o Huanglongbing (HLB, ex *Greening*), causado por *Candidatus Liberibacter* spp (BASSANEZI et al., 2014).

Além das doenças citadas a cima, destaca-se dentre as principais doenças dos pomares de tangerinas a mancha marrom de alternaria (MMA), causada pelo fungo *Alternaria alternata*, sendo descrita como a doença fúngica que acarreta maiores perdas econômicas neste grupo de citros na citricultura mundial (TIMMER et al., 2003; AZEVEDO et al., 2010; BASSIMBA et al., 2014).

O fungo causador da MMA produz uma toxina seletiva ao hospedeiro (HST), afetando as tangerinas, tangores e alguns de seus híbridos (PERES et al., 2003; PACHECO et al., 2012; AZEVEDO et al., 2015; YANG et al., 2016). Seus esporos são facilmente disseminados pelo vento, sobrevivendo em restos culturais e no solo.

É endêmico nas principais regiões produtoras, sendo necessário um elevado número de aplicações de fungicidas para o seu controle, desestimulando o plantio de variedades suscetíveis em novas plantas (STUART et al., 2009; AZEVEDO et al., 2010).

Os sintomas causados pela doença caracterizam-se por lesões necrosadas em ramos, frutos, tecidos verdes imaturos ou em fase de crescimento, depreciando-os para o consumo, sintomas estes causados pela toxina. Em condições ambientais

propícias numa temperatura de 20 a 27° C e 10 a 12 horas de molhamento, os sintomas surgem em média, 24 horas após a infecção, expandindo-se pela ação da toxina seletiva ACT produzida pelo fungo, podendo causar desfolhamento intenso durante os períodos de maior infecção, devido à necrose das folhas (TIMMER et al., 2000; 2003).

Variedades resistentes a MMA têm sido buscadas nos programas de melhoramento genético de citros. No Brasil, Pacheco et al. (2012) avaliaram a resposta à inoculação do fungo *in vivo* e *in vitro* de diversas variedades de tangerina e híbridos, dentre as quais o tangelo Nova, as tangerinas África do Sul, Ponkan e o tangor Murcott foram suscetíveis ao fungo. As variedades Cravo, Clementina de Nules e Ortanique, apresentavam poucos sintomas da doença, enquanto que Fremont e Thomas se mostraram resistentes. Diversos outros autores vêm avaliando a doença em variedades de tangerina (SOUZA et al., 2009; AZEVEDO et al., 2010) e mexericas (BASTIANEL et al., 2014a), com o intuito de buscar variedades resistentes para utilização na citricultura brasileira. Estes estudos foram baseados em variedades comerciais ou presentes em Bancos de Germoplasma.

Na Espanha, Cuenca et al. (2013) avaliaram a doença em populações de tangerinas triplóides, obtidas de cruzamentos dirigidos entre diferentes genitores e observaram híbridos triplóides suscetíveis ou resistentes de acordo com a progênie avaliada.

No Centro APTA Citros Sylvio Moreira/Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) de Cordeirópolis/SP, o programa de melhoramento de citros vem atuando na geração de novos materiais, também obtidos por cruzamentos dirigidos, e seleção de novas cultivares com potencial econômico. Progênies obtidas de diferentes cruzamentos foram avaliadas para diversas características agrônomicas (CRISTOFANI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007; BASTIANEL et al., 2009) e novos materiais foram selecionados por apresentarem boas características de fruto e potencial comercial para a citricultura brasileira, indústria ou de mesa. Entretanto, por serem oriundos de cruzamentos com genitores suscetíveis a mancha marrom de alternaria, precisam ser avaliados também para a resposta à doença antes de serem recomendados e liberados para plantios comerciais.

Os citros, em geral apresentam alta heterozigosidade (HERREIRO et al., 1996), provavelmente devido ao fato de que muitas das espécies conhecidas são de fato de origem híbrida (GMITTER et al., 2012), o que leva a uma grande segregação



genética e diferenças fenotípicas entre indivíduos obtidos em cruzamentos dirigidos, mesmo em progênies obtidas entre os mesmos genitores. Assim, em uma população de laranja doce x tangor recentemente caracterizada, por exemplo, foram observados frutos com características físicas (formato, espessura e aderência de casca) similares às laranjas, às tangerinas e aos tangores e outras características que os diferenciavam dos seus genitores (rugosidade da casca, sabor amargo etc.). Desta forma, a suscetibilidade à doença pode ter sido transferida de um dos genitores e variedades híbridas com características fenotípicas de laranjas podem apresentar suscetibilidade não desejável em novas variedades comerciais. Assim como, dentre os demais grupos de híbridos selecionados (tipo tangerina, mexerica e tangores) podem ter variedades com respostas distintas a MMA.

Assim, com o objetivo de selecionar novas variedades resistentes a MMA foi avaliada a resposta da doença em dezenas de híbridos obtidos entre diferentes genitores e pré-selecionados como variedade potenciais por outras características agrônômicas em estudos anteriores. Estes híbridos também foram avaliados quanto às características de qualidade de fruto, parâmetros genéticos e mapeamento de uma região genômica associada à mancha marrom de alternaria em um mapa genético previamente obtido.

## OBJETIVOS

- Avaliar 89 genótipos de citros, sendo 79 híbridos, obtidos de cruzamentos com distintos genitores e seus respectivos genitores, quanto à resposta à inoculação *in vitro* e *in vivo* do fungo causador da mancha marrom de alternaria;
- Selecionar novos híbridos classificados fenotipicamente como tangerina, laranja, tangor ou mexerica que apresentem resistência a *Alternaria alternata*, com potencial para ampliar o atual quadro varietal de citros para consumo *in natura* no estado de São Paulo;
- Avaliar características de qualidade dos frutos, quanto ao teor de sólidos solúveis (°BRIX), *ratio* e coloração da casca;
- Avaliar os parâmetros genéticos (herdabilidade, variância, coeficiente de variação) para a variável mensurada (porcentagem de área foliar com sintoma da mancha marrom de alternaria) na progênie do cruzamento TM x LP (tangor Murcott x laranja Pera) em três tempos de avaliação;
- Mapear a região genômica associada a *Alternaria alternata* através da avaliação dos híbridos TM x LP em um mapa genético integrado para esta população previamente obtido.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

### **1.Tangerinas**

As variedades que compõem o grupo das tangerinas tiveram origem no sudeste da Ásia e as espécies que deram origem às variedades conhecidas hoje vieram da China e da Índia (DONADIO et al., 2005). A partir do processo de distribuição de variedades ao longo do tempo, pode-se descrever as tangerinas como um grupo de variedades adaptadas a regiões desérticas, semitropicais e subtropicais (DONADIO et al., 2005).

As tangerinas e seus híbridos geralmente são plantas vigorosas, de tamanho médio a grande, crescimento ereto, com poucos espinhos, possuindo uma folhagem densa, com folhas médias, lanceoladas e de largura média, com ponta e com a nervura central proeminente; o pecíolo é típico e não-alado, o que difere facilmente das laranjas. Os frutos geralmente são de tamanho médio, forma oblata, base com pescoço pequeno ou sem pescoço, e ápice pouco deprimido. A casca é fina e firme, mas, geralmente, fácil de descascar, o que as valorizam para o consumo como fruta fresca. O fruto apresenta a superfície lisa, de cores mais intensas, variando de laranja a vermelho, com 9 a 13 gomos, facilmente separáveis e com eixo médio

aberto, sua polpa é de cor laranja, sucosa, às vezes aromática e com poucas sementes mono ou poliembriônicas e com cotilédones verdes (HODGSON, 1967).

Em regiões de clima subtropical, com invernos frios, o fruto desenvolve coloração amarelo avermelhada, tanto interna como externamente. A planta é mais resistente ao frio, mas o fruto não apresenta essa resistência. As flores são usualmente brancas, pequenas, isoladas ou em inflorescência de pedúnculos curtos (SWINGLE; REECE, 1967).

Os frutos apresentam diversidade quanto às características de coloração, aderência da casca, número de sementes por fruto (PIO et al., 2005; GOLDENBERG et. al., 2014), apesar da diversidade de variedades existentes no grupo das tangerinas, poucas são utilizadas comercialmente, devido às exigências do mercado consumidor.

As tangerinas constituem o segundo grupo de frutos mais importantes na citricultura mundial, com uma produção de 24 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2015) e ocupam a maior faixa de adaptação climática entre os citros cultivados, uma vez que são plantas igualmente tolerantes as temperaturas ambientes extremas. Entre as cultivares mais exploradas, destacam-se variedades do grupo das satsumas (*C. unshiu*), das mexericas (*C. deliciosa* Tenore), das reticulatas (*C. reticulata* Blanco), tais como a Ponkan, Dancy e Cravo, além de alguns híbridos interespecíficos, como o tangor Murcott (*C. reticulata* x *C. sinensis*) e o tangelo Lee [*C. reticulata* x (*C. paradisi* Macf. x *C. reticulata*)] (FIGUEIREDO, 1991; PIO et al., 2005), entre outros. Das variedades encontradas nos pomares brasileiros, a tangerina Ponkan e o tangor Murcott são as de maior expressão, seguidas de Cravo e seleções de mexericas (BASTIANEL et al., 2014a).

A tangerina Ponkan constitui uma das variedades mais cultivadas no mundo e, também, é a mais popular no Brasil (PIO et al., 2005; IBGE, 2016), sendo de maio a junho a principal época de maturação dos frutos. É muito produtiva, com frutos de casca solta e de coloração acentuada, bom sabor, bastante doce, o que os torna muito apreciados para consumo *in natura* (PIO et al., 2006). O tangor Murcott é a segunda variedade mais importante cultivada em São Paulo, com período produtivo de agosto a setembro (PIO et al., 2005; IBGE, 2016).

Os frutos de tangores são achatados, com casca fina e aderente, possuem em média 22 sementes por fruto e cor do suco alaranjado intenso, doce e excelente para o consumo *in natura* e no preparo de sucos. Os frutos de mexerica são

medianos, muito aromáticos, têm casca fina e lisa, sendo fáceis de descascar e possuindo paladar bastante agradável (FIGUEIREDO, 1991; PIO et al., 2005).

Embora o Brasil seja um dos maiores produtores de tangerinas no mundo, os dados do IBGE (2016) mostram uma redução na área colhida ao redor de 7 mil hectares, entre 2010 a 2014, e queda de produção no valor de mais de 150 mil toneladas aproximadamente, para o mesmo período. Uma das possíveis causas desta redução na área plantada pode estar relacionada ao surgimento da mancha marrom de alternaria no país.

## 2. Laranjas

A laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck) tem provável origem na Indochina e do sul da China, com possível extensão até a Indonésia, sendo uma das últimas espécies cítricas introduzidas na Europa (DONADIO et al., 2005). É a espécie predominante na maioria dos países citrícolas, sendo a mais produzida, a safra 2015/16 foi equivalente a 278,9 milhões de caixas de laranja de 40,8 kg, ocupando cerca de 1/3 dos plantios (CITRUSBr, 2016).

As folhas são alternadas, com pecíolo levemente alado. As flores são brancas e os frutos apresentam coloração variável, de amarelo claro a vermelho escuro, com casca fina e aderida (HODGSON, 1967). Os frutos apresentam altas taxas de poliembrionia (OLIVEIRA et al., 2004), característica que dificulta os programas de melhoramento genético, sendo necessária uma etapa adicional de identificação dos híbridos (MACHADO et al., 2011). São divididas em quatro grupos: comum, baixa acidez, *navel* ou com umbigo e as pigmentadas (HODGSON, 1967).

As laranjas sanguíneas e de polpa vermelha ainda são pouco exploradas no Brasil. As laranjas sanguíneas são caracterizadas pela coloração vermelha-intensa (violácea) da polpa e do suco, devido à presença de antocianinas. Estas laranjas apresentam maior interesse e valor comercial em países como a Itália e Índia, mas com um valor crescente no mercado brasileiro. Já as laranjas de polpa vermelha apresentam coloração vermelha na polpa dos frutos, devido à presença de elevados teores de carotenóides, em comparação com as laranjas amarelas (MACKINNEY, 1961; FIGUEIREDO, 1991; PIO et al., 2005).

As características das laranjas sem acidez e as laranjas-de-umbigo (conhecidas como *navels* ou Bahias) são essencialmente adequadas ao consumo de

mesa (PIO et al., 2005). As variedades do grupo das laranjas Bahias não apresentam sementes, principalmente, quando cultivadas em pomares isolados (DONADIO et al., 1995).

O número de variedades comerciais é muito pequeno, sendo para as indústrias de suco, as variedades Pera, Natal, Hamlin, Valência, Folha Murcha e Westin as principais variedades encontradas nos pomares brasileiros (POMPEU JUNIOR et al., 2004). Dentre estas, a laranja Pera é a variedade mais importante da citricultura brasileira, representando cerca de 30% das mudas plantadas. Os seus frutos são os mais preferidos para a fabricação de suco cítrico concentrado congelado para a exportação, além de excelente aceitação nos mercados internos e externos de fruta *in natura*. A cultivar Valência é em muitos países, a principal variedade comercial, promovendo diversas pesquisas, visando selecionar melhores materiais (PIO et al., 2005).

Para consumo *in natura* além das variedades que são utilizadas também para suco, as mais comuns são Lima, Piralima e Lima tardia (baixa acidez) e Bahia, Baianinha e Cabula (bahias).

### **3. Mancha marrom de alternaria**

#### **3.1. Características gerais da doença**

A mancha marrom de alternaria (MMA) é uma doença fúngica causada por *Alternaria alternata*, fungo que se reproduz sobre material vegetal afetado, por meio da formação de conídios (TIMMER, 2000; LLORENS et al., 2013). O fungo pertence ao gênero *Alternaria* um dos mais cosmopolitas já estudados, o qual causa mais de trinta doenças em diferentes culturas comerciais agrícolas, podendo ter vários hospedeiros (THOMMA, 2003), englobando tanto espécies saprofíticas como patogênicas (ROTEM, 1994).

A MMA afeta principalmente as tangerinas (*C. reticulata*), alguns tangores (*C. reticulata* x *C. sinensis*) e ocasionalmente pomelos (*C. paradisi*), sendo as laranjas doces resistentes à doença (TIMMER et al., 2003; STUART et al., 2009), existem também espécies que atuam como patógenos de pós-colheita e algumas espécies de *Alternaria* são capazes de causar danos apenas em plantas senescentes ou debilitadas (ROTEM, 1994; THOMMA, 2003; AGRIOS, 2005).

A doença descrita inicialmente na Austrália (KIELY, 1964) se disseminou por todo o mundo, estando presente em várias regiões da Europa (VICENT et al., 2000; BELLA et al., 2001; HUANG et al., 2015), África (SWART et al., 1996), Israel (SOLEIL, 1991) e, no continente Americano na Flórida (WHITESIDE, 1976), Brasil (SPÓSITO et al., 2003), Argentina (PERES et al., 2003), Peru (MARÍN et al., 2006), entre outros.

No Brasil foi constatada no Rio de Janeiro em 2001 (GÓES et al., 2001), afetando plantas de tangerina Dancy, sendo, posteriormente disseminada para outros estados (SPÓSITO et al., 2003; STUART, 2009). No Estado de São Paulo a MMA é considerada atualmente uma doença endêmica nas principais regiões produtoras de citros.

A doença afeta com severidade os pomares cultivados com as variedades de tangerina Ponkan e tangor Murcott, as principais variedades cultivadas no Brasil (AZEVEDO et al., 2010), causando prejuízo econômico devido ao grande número de pulverizações necessárias para realizar o controle da doença.

### 3.2. O Patógeno

Fungos do gênero *Alternaria*, são saprofíticos facultativos (WALTON, 1996; WEIKL et al., 2016) vivendo em material em decomposição e segundo WALTON (1996) são mais adaptados quando estão envolvidos com patogenicidade nas culturas em que estão colonizando. Os conídios são caracterizados pela coloração escura, presença de septos longitudinais e transversais (BARNETT; HUNTER, 1998), sendo facilmente detectados laboratorialmente com auxílio de microscopia.

São considerados fungos imperfeitos, pela ausência de um estágio sexual na maioria de suas espécies (THOMMA, 2003), são morfológicamente e geneticamente similares, entretanto apresentam diferenças patológicas (KUSABA; TSUGE, 1994). Por esse fato, linhagens de certas espécies, principalmente *A. alternata*, têm sido referidas como formas especiais ou patótipos, em função do seu hospedeiro (NISHIMURA; KOHMOTO, 1983; KOHMOTO et al., 1995). É caracterizado como sendo um fungo cosmopolita, sendo descritos até o momento doze diferentes patótipos hospedando diferentes culturas de interesse agrônomo (LIMA et al., 2016; NGUYEN et al., 2016).

Em citros, são conhecidas quatro doenças diferentes causadas por *Alternaria*, sendo (i) a mancha marrom das tangerinas, causada por *A. alternata* a qual afeta

seletivamente um grupo de variedades, (ii) a mancha foliar do limão Rugoso (*C. jambhiri* Lush) e do limão Cravo (*C. limonia* Osbeck) causada por um diferente patotipo de *A. alternata*, (iii) a mancha foliar do limão Galego (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.) causada pela espécie *A. limicola* Simmons & Palm. (SIMMONS, 1990) e (iv) a podridão negra dos frutos cítricos, causada por *A. alternata* (BLISS; FAWCETT, 1944; SIMMONS; 1990; TIMMER et al., 2003; PEEVER et al., 2004).

Diferenças também são observadas nos sintomas causados por fungos do gênero *Alternaria* nos citros, sendo que na mancha marrom das tangerinas, os mesmos se caracterizam por lesões necróticas nos tecidos de brotos e folhas jovens e frutos imaturos, provocando a queda prematura de folhas e frutos afetados. A mancha foliar do limão Rugoso e limão Cravo causa também necrose foliar e pequenas lesões nos frutos. Essas duas espécies de citros são usadas comumente como porta-enxertos, estando os danos limitados ao viveiro (TIMMER et al., 2003). A mancha foliar do limão Galego é detectada apenas em algumas regiões no México (PALM; CIVEROLO, 1994). Já a podridão negra dos frutos se caracteriza por uma podridão de coloração escura no fruto, quando se inicia a maturação, o que diferencia das demais doenças de pós-colheita, é que os danos são restritos às partes internas dos frutos (ISSHIKI et al., 2001; 2003; OHTANI et al., 2003).

O patógeno foi inicialmente identificado como *Alternaria citri*, devido à alta similaridade morfológica com o fungo causador da podridão pós-colheita (WHITESIDE, 1976). Posteriormente foi classificado como *A. alternata* (KOHMOTO et al., 1979) pela habilidade de infectar folhas e frutos jovens, além de produzir uma toxina específica ao hospedeiro (HSTs) e mais tarde designado por *A. alternata* f. sp. *citri* (SOLEIL, 1991). Peever et al. (2004), através de estudos filogenéticos moleculares, classificaram isolados de *Alternaria* associados a citros dentro de uma única espécie filogenética, *Alternaria alternata*.

O fungo causador da MMA reproduz-se sobre o material vegetal afetado, presente na planta ou caído no solo, por meio da formação de esporos assexuais (conídios). A liberação desses esporos está relacionada com a umidade do ambiente, devido à ocorrência de chuvas e mudanças bruscas na umidade relativa, sendo que, uma vez formados, são facilmente disseminados pelo vento (TIMMER et al., 2000; 2003). Os conídios germinam sobre o tecido afetado, sendo frutos, ramos e folhas novas. Uma toxina específica ao hospedeiro tangerina é liberada causando necrose rápida dos tecidos. O fungo é facilmente caracterizado com auxílio de

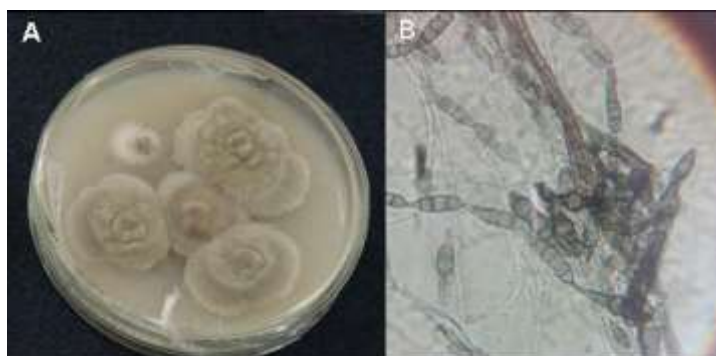


microscópio ótico. Na figura 1 é apresentada a morfologia de uma colônia de *A. alternata* em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Agar) e a visualização dos conídios típicos da espécie em microscopia.

Os conídios germinam infectando os tecidos foliares e frutos suscetíveis (TIMMER et al., 1998; REIS et al., 2007), sendo que a maior concentração de conídios no ar é registrada após os períodos de infecção (TIMMER et al., 1998; 2000). Estudos realizados na Flórida (EUA), indicam que a esporulação é maior entre 10 a 40 dias após ocorrer a infecção (REIS et al., 2007).

As condições ideais para infecção ocorrem com temperaturas em torno de 20 a 27°C e com cerca de 10 a 12 horas de molhamento foliar contínuo, aparecendo os sintomas após um a dois dias (TIMMER et al., 2000). O processo de colonização de *A. alternata* em tecidos vivos tem início com a penetração do fungo no tecido vegetal do hospedeiro.

Quando o patógeno atinge o interior do tecido da planta, começa a liberar a toxina cuja função é garantir a destruição das células ao redor do ponto de penetração, garantindo os nutrientes para sua sobrevivência. A toxina apresenta uma característica peculiar que é afetar somente variedades de tangerinas, é denominado HST - *host specific toxine* (toxina específica ao hospedeiro). Estudos sobre a toxina produzida pela *A. alternata* (toxina ACT), mostram que ela tem ação rápida e causa extravasamento celular (STUART et al., 2009).



**Figura 1.** Morfologia da colônia de *A. alternata* em meio de cultura BDA após (A) uma semana de crescimento e (B) Microscopia óptica de *A. alternata* mostrando conídios em cadeia típicos da espécie (Foto: T.H.V. Michielin).

### 3.3. A toxina

Nos fungos, as toxinas são normalmente produzidas durante o período de germinação dos conídios na planta hospedeira, afetando rapidamente a integridade da membrana plasmática e das células suscetíveis (KOHMOTO et al., 1993) e constituem um grupo diverso de compostos que incluem substâncias químicas e aminoácidos (NISHIMURA; KOHMOTO, 1993). Podem ser classificadas como não seletivas, ou seletivas ao hospedeiro (Host selective toxin - HST), como no caso da toxina produzida pela *A. alternata* em tangerinas, sendo tóxicas somente nas espécies ou plantas que servem de hospedeiras ao microrganismo, sendo essenciais para o estabelecimento do patógeno no hospedeiro e no estabelecimento da doença (PASCHOLATI, 1995).

A toxina atua rapidamente o que faz com que o período de incubação seja muito curto e as lesões possam ser vistas poucas horas depois de ter ocorrido a infecção. Existem também evidências indiretas que sugerem a presença de receptores da toxina nos genótipos de citros que são suscetíveis (TSUGE et al., 2012). Estudos recentes indicam que as espécies reativas ao oxigênio (ROS) produzidas pelas plantas hospedeiras são essenciais ao processo de patogenicidade (YANG; CHUNG, 2012; YU, 2016). A atuação das HSTs pode se dar em diferentes locais da célula vegetal, alterando a permeabilidade das membranas, tendo como consequência mudanças no equilíbrio iônico, perda de eletrólitos, inibição ou estimulação de enzimas específicas, aumento na respiração entre outros fatores (PASCHOLATI, 1995).

O patótipo tangerina de *A. alternata* produz a toxina denominada ACT (*Alternaria citri* toxin) (AKIMITSU et al., 2003). São relatadas duas formas desta toxina, uma denominada ACT-I, detectada durante a germinação dos conídios (KOHMOTO et al., 1993), e outra denominada ACTG (KONO et al., 1986). A estrutura da toxina ACT é muito relacionada às toxinas AK e AF, que são HSTs dos patótipos de *A. alternata* em Pera japonesa e morango, respectivamente (TANAKA et al., 1999; KOHMOTO et al., 1993). Assim como a toxina ACR do patótipo de limão Rugoso, a toxina ACT causa necrose dos vasos condutores e a rápida perda de eletrólitos com extravasamento celular, entretanto seu modo de ação ainda é controverso (KOHMOTO et al., 1993; AKIMITSU et al., 2003).

Fato interessante tem sido relatado que em isolados *A. alternata*, produtores de HSTs, todas as formas carregam pequenos cromossomos extras, também

denominados supernumerários ou dispensáveis, enquanto que os isolados não produtores não os possuem (AKAMATSU et al., 1999; 2003; THOMMA, 2003, STUART et al., 2009).

### **3.4. Os sintomas em tangerinas**

Os sintomas causados por *A. alternata* nas tangerinas caracterizam-se por lesões necróticas em folhas, ramos e frutos depreciando-os para o consumo, esses sintomas são causados pela toxina (STUART et al., 2009). Ocorrem em ramos, frutos, tecidos verdes imaturos ou em fase de crescimento, surgem em média, 24 horas após a infecção, expandindo-se pela ação da toxina seletiva ACT produzida pelo fungo, podendo causar desfolhamento intenso durante os períodos de maior infecção, em vista da necrose das folhas (TIMMER et al., 2003).

Em folhas jovens, os sintomas iniciais da doença se caracterizam por pequenas manchas de coloração marrom ou preta, posteriormente se estendem podendo abranger grande área da folha. O avanço das lesões seguindo as nervuras das folhas é um dos sintomas diferenciais da doença. As brotações novas, tanto vegetativas como da florada, apresentam um aspecto de requeima no caule, com morte dos ponteiros. Em ramos finos, ocorrem pequenas lesões corticosas, sem ou com halo clorótico (AKIMITSU et al., 2003). Na figura 2 são apresentados alguns sintomas característicos da MMA em tangelo Nova, altamente suscetível ao fungo.

O fungo afeta principalmente as brotações novas, que são responsáveis pela florada subsequente, e frutos jovens, ocasionando a queda prematura, e conseqüentemente pode levar a grandes perdas no volume de produção. Por estas características o controle da doença no campo demanda aplicações constantes de fungicidas durante o período vegetativo e produtivo das plantas, o que vem aumentando os custos de produção e deixando os produtores da fruta sem muitas perspectivas e muitas vezes levando-os a extinguirem seus pomares.



**Figura 2.** Sintomas característicos de mancha marrom de alternaria em (A) folha e (B) fruto de tangelo Nova (Foto: M. Bastianel).

Estudos realizados em condições controladas indicam que as infecções ocorrem principalmente entre as temperaturas de 17-32°C junto com a presença de umidade sob a planta por chuvas ou orvalho durante 3-36 horas. Devido à ação da toxina específica ACT, o período de incubação é muito pequeno e as lesões podem ser visualizadas após as 16-36 horas (CANILHOS et al., 1999; TIMMER et al., 2000).

Há dados de que as infecções do patógeno estão relacionadas com as frequências de chuvas, porém não necessariamente relacionados com a duração das mesmas (BHATIA et al., 2003).

### **3.5. A suscetibilidade e resistência a MMA em citros**

As variedades de tangerinas Dancy, Ponkan, tangor Murcott e tangelo Nova são descritas como altamente suscetíveis a MMA. Ausência de sintomas é relatada em variedades do grupo das clementinas, satsumas, limas, limões, laranja Azeda, laranja doce, e alguns híbridos, como Fremont e Thomas (TIMMER et al., 1997; SOUZA et al., 2009; STUART et al., 2009, AZEVEDO et al., 2010; PACHECO et al., 2012; CUENCA et al., 2013; BASTIANEL et al., 2014a).

O mecanismo genético relacionado com a resistência e a suscetibilidade de genótipos de citros à mancha marrom de alternaria ainda é pouco referenciado na literatura. Com base em mapeamento genético e estudos de QTL's (Quantitative Trait Loci) em uma população segregante de citros, Dalkilic et al. (2005) e Gulsen et

al. (2010) relataram que a suscetibilidade seria provavelmente, de herança simples e dominante. Recentemente, estudos conduzidos por Cuenca et al. (2013), com populações de triplóides, confirmam estes resultados e sugerem que o tangor Murcott seria heterozigoto para a MMA.

### 3.6. O Controle

A macha marrom de alternaria é uma doença difícil de ser controlada, por ser causada por um fungo de fácil disseminação e presente nas principais regiões citrícolas do Brasil, onde há condições bastante favoráveis para o seu desenvolvimento. Para um controle eficiente da MMA em variedades suscetíveis, é necessário adotar estratégias integradas de práticas agronômicas culturais e químicas, como a aplicação de fungicidas.

Dentre as medidas agronômicas de manejo que podem ser adotadas para o controle e para a diminuição de danos, podemos citar as práticas que melhoram a aeração do pomar, como podas de limpeza (MILANESI, 2013), e evitar o plantio de variedades suscetíveis em áreas úmidas ou de baixada, que possam acumular mais umidade e orientar as ruas de plantas no sentido de obedecer a direção do vento.

A prática da poda adequada permite uma melhor ventilação do pomar, e é muito indicada em locais com bastante foco de inóculo (MILANESI, 2013). O plantio de variedades resistentes à doença também é uma forma de controle, funcionando como meio de prevenção, pois atua de acordo com os princípios da erradicação, proteção e regulação, práticas essas que reduzem o inóculo inicial, além de alterarem o microclima do pomar (MARTELLI, 2011).

O controle químico através de fungicidas, é largamente utilizado em todas as regiões produtoras (BHATIA et al., 2003; VICENT et al., 2007; 2009). Existem vários fungicidas para o controle da MMA, destacando as estrobilurinas (SWART et al., 1998; TIMMER et al., 1998). O grupo dos ditiocarbamatos é muito utilizado em tangerinas Dancy e Minneola, em países como Cuba, África do Sul e Israel, os cúpricos, são os mais utilizados nos países produtores como Brasil, Estados Unidos, Israel, África do Sul e Austrália (MILES et al., 2005; BASSIMBA et al., 2014). O cobre vem sendo a base do programa de controle de *A. alternata* tanto na Flórida (EUA) como no Brasil, principalmente pelo baixo custo e por apresentar um controle aceitável da doença (COLTURATO et al., 2009), porém, o uso contínuo de cúpricos

pode causar problemas de fitotoxicidade e acúmulo de cobre no solo (TIMMER et al., 2003).

Os benzimidazóis não são eficazes no controle de MMA, podendo agravá-la se forem utilizados. A aplicação dos fungicidas deverá ser realizada durante o período crítico de suscetibilidade, principalmente nos estágios de início de brotações, florescimento e formação dos frutos (MINANEZI, 2013).

O controle deve ser preventivo e se basear num esquema integrado de manejo, utilizando várias ferramentas (BHATIA et al., 2003; PERES; TIMMER, 2006). O controle químico do patógeno requer várias aplicações de fungicidas chegando até 15 por ano (TIMMER et al., 2003), em condições favoráveis. O uso desses produtos tem aumentado os custos de produção da fruta e desestimulado o plantio de novas áreas.

#### **4 Melhoramento genético de citros**

As plantas de citros mais cultivadas pertencem ao gênero *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella*. Os métodos mais comuns no melhoramento dos citros são: a seleção de mutações naturais ou induzidas e hibridação. Uma das limitações do melhoramento de citros por métodos tradicionais é devida a fatores biológicos que inibem a reprodução e a seleção de novas variedades, tais como a heterozigotidade e depressão por endogamia, esterilidade de pólen e óvulo, incompatibilidade sexual, juvenilidade, apomixia e poliembrionia nucelar (MACHADO et al., 2011). Uma grande vantagem para o melhoramento genético é a facilidade com que ocorrem cruzamentos entre espécies de citros ou intergenéricos, este último representa uma oportunidade de combinar genomas de plantas distintas e introduzir características não encontradas no principal gênero *Citrus* (SMITH et al., 2013).

Em geral, os programas de melhoramento visam, além do aumento da produtividade e qualidade de fruto e suco, à obtenção de novas combinações copa e porta-enxerto resistentes aos fatores abióticos (frio, seca, salinidade dos solos, entre outras) e bióticos (pragas e doenças) (MACHADO et al., 2011; BASTIANEL et al., 2014b). A obtenção de genótipos portadores de resistência genética a patógenos em citros é uma alternativa diante ao combate aos problemas fitossanitários da cultura. Um exemplo bastante conhecido da nossa citricultura foi a seleção do porta-enxerto limão Cravo e utilização em substituição a laranja Azeda na década de 40, que permitiu a convivência com a tristeza dos citros (MOREIRA; MOREIRA, 1991).

Genótipos de citros resistentes a doenças como a mancha marrom de alternaria podem ser obtidos através do melhoramento genético. A presença de genótipos resistentes, disponíveis em Bancos de Germoplasma, torna possível o melhoramento clássico por cruzamentos dirigidos para a resistência à doença (BASTIANEL et al., 2014b). A possibilidade de seleção de híbridos resistentes é um método bastante promissor em um programa de melhoramento, visando estudos de resistência genética a essas e outras doenças e a obtenção de novas variedades comerciais de laranja e tangerinas.

Objetivando explorar as fontes de resistência às doenças existentes, realizaram-se cruzamentos interespecíficos e intergenéricos em plantas do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) no Centro APTA Citros Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo de Campinas/IAC. Esses cruzamentos fazem parte de um programa de melhoramento genético que visa à seleção de materiais resistentes às principais doenças dos citros para ampliar o número de cultivares da citricultura brasileira (CRISTOFANI et al., 2005).

## **5 Mapeamento genético em citros**

Várias técnicas biológicas moleculares têm sido empregadas com o objetivo de melhorar a eficiência dos programas de melhoramento convencional de citros. O avanço na geração de marcadores moleculares e nos programas de análise genética, permitiram nas últimas décadas a obtenção de mapas genéticos para um grande número de espécies de interesse comercial. O princípio básico que fundamenta as análises de mapeamento genético é a existência de desequilíbrio gamético de ligação decorrente da reduzida frequência de recombinação entre genes situados em regiões próximas entre si ao longo do cromossomo (VANOIJEN, 1992).

Uma importante aplicação destes mapas é a localização de genes que controlam características de importância econômica e, conseqüentemente, a seleção assistida por marcadores (TANKSLEY, 1993; RUIZ; ASINS, 2003), representando uma grande ferramenta no melhoramento genético vegetal, principalmente de espécies lenhosas perenes, assim como os citros, permitindo a seleção precoce de características. Muitas características de importância econômica, em sua maioria,

podem ser classificadas como quantitativas, isto é, são controladas por vários genes distribuídos no genoma, em regiões denominadas como QTL (*Quantitative trait loci*).

Algumas importantes características e patossistemas foram estudados com base na localização de QTL (*Quantitative trait loci*) em citros, como por exemplo, resistência a nematóide (LING et al., 2000), resistência à gomose de *Phytophthora* (SIVIERO, 2001), resistência ao *Citrus tristeza virus* (FANG et al., 1998; CRISTOFANI et al., 1999), resistência a *Xylella fastidiosa* (OLIVEIRA et al., 2004), resistência a *Citrus leprosis virus* (BASTIANEL et al., 2009), entre outros. GULSEN et al. (2010) avaliaram a segregação da MMA em uma população de 164 indivíduos obtidos entre Clementina (*C. reticulata*) x tangelo Orlando (*C. paradisi* x *C. reticulata*), observando uma segregação fenotípica de 1:1 para esta característica. Os autores encontraram um loco ligado a MMA no mapa de ligação de tangelo Orlando. Cuenca et al. (2013) analisaram locos de resistência à mancha marrom de alternaria, através do marcador SNP (*single nucleotide polymorphism*).

Nas últimas duas décadas, as sequências genômicas e mapas de cromossomos de várias espécies cultivadas tornaram-se disponíveis, permitindo melhorar a eficiência de mapeamento de QTLs e seleção genômica (GS). Os genomas de laranja doce (diplóide) e tangerina (haplóides) foram sequenciados (WU et al. 2014), e os seus projetos de sequências estão disponíveis para visualização a partir de bases de dados públicas (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>).

Mais recentemente, novas tecnologias de sequenciamento (NGS-next generation sequencing) têm se mostrado ferramentas poderosas na geração de marcadores de DNA e identificação de novos polimorfismos (ELLEGRÉN, 2014). A plataforma DArT\_seq<sup>TM</sup> combina o uso de método de redução de complexidade do genoma da técnica DArT (*Diversity Arrays Technology*) com as novas tecnologias de sequenciamento proporcionando milhares de marcadores dominantes e um conjunto de SNPs co-dominantes (JACCOUD et al., 2001; CRUZ et al., 2013). Estes marcadores foram utilizados para construção de mapas genéticos em maçã (SCHOUTEN et al., 2012), banana (HIPPOLYTE et al., 2010), morango (SÁNCHEZ-SEVILLA et al., 2015) e recentemente, mapa integrado em citros (CURTOLO et al., 2015).



## LITERATURA CITADA

- AGRIOS, Elsevier Academic Press. **Plant Pathology**. 5th ed., San Diego, USA. 922 p. 2005.
- AKAMATSU, H.M.; TAGA, M.; KODAMA, R.D.; JOHNSON, H. Molecular karyotypes for *Alternaria* plant pathogens known to produce host-specific toxins. **Current Genetics**, v.35, p. 647–656, 1999.
- AKIMITSU, K.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. **Molecular Plant Pathology**, Sheffield, v.4, p.435-436, 2003.
- AZEVEDO, F.A.; POLYDORO, D.A.; BASTIANEL, M.; KUPPER, K.C.; STUART, R.M.; COSTA, F.P.; PIO, R.M. Resposta de diferentes genótipos de tangerinas e seus híbridos à inoculação in vitro e in vivo de *Alternaria alternata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p.1-10, 2010.
- AZEVEDO, F.A.D.; MARTELLI, I.B.; POLYDORO, D.A.; PACHECO, C.D.A.; SCHINOR, E. H.; BASTIANEL, M. Positive relationship between citrus leaf miner and alternaria brown spot. **Ciência Rural**, v. 45, n.7, p.0-0, 2015.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. **American Phytopathological Society**. Fourth edition, 1998.
- BASSANEZI, R.B.; Ayres, A.J.; MASSARI, C.A.; BELASQUE JÚNIOR, J.; BARBOSA, J.C. Progresso e distribuição espacial das principais pragas dos citros. In: Daniel Junior de Andrade; Marcelo da Costa Ferreira; Nilza Maria Martinelli. (Org.). Aspectos da Fitossanidade em Citros. 1ed.Jaboticabal: **Cultura Acadêmica**, 2014, v.1, p. 31-50.

- BASSIMBA, D.D.M.; MIRA, J.L.; VICENT, A. Inoculum Sources, Infection Periods, and Effects of Environmental Factors on *Alternaria* Brown Spot of Mandarin in Mediterranean Climate Conditions. **Plant Disease**, v. 98, n. 3, p. 409-417, 2014.
- BASTIANEL, M. ; SIMONETTI, L.M. ; SCHINOR, E.H. ; GIORGI NETO, R.O.; De NEGRI, J.D.; GOMES, D.N.; AZEVEDO, F.A. Avaliação do banco de germoplasma de mexericas com relação às características físico-químicas e suscetibilidade à mancha marrom de alternária. **Bragantia**, v. 73, p. 23-31, 2014a.
- BASTIANEL, M.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.; NOVELLI, V.M.; MACHADO, M.A. CRISTOFANI, M. **Melhoramento genético de citros para a resistência a doenças**. In: Andrade D. J. de, Ferreira, M.C.; Martinelli, N.M. (Org.). Aspectos da Fitossanidade em Citros. 1ed.Jaboticabal: Cultura Acadêmica, 2014b, v., p. 181-220.
- BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALY, M.; OLIVEIRA, A.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; GARCIA, A.A.F.; RESENDE, M.D.V.; RODRIGUES, V.; MACHADO, M.A. Quantitative trait loci analysis of citrus leprosis resistance in an interspecific backcross family of (*Citrus reticulata* Blanco × *C. sinensis* L. Osbeck) × *C. sinensis* L. Osb. **Euphytica**, v.169, p.101-111, 2009.
- BELLA, P.; GUARINO, C.; LA ROSA, R.; CATARA, A. Severe infections of *Alternaria* spp on a mandarin hybrid. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v.83. p.231, 2001.
- BHATIA, A., ROBERTS, P.D., AND TIMMER, L.W. Evaluation of the Alter-Rater model for timing of fungicide applications for control of *Alternaria* brown spot of citrus. **Plant Disease**, v.87, p.1089-1093, 2003.
- BLISS, D.E; FAWCETT, H.S. The morphology and taxonomy of *Alternaria citri*. **Mycologia**, v.36, p.469-502, 1944.
- CANIHOS; PEEVER, T.L., TIMMER, L.W. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of *Minneola* tangelo leaves by *Alternaria* spp. **Plant Disease**, v.83, p.429-433, 1999.
- CASER, D.V.; AMARO, A.A. **Tangerina: tendências no cultivo no Estado de São Paulo**. Análises e indicadores do Agronegócio. v.1, 3p., 2006.
- CITRUS BR – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS EXPORTADORES DE SUCOS CÍTRICOS. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com>>. Acesso em abril de 2016.

- COLTURATO, A.B.; PAULOSI, T.; VENANCIO, W.S.; FURTADO, E.L. Eficiência e custo do controle químico da mancha de alternaria em tangor murcote. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 210-215, 2009.
- CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. Ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. **Euphytica**, v.109, p.25-32, 1999.
- CRISTOFANI, M.; NOVELLI, V.M.; PERIN, M.S.; OLIVEIRA, A.C.; OLIVEIRA, R.P.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A. Programa de melhoramento de citros via hibridação controlada no Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC no período de 1997 a 2005. **Laranja**, v.26, n1, p.121-134, 2005.
- CRUZ, V.M.V.; KILIAN, A.; DIERIG, D. Development of DArT marker platforms and genetic diversity assessment of the U.S. collection of the new oilseed crop lesquerella and related species. **PloS One** 8:e64062. doi: 10.1371/journal.pone.0064062, 2013.
- CUENCA, J.; ALEZA, P.; VICENT, A.; BRUNEL, D.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Genetically based location from triploid populations and gene ontology of a 3-3-Mb genome region linked to alternaria brown spot resistance in Citrus reveal clusters of resistance genes. **PLoS One**. 2013, v.8, n.10:e76755. doi: 10.1371/journal.pone.0076755. eCollection 2013.
- CURTOLO, M.; CRISTOFANI-YALY, M.; TAKITA, M.A.; GAZAFFI, R.; FIGUEIRA, A.V.O.; MACHADO, M.A. Linkage maps partially integrated of Murcott tangor and Pera sweet orange using DArT\_seq<sup>TM</sup> markers. 11th International Congress of Plant Molecular Biology, Foz do Iguaçu, Brasil, outubro, 2015
- DALKILIC, Z.; TIMMER, L.W.; GMITTER, F.G. Linkage of an Alternaria disease resistance gene in mandarin hybrids with RAPD fragments. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.130, n.2, p.191-195, 2005.
- DONADIO, L.C.; FIGUEIREDO, J.O.; PIO, R.M. **Variedades cítricas brasileiras**. Jaboticabal: FUNEP, 228p. 1995.
- DONADIO, L.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MOREIRA, C.S. **Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil**. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Org.). Citros. Campinas: Instituto Agrônomo/FUNDAG, p. 3-18.
- ELEGREN, H. Genome sequencing and population genomics in non-model organisms. **Trends in ecology & evolution**, 29:51-63, 2014

- FANG, D.Q.; FEDERICI, C.T.; ROOSE, M.L. A high-resolution map of citrus tristeza virus resistance gene region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Genetics**, v.150, p.883-889, 1998.
- FAOSTAT. Top production: Tangerines, mandarins, clementines, satsumas 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em março de 2016.
- FIGUEIREDO, J.O. Variedades-copa de valor comercial. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JR., J.; AMARO, A.A. (eds.). **Citricultura Brasileira**. Campinas, Fundação Cargill, P. 228-64.1991.
- GMITTER, F.G.; CHEN, C.; MACHADO, M.A.; DE SOUZA, A.A.; OLLITRAULT, P.; FROEHLICHER, Y.; SHIMIZU, T. Citrus genomics. **Tree Genetics & Genomes**, v.8, p.611–626, 2012.
- GOLDENBERG, L., YANIV, Y.; KAPLUNOV, T.; DORON-FAIGENBOIM, A.; PORAT, R.; CARMI, N. Genetic diversity among mandarins in fruit-quality traits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.62, p.4938–4946, 2014.
- GULSEN, O.; UZUN, A.; CANAN, I.; SEDAY, U.; CANIHOS, E. A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers. **Euphytica**, v. 173, n. 2, p. 265-277, 2010.
- HERRERO, R.; ASINS, M.J.; CARBONELL, E.A.; NAVARRO, L. Genetic diversity in the Orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p. 599-509, 1996.
- HIPPOLYTE, I.; BAKRY, F.; SEGUIN, M.; GARDES, L.; RIVALLAN, R.; RISTERUCCI, A.M.; JENNY, C.; PERRIER, X.; CARREEL, F.; ARGOUT, X.; PIFFANELLI, P.; KHAN, I.; MILLER, R.N.; PAPPAS, G.J.; MBEGUIE-A-MBEGUIE, D.; MATSUMOTO, T.; DE BERNARDINIS, V.; HUTTNER, E.; KILIAN, A.; BAURENS, F.C.; D'HONT, A.; COTE, F.; COURTOIS, B.; GLASZMANN, J.C. A saturated SSR/DArT linkage map of *Musa acuminata* addressing genome rearrangements among bananas. **BMC Plant Biology**, v.10, p.65, 2010.
- HODGSON, R.W. **Horticultural varieties of citrus**. In: Walter, R.; Leon, D.B.; Herbert, J.W. (Eds). *The Citrus Industry History, World distribution, Botany, Varieties*. Riverside, p. 431-591, 1967.
- HUANG, F.; FU, Y.; NIE, D.; STEWART, J. E.; PEEVER T. L.; LI, H. Identification of a novel phylogenetic lineage of *Alternaria alternata* causing citrus brown spot in China. **Fungal biology**, v. 119, n. 5, p. 320-330, 2015.

- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agrícola Municipal. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam>>. Acesso em março de 2016.
- IBRAF – INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br>>. Acesso em março de 2016.
- ISSHIKI, A.; AKIMITSU, K.; YAMAMOTO, M.; YAMAMOTO, H. Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, p.49-757, 2001.
- JACCOUD, D.; PENG, K.; FEINSTEIN, D.; KILLIAN, A. Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.4, e25, 2001.
- KIELY, T.B. Brown spot of Emperor mandarin. **Agricultural Gazette**, February, p.854-856, 1964.
- KOHMOTO, K.; AKIMITSU, K.; OTANI, H. Correlation of resistance and susceptibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxins. **Phytopathology**, v.81, p.719-722, 1991.
- KOHMOTO, K.; ITO, H.Y.; SHIMOMURA, N.; KONDOH, Y.; OTANI, H.; KODAMA, M.; NISHIMURA, S.; NAKATSUKA, S. Isolation and biological activities of two host-specific toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, v.83, p.495-502, 1993.
- KOHMOTO, K.; OTANI, H.; TUSGE, T. *Alternaria alternata* pathogens. Pp.3-22. In: Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases. V.II: Eukaryotes. KOHMOTO, K.; SINGH, U.S.; SINGH, R.P., 1995, Pergamon, Oxford, 1995.
- KOHMOTO, K.; SCHEFFER, R.P.; WHITESIDE, J.O. Host-selective toxins from *Alternaria citri*. **Phytopathology**, v.69, p.667-671, 1979.
- KONO, Y.; GARDNER, J. M.; TAKEUCHI, S. Structure of the host-selective toxins produced by a pathotype of *Alternaria citri* causing brown spot disease of mandarins. **Agri. Biol. Chem.**, 50: 801-804. 1986.
- KUSABA, M.; TSUGE, T. Nuclear ribosomal DNA variation and pathogenic specialization in *Alternaria* fungi known to produce host specific toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.3055-3062, 1994.

- LIMA, C.B. Plant extracts and essential oils on the control of *Alternaria alternata*, *Alternaria dauci* and on the germination and emergence of carrot seeds (*Daucus carota* L.). **Ciencia Rural**. Santa Maria, v.46. n. 5.p.764-770, 2016.
- LING, P.; DUNCAN, L.W.; DENG, Z.; DUNN, D.; HU, X.; HUANG, S.; GMITTER, F.G. Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.00, p.1010–1017, 2000.
- LLORENS, E.; FERNÁNDEZ-CRESPO, E.; VICEDO, B.; LAPEÑA, L.; GARCÍA-AUGUSTÍN, P. Enhancement of the citrus immune system provides effective resistance against *Alternaria* brown spot disease. **Journal of Plant Physiology**, v.170, p. 146-154, 2013.
- MACHADO, M.A.; CRISTOFANI-YALY, M.; BASTIANEL, M. Breeding, genetic and genomic of citrus for disease resistance. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.158-178, 2011.
- MACKINNEY, G. Coloring matters. In: SINCLAIR, W.B. (Ed.). *The orange: Its Biochemistry and Physiology*, The University of California, Riverside, p. 302-333, 1961.
- MARÍN, J.E.; FERNÁNDEZ, H.S.; PERES, N.A.; ANDREW, M.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. First report of *Alternaria* brown spot of citrus caused by *Alternaria alternata* in Peru. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 5, p. 686, 2006.
- MARTELLI, I.B. Manejo de mancha marrom de alternaria em citros: poda de limpeza e correlação com lagarta minadora. Campinas – SP, 2011. 41fls. Dissertação (Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical). Instituto Agronômico de Campinas, IAC.
- MILANEZE, T.F. Poda e calda sulfocálcica para o controle da mancha marrom de alternária em tangor Murcott. Campinas – SP, 2013. 41fls. Dissertação (Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical). Instituto Agronômico de Campinas, IAC.
- MILES, A.K., WILLINGHAM, S.L., AND COOKE, A.W. Field evaluation of a plant activator, captan, chlorothalonil, copper hydroxide, iprodione, mancozeb and strobilurins for the control of citrus brown spot of mandarin. **Australasian Plant Pathology**, v.34, p.63-71. 2005.
- MOREIRA, C.S.; MOREIRA, S. História da citricultura no Brasil. In: RODRIGUEZ, O. et al. **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, v.1, p.1-18. 1991.

- NGUYEN, H.D.T.; LEWIS, C.T.; LÉVESQUE, C.A. Draft sequence of *Alternaria alternata* ATCC 34957. **Genome Announc**, v.4, n.1:e01554-15. doi:10.1128/genomeA.01554-15.2016.
- NISHIMURA, S.; KOHMOTO, K. Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. **Annual Review of Phytopathology**, v.2, p.87-116, 1983.
- NISHIMURA, S.; KOHMOTO, K. Isolation and Biological Activities of two Host-Specific Toxins from the Tagerine Patotype *Alternaria alternata*. **Physiology and Biochemistry**, v.83.n.5, 1993.
- OHTANI, K.; ISSHIKI, A.; KATOH, H.; YAMAMOTO, H.; AKIMITSU, K. Involvement of carbon catabolite repression on regulation of endopolygalacturonase gene expression in citrus fruits. **Journal of General Plant Pathology**, v.69, p.120-125. 2003.
- OLIVEIRA, A.C.; BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALY, M.; AMARAL, A.M.; MACHADO, M. A. Development of genetic map of citrus varieties Murcott tangor and pera sweet orange by using fluorescent AFLP markers. **Journal of Applied Genetics**, v.48, p.219-231, 2007.
- OLIVEIRA, A.C.; BASTIANEL, M.; MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C.; GOLDMAN, G.H.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Mapeamento genético para resistência à *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, Cordeirópolis, v.25, n.2, p.427-438, 2004.
- PACHECO, C.A.; MARTELLI, I.B.; POLYDORO, D.A.; SCHINOR, E.H.; PIO, R.M.; KUPPER, K.C., AZEVEDO, F.A. Resistance and susceptibility of mandarins and their hybrids to *Alternaria alternata*. **Scientia Agricola**, v.69, n.6, p.386-392, 2012.
- PALM, M.E.; CIVEROLO, E.L. Isolation, pathogenicity, and partial host range of *Alternaria limicola*, causal agent of “mancha foliar de los citricos” in Mexico. **Plant Disease**, v.78, p.879-883, 1994.
- PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: fitotoxinas e hormônios, p. 365-392. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (eds). Manual de Fitopatologia, v.1, 3. ed., São Paulo, Agronômica Ceres, 919p.1995.
- PEEVER, T.L., SU, G., CARPENTER-BOGGS, L.; TIMMER, L.W. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. **Mycologia**, v.96, p.119-134, 2004.

- PEEVER, T.L.; CANILHOS, Y.; OLSEN, L.; IBÁÑEZ, A.; LIU, Y.C.; TIMMER, L.W. Population genetic structure and host specificity of *Alternaria spp* causing brown spot of Minneola tangelo and rough lemon in Florida. **Phytopathology**, v.89, p.851-860, 1999.
- PERES, N.A.; TIMMER, L.W. Evaluation of the Alter-Rater model for spray timing for control of *Alternaria* brown spot on Murcott tangor in Brazil. **Crop Protection**, v.25, p.454-460, 2006.
- PERES, N.A.R.; AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Outbreaks of *Alternaria* brown spot of citrus in Brazil and Argentina. **Plant Disease**, v.87, p.750, 2003.
- PIO, R.M.; AZEVEDO, F.A.; DE NEGRI, J.D.; FIGUEIREDO, J.O.; CASTRO, J.L. Características da variedade Fremont quando comparadas com as das tangerinas 'Ponkan' e 'Clementina Nules'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, 2006.
- PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S.A.B. Variedades copas In: MATTOS JR, D. de; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JR, J. (Eds). Citros. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005. Cap.3, p.37-60.
- POMPEU JÚNIOR J, SALVA R, BLUMER S (2004). Copas e porta-enxertos nos viveiros de mudas cítricas do Estado de SP. **Laranja**, Cordeirópolis, v.25, n.2, p.413-426.
- REIS, R.F.; ALMEIDA, T.F.; STUCHI, E.S.; GOES, A. Susceptibility of citrus species to *Alternaria alternata*, the causal agent of the *Alternaria* brown spot. **Scientia Horticulturae**, Wageningen, v.113, p.336-342, 2007.
- ROTEM, J. The genus *Alternaria*. Biology, epidemiology, and pathogenicity. APS Press, St. Paul, MN, USA, 326 p. 1994. RUIZ, C.; ASÍNS, M.J. Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.826-836, 2003.
- RUIZ, C.; ASINS, M.J. Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.826–836, 2003
- SÁNCHEZ-SEVILLA, J.F.; HORVATH, A.; BOTELLA, M.A.; GASTON, A.; FOLTA, K.; KILIAN, A.; et al. Diversity Arrays Technology (DArT) Marker Platforms for Diversity Analysis and Linkage Mapping in a Complex Crop, the Octoploid Cultivated Strawberry (*Fragaria × ananassa*). **PLoS ONE** 10(12): e0144960.doi:10.1371/journal.pone.0144960, 2015.



- SCHOUTEN, H.J.; WEG, W.E.; CARLING, J.; KHAN, S.A.; MCKAY, S.J.; KAAUWEN, M.P.W.; et al. Diversity arrays technology (DART) markers in apple for genetic linkage maps. **Molecular Breeding**. 2012; 29: 645–660.
- SIMMONS, E.G. *Alternaria* themes and variations (27-53). *Alternaria* and other phaeodictyoconidial hyphomycete taxa on rutaceae. **Mycotaxon**, v.37, p.79-119, 1990.
- SIVIERO, A. Mapeamento de QTLs ligados a resistência a gomose de *Phytophthora* dos citros. Botucatu, UNESP, 2001. 117fls.Tese (Doutorado em Agronomia). Unesp.
- SMITH, M.W; GULTZOW, D.L.; NEWMAN, T.K. First fruiting intergeneric hybrids between Citrus and Citropsis. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v.138, n.1, p.57–63, 2013.
- SOLEIL, Z. *Alternaria* brown spot on Minneola tangelos in Israel. **Plant Pathology**, v.40, p.145-147, 1991.
- SOLEIL, Z.; KIMCHI, M. Susceptibility and resistance of citrus genotypes to *Alternaria alternata* pv. *citri*. **Journal Phytopathology**, v.145, p.389-391, 1997.
- SOUZA, M.C.; STUCHI, E.S.; GOES, A. Evaluation of tangerine hybrid resistance to *Alternaria alternata*. **Scientia Horticulturae**, v.123, n.1, p.1-138, 2009.
- SPÓSITO, M.B.; FEICHTENBERGER, E.; PIO, R.M.; CASTRO, J.L.; RENAUD, M. S.A. Ocorrência de mancha marrom de *Alternaria* em diferentes genótipos de citros nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 231, 2003.
- STUART, R.M.; BASTIANEL, M.; AZEVEDO, F.A.; MACHADO, M.A. *Alternaria* Brown Spot. **Laranja**, v.30, n.1-2, p.29-44, 2009.
- SWART, S.H., WINGFIELD, M.J., SWART, W.J., AND SCHUTTE, G.C. Chemical control of *Alternaria* brown spot on Minneola tangelo in South Africa. **Annals of Applied Biology**, v.133, p.17-30, 1998.
- SWART, S.H.; WINGFIELD, M.J.; SWART, W.J.; SCHUTTE, G.C. Brown spot of Minneola tangelo and efficacy of fungicidal sprays programmes for disease control in South Africa. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, South Africa, v.1, p.379-384, 1996.
- SWINGLE, W. T.; REECE, P. C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, v.1, p.190-430. 1967.

- SWINGLE, W.T.; REECE, R.C. The botany of Citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; BATCHELLOR, L. D.; WEBER, H. J. (Ed.). The citrus industry. Berkeley: University of California, p. 190-430, 1967.
- TANAKA, A.; SHIOTANI, H.; YAMAMOTO, M.; TSUGE, T. Insertional mutagenesis and cloning of the genes required for biosynthesis of the host-specific AK-toxin in the pear pathotype of *Alternaria alternata*. **Molecular Plant Microbe**, v.12, p. 691-702, 1999.
- TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. *Annu. Rev. Genet.*, v.27, p.205-233, 1993.
- THOMMA, B.P.H.J. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. **Molecular plant pathology**, v.4, n. 4, p. 225-236, 2003.
- TIMMER, L.W.; PEEVER, T.L. *Alternaria* Brown Spot found on Sumburst and grapefruit. **Citrus Industry**, v.78, p.46, 1997.
- TIMMER, L.W.; PEEVER, T.L.; SOLEIL, Z.; AZUYA, K.; KIMITSU, A. *Alternaria* diseases of citrus-novel pathosystems. **Phytopathologia Mediterranea**, v.42, p.99-112, 2003.
- TIMMER, L.W.; SOLEIL, Z.; OROZCO-SANTOS, M. *Alternaria* Brown Spot of mandarines. In: TIMMER, L.H.; GARNSEY, S.M. GRAHAM, J.H. (Eds). **Compendium of Citrus Diseases** 2.ed. Minnesota: APS Press ST Paul, 2000. v.1, p.19-2000.
- TIMMER, L.W.; SOLEIL, Z.; GOTTWALD, T.R.; IBAÑEZ, A.M.; H.M.; ZITKO, S.E. Environmental factors affecting production, release, and field production of conidia of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of citrus. **Phytopathology**, v.88, p.1218 -1223, 1998.
- TSUGE, T.; HARIMOTO, Y.; AKIMITSU, K.; OHTANI, K.; KODAMA, M.; AKAGI, Y.; EGUSA, M.; YAMAMOTO, M.; OTANI, H. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. **FEMS Microbiologia**, Rev 37, p. 44-66, 2012.
- VAN OOIJEN, J.W. Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. **Theoretical and Applied Genetics**, v.84, p.803-811, 1992.
- VICENT, A.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Protectant activity of reduced concentration copper sprays against *Alternaria* brown spot on 'Fortune' mandarin fruit in Spain. **Crop Protection**, v.28; p.1-6, 2009.

- VICENT, A.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Rain-fastness and persistence of fungicides for control of *Alternaria* brown spot of citrus. **Plant Disease**, 91:393-399. 2007.
- VICENT, A.; ARMENGOL, J.; SALLES, R.; ALFARO-LASSALA, F.; GARCIA-JIMÉNEZ, J. First report of *Alternaria* Brown Spot of citrus in Spain. **Plant Disease**, St Paul, v.84, p.1044, 2000.
- WALTON, J.D. Host-selective toxins: agents of compatibility. **Plant Cell**, v.8, p.1723-1733, 1996.
- WEBER C.A.; MOORE, G.A.; DENG, Z.; GMITTER, F.G. Mapping freeze tolerance quantitative trait loci in a *Citrus grandis* × *Poncirus trifoliata* F1 pseudo-testcross using molecular markers. **Journal of American Society of Horticulture Science**, v.128, p.508–514, 2003.
- WEIKL, F.; GHIRARDO, A.; SCHNITZLER, J.P.; PRITSCH, K.; Sesquiterpene emissions from *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*: Effects of age, nutrient, availability, and co-cultivation. **Scientific Reports**, 2016.
- WHITESIDE, J.O. A newly recorded *Alternaria* induced Brown Spot disease on Dancy tangerines in Florida. **Plant Disease Reporter**, v.60, p.326-329, 1976.
- WU, G.A.; PROCHNIK, S.; JENKINS, J.; SALSE, J.; HELLSTEN, U.; MURAT, F.; PERRIER, X.; RUIZ, M.; SCALABRIN, S.; TEROL, J.; TAKITA, M.A.; LABADIE, K.; et al. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. **Nature Biotechnology**, v.32, n.7, p.656-562, 2014.
- YANG SL, CHUNG KR. The NADPH oxidase-mediated production of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and resistance to oxidative stress in the necrotrophic pathogen *Alternaria alternata* of citrus. **Molecular Plant Pathology**, v.13, n.8, p. 900-914, 2012.
- YANG, S.L.; YU, P-L.; CHUNG, K-R. The glutathione peroxidase-mediated reactive oxygen species resistance, fungicide sensitivity and cell wall construction in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*. **Environmental microbiology**, v.18, n.3, p.923-935, 2016.

## **CAPÍTULO 1. Reação de híbridos de citros à inoculação com *Alternaria alternata***

### **1 Resumo**

A mancha marrom de alternaria (MMA), causada pelo fungo *Alternaria alternata*, que produz uma toxina específica ao hospedeiro (*Host Specific Toxin* – HST) é uma doença de grande importância nos pomares de tangerinas em muitas regiões produtoras no mundo. A doença afeta algumas tangerinas, pomelos, e alguns híbridos interespecíficos de tangerina, sendo que no Brasil, as principais variedades plantadas, a tangerina Ponkan e o tangor Murcott, são altamente suscetíveis ao fungo, sendo necessárias várias aplicações de fungicidas para o seu controle em condições ideais ao desenvolvimento da doença. O fungo, que também é saprofítico alternativo, se reproduz nos pomares e seus esporos são facilmente disseminados pelo vento. A seleção de variedades resistentes à doença é de grande importância econômica, pois além de diminuir os custos de produção aumentados sobremaneira com a utilização do controle químico, contribui para a diminuição de inóculo no campo. Neste trabalho, foram avaliados diferentes híbridos de citros, obtidos por cruzamentos dirigidos e selecionados por apresentarem características agronômicas que os tornam potenciais novas variedades de laranjas e tangerinas, tanto para a citricultura industrial, quanto de fruta *in natura*. Por serem oriundos de cruzamentos onde um dos genitores é suscetível à doença, a avaliação destes novos genótipos quanto à resposta à MMA é uma etapa imprescindível para a liberação de novas variedades. Foram observadas, entre os 79 híbridos avaliados, diferentes respostas à inoculação controlada do fungo, em folhas destacadas e em plantas jovens, sendo que cinco híbridos tipo mexerica, seis híbridos tipo tangerina, três híbridos tipo tangor Murcott e 21 híbridos tipo laranja foram resistentes ou apresentaram poucos sintomas da doença, se constituindo em materiais potenciais para plantio comercial, visando ao controle da doença no campo.

## 2 Introdução

A citricultura é uma importante atividade econômica no Brasil, e uma das principais atividades agrícolas, notadamente no estado de São Paulo, principal estado produtor. O principal grupo de variedades que compõe os pomares brasileiros é a laranja doce (IBGE, 2016), a maior parte é destinada ao processamento de suco, o que confere ao Brasil o status de principal produtor e exportador mundial de suco concentrado congelado de laranja (FAOSTAT, 2016).

Embora produzidas basicamente para consumo *in natura*, as tangerinas se destacam como o terceiro grupo em importância nos pomares (IBGE, 2016), colocando o Brasil em 4º lugar no *ranking* mundial de produção, com uma produção ao redor de 1 milhão toneladas, muito abaixo da produção mundial da fruta que soma ao redor de 24 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2016). A produção nacional de tangerinas está distribuída em 49,8 mil hectares localizados principalmente nas regiões Sudeste e Sul do país (IBGE, 2016).

Poucas variedades compõem a citricultura brasileira tanto para a indústria quanto para o mercado de frutas frescas, o que torna a citricultura vulnerável aos problemas fitossanitários. Várias doenças são conhecidas por causarem grandes danos à citricultura mundial e comprometerem a produção, dentre as quais destacam-se a clorose variegada dos citros, o cancro cítrico e o Huanglongbing, como doenças de origem bacteriana, a tristeza e a leprose, como doenças de origem viral, a pinta preta e a mancha marrom de alternaria como doenças causadas por fungo, entre outras.

A mancha marrom de alternaria (MMA) é causada pelo fungo *Alternaria alternata* (TIMMER et al., 2000; 2003); que produz uma toxina seletiva ao hospedeiro (HST), cuja suscetibilidade está restrita às tangerinas, pomelos, tangores e alguns de seus híbridos (TIMMER et al., 1997; PERES et al., 2003; PACHECO et al., 2012; AZEVEDO et al., 2015; YANG et al., 2016). Os sintomas causados pela toxina caracterizam-se por lesões necrosadas em ramos, frutos, tecidos verdes imaturos ou em fase de crescimento, depreciando-os para o consumo, podendo causar desfolhamento intenso durante os períodos de maior infecção, em vista da necrose das folhas e queda de frutos (TIMMER et al., 2000; 2003; AZEVEDO et al., 2010; STUART et al., 2009).

A doença está distribuída em várias regiões da Europa (VICENT et al., 2000; BELLA et al., 2001; HUANG et al., 2015), África (SWART et al., 1996), Israel (SOLEIL, 1991), Brasil (SPÓSITO et al., 2003), Argentina (PERES et al., 2003), entre outros. No Brasil, a doença está nas principais regiões produtoras, sendo necessário um elevado número de aplicações de fungicidas para o seu controle, desestimulando o plantio de variedades suscetíveis em novas áreas (AZEVEDO et al., 2010; STUART et al., 2009), o que faz com que a seleção e plantio de novas variedades resistentes sejam de grande importância e interesse para o desenvolvimento da citricultura comercial.

Centenas de híbridos foram obtidos por cruzamentos dirigidos entre diferentes genitores no Programa de Melhoramento de Citros do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/Instituto Agrônomo (Cordeirópolis, SP). Progênes obtidas de diferentes cruzamentos foram avaliadas para diferentes características agrônômicas (CRISTOFANI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007; BASTIANEL et al., 2009) e novos materiais foram selecionados por apresentarem boas características de fruto e potencial comercial, tanto para indústria de suco, como para o mercado de frutas frescas.

Estes híbridos foram previamente selecionados nas diferentes progênes estabelecidas em diversos locais de plantio no estado de São Paulo, por apresentarem características fenotípicas desejáveis em variedades comerciais, tais como: bom aspecto da planta, boa produção e boas características gerais de fruto cor da casca, a cor da polpa e do suco, o sabor e a facilidade de descascamento, entre outras. Com base nestas avaliações os híbridos foram classificados como tipo laranja, pela forma de fruto, casca lisa e aderida; tipo tangerina, pela facilidade de descasque, casca solta e gomos facilmente separáveis; tipo mexerica, pela presença de casca fina, solta e aroma característico do grupo, e tipo Murcott, pela semelhança a este tangor, como formato achatado e casca fina e aderida.

Entretanto, por serem oriundos de cruzamentos com pelo menos um dos genitores suscetível à MMA, o conhecimento sobre a resposta a esta doença é uma etapa importante na seleção de novas variedades. Assim, foram avaliados 89 genótipos de citros, sendo 79 híbridos e seus respectivos genitores, quanto à resposta à inoculação do fungo causador da MMA, em folhas destacadas e em plantas jovens com o objetivo de selecionar variedades resistentes à doença com potencial para ampliar o atual quadro varietal de citros.

### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Material vegetal

Foram avaliados 89 genótipos de citros (Tabela 1), incluindo 79 híbridos, sete genitores e três testemunhas, sendo estas as tangerinas Fremont (*Citrus reticulata* Blanco x *C. clementina* Hort. ex Tanaka), Clementina de Nules (*C. clementina*), ambas resistentes a mancha marrom de alternaria (MMA) e a tangerina Dancy (*C. reticulata* Blanco), suscetível a MMA, conforme descrito por AZEVEDO et al. (2010).

Os híbridos avaliados foram pré-selecionados em função de características agrônômicas em ensaios de validação em campo, classificados por tipo/grupo de citros (laranja, tangerina, mexerica e Murcott) com base nas suas características de frutos e incluíam nove híbridos de tangerina Cravo (*C. reticulata* Blanco) x laranja Pera (*C. sinensis* Osbeck), dois híbridos de tangelo Orlando (*C. reticulata* Blanco x *Citrus paradisi* Macf.) x laranja Pera, dois híbridos de tangor Murcott (*C. reticulata* x *C. sinensis*) x laranja Valência (*C. sinensis*), 52 híbridos de tangor Murcott x laranja Pera, oito híbridos de tangor Murcott x tangerina Ponkan (*C. reticulata*), cinco híbridos de Mexerica do Rio (*C. deliciosa* Tenore) x laranja Pera e um híbrido de tangerina Cravo (*C. reticulata*) x laranja Valência (*C. sinensis*). Dentre os híbridos avaliados, incluíam 45 classificados como laranja, 18 como tangerinas, cinco como mexericas e 11 como tangor tipo Murcott (Tabela 1).

Estes materiais estão presentes na coleção de novos híbridos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, no município de Cordeirópolis/SP, todos mantidos em vasos de 20 litros com substrato apropriado em estufa telada (Figura 1) e em experimentos de validação regional a campo no estado de SP. As inoculações foram realizadas em folhas destacadas e em plantas jovens.

Para as inoculações em planta, foram propagadas quatro cópias de cada genótipo, totalizando 356 plantas, em porta-enxerto limão Cravo (*C. limonia* Osbeck), em sacolas plásticas de 4 litros, cultivadas em substrato apropriado, e mantidas em casa de vegetação.

**Tabela 1.** Relação e classificação dos híbridos avaliados quanto à resposta à *Alternaria alternata*. TC: tangerina Cravo, LP: laranja Pera, TO: tangelo Orlando, TM: tangor Murcott, LV: laranja Valência, TP: tangerina Ponkan, MR: mexerica do Rio.

Classificação pela característica de fruto	Cruzamento	Nº do híbrido
Laranja	TC x LP	05, 10, 47, 62, 66, 69, 88
	TO x LP	06, 25
	TM x LV	104a, 117a
	TM x LP	5, 12, 13, 14, 16, 23, 42, 50, 88, 97, 105, 107, 110, 111, 112, 113, 116, 163, 170, 180, 188, 200, 202, 203c, 225, 233, 279, 285, 290, 324, 326, 338, 345, 354
Tangerinas	TC x LV	15
	TC x LP	24, 48
	TM x LP	87, 175, 203i, 217, 222, 258, 358
	TM x TP	02, 03, 04, 08, 09, 11, 12, 13
Mexerica	MR x LP	07, 140, 319, 355, 367
Murcott	TM x LP	33, 61, 124, 157, 246, 265, 281, 302, 321, 253, 353



**Figura 1.** Híbridos de citros mantidos em vasos em estufas teladas nas Coleções de BAG (Banco Ativo de Germoplasma) do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC (Cordeirópolis/SP).



### 3.2 Isolado do fungo e preparo do inóculo

O isolado de *Alternaria alternata* foi obtido a partir de lesões típicas da doença, em frutos de tangor Murcott, variedade altamente suscetível, coletadas no campo em plantio estabelecido no Centro de Citricultura Sylvio Moreira em Cordeirópolis, SP, local onde ocorre o fungo de forma endêmica. Para a obtenção do isolado foi utilizada a metodologia descrita por Peever et al. (1999), com modificações (AZEVEDO et al., 2010). As lesões foram separadas e desinfestadas superficialmente por meio de lavagens (etanol 70%, hipoclorito 3% de cloro ativo e água destilada esterilizada) e incubadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (200 g batata, 20 g dextrose, 15 g agar L<sup>-1</sup>), acrescentando o fungicida carbendazin (640 mg L<sup>-1</sup> do i.a.) para excluir a proliferação de outros fungos oportunistas, sendo em seguida, mantidos em fotoperíodo de 12 horas, a 27 °C, por 48 horas em BOD.

Após período de incubação (48 horas), hifas características foram identificadas com o auxílio de microscópio óptico, sendo estas transferidas e incubadas nas mesmas condições do isolado inicial, durante período de cinco dias após o qual ocorreu a indução do crescimento micelial do fungo fitopatogênico. A obtenção do isolado do fungo, assim como os experimentos de inoculação, foram conduzidos no Laboratório de Melhoramento e Qualidade do fruto (MQF) do Centro de Citricultura, em Cordeirópolis, SP.

Foram transferidos discos de micélio do fungo (5 mm de diâmetro) para placas de Petri contendo meio de esporulação (30 g de CaCO<sub>3</sub>, 20 g de sacarose e 20 g de ágar L<sup>-1</sup>), sendo estas incubadas em fotoperíodo de 12 horas, por quatro dias, em BOD, a 27 °C, conforme descrito por Canihos et al. (1999). Na sequência, com a ajuda de uma espátula estéril, os conídios foram retirados da superfície da placa, e ressuspensos em água destilada esterilizada. A suspensão de conídios foi filtrada em duas camadas de gazes esterilizadas, para a remoção dos fragmentos miceliais, sendo a concentração ajustada para 10<sup>5</sup> conídios mL<sup>-1</sup>, com auxílio de hemocítômetro.

### 3.3 Inoculação de *Alternaria alternata*

A inoculação com o fungo *Alternaria alternata* foi realizada em folhas destacadas (*in vitro*) e em plantas de seis meses de idade (*in vivo*).

O experimento de avaliação em folhas destacadas foi instalado em Câmara BOD, nas dependências do Laboratório MQF do Centro de Citricultura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada uma composta por uma placa de Petri contendo três folhas de cada genótipo. Folhas jovens de cada genótipo (2-3 cm de comprimento) foram coletadas de plantas desenvolvidas em vasos de 20L e mantidas em casa de vegetação (Banco de Germoplasma de Citros). Em seguida, as folhas foram lavadas em água corrente e acondicionadas em placas de Petri, contendo uma camada de papel de filtro e uma pequena porção de algodão umedecido. A inoculação foi realizada com uma suspensão de esporos de *A. alternata* ( $10^5$  esporos mL<sup>-1</sup>), utilizando-se um borrifador manual (2 mL folha<sup>-1</sup>). As placas foram mantidas em BOD a 27 °C com fotoperíodo de 12 horas, por 3 dias.

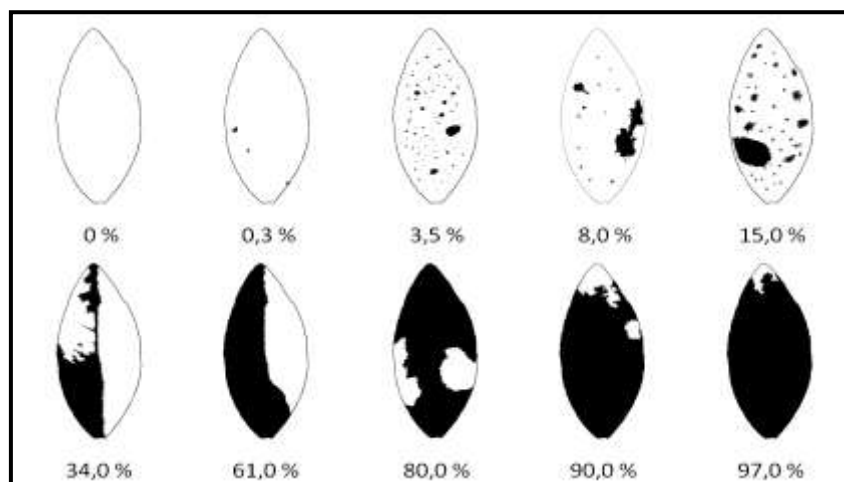
Para as inoculações *in vivo*, três plantas de cada genótipo, com seis meses de idade, foram podadas para estimular a brotação. Após 30 dias, as plantas foram selecionadas em função da presença de folhas novas (3-5 cm) e acondicionadas em sala aclimatizada, com temperatura ( $27 \pm 1$  °C) e umidade relativa ( $85 \pm 5\%$ ) controladas. A inoculação foi realizada com uma suspensão de esporos de *A. alternata* ( $10^5$  esporos mL<sup>-1</sup>), utilizando-se de borrifador manual, na face abaxial das folhas.

### 3.4 Avaliação dos sintomas de mancha marrom de alternaria

Para o experimento de folhas destacadas, as avaliações da doença foram realizadas após 24, 48 e 72 horas da inoculação do patógeno, de acordo com uma escala diagramática, descrita por Martelli (2011), representando os níveis de sintoma em dez notas ilustradas, onde “0” representa folha sem sintomas, e as notas de “1” a “9” representam 0,3; 3,5; 8; 15; 34; 61; 80; 90 e 97 por cento de área foliar tomada por sintomas de *Alternaria alternata* (Figura 2).

No experimento *in vivo*, a avaliação foi realizada após 72 horas da inoculação e consistiram na média da estimativa da área lesionada (% da folha tomada pela

doença), usando a escala diagramática de Martelli (2011), de todas as folhas sintomáticas de cada planta. Um esquema da metodologia de preparo do inóculo, inoculação e avaliação é apresentado na Figura 3.



**Figura 2.** Representação de escala diagramática de dez níveis para determinar a porcentagem de área foliar com sintoma da mancha marrom de alternaria causada por *Alternaria alternata*, desenvolvida por Martelli (2011).



**Figura 3.** Colônia de *A. alternata* (A); placas com meio de esporulação (B); transferência para esporulação (C); filtragem (D); contagem de esporos em microscópio óptico (E); visualização de esporos em câmara de Neubauer (F); inoculação (G, I); e avaliação (J).

estrutura reprodutiva do fungo (G); suspensão diluída (H); inoculação de folhas destacadas (I) e sintomas em folhas destacadas (J).

### **3.5 Avaliações das características físico-químicas de frutos**

Como a doença afeta as tangerinas e alguns dos seus híbridos, mensuraram-se algumas características dos frutos dos híbridos selecionados para avaliar se havia correlação entre a resposta ao fungo e o tipo de fruto dos híbridos (tangerina, mexerica, laranja e tangor). Amostras de frutos foram coletados dos híbridos avaliados em uma área experimental localizada no município de Itapetininga, SP. O experimento foi estabelecido em 2004, com duas repetições/plantas de cada material, enxertadas em limão Cravo (*C. limonia* Osbeck). As coletas foram realizadas durante o período produtivo, no ano de 2015.

Para a análise de qualidade foram colhidos 5 frutos ao acaso, na porção externa da copa, na faixa compreendida entre 1,0 e 2,0 m de altura do solo e em toda a extensão do perímetro da planta de cada repetição. As amostras foram encaminhadas para as análises físico-químicas junto ao Laboratório de Melhoramento e Análise de Qualidade de Fruto (MQF) do Centro APTA Citros Sylvio Moreira (IAC), em três épocas distintas (abril, agosto e setembro) que correspondem ao período de maturação dos materiais. A massa total dos frutos da amostra foi obtida em balança, com precisão de um grama. O teor de sólidos solúveis (Brix) foi determinado por leitura direta em refratômetro B&S, modelo RFM 330; a acidez titulável (% ácido cítrico) foi determinada por titulação de 25 mL de suco, com uma solução de hidróxido de sódio (0,3125 N) usando-se a fenolftaleína como indicadora (REED et. al., 1986); e o *ratio* pela relação direta sólidos solúveis/acidez titulável. Todas as análises foram realizadas conforme metodologias de rotina do laboratório de MQF.

### **3.6 Análises estatísticas**

As análises dos dados das avaliações de severidade da doença foram realizadas utilizando-se o *software* SISVAR 4.5 (FERREIRA, 2011). As médias foram transformadas em raiz quadrada ( $Y + 1,0$ ) e após a análise de variância, realizou-se

a comparação de médias pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade. Para os dados de severidade no experimento em folhas destacadas, foi calculada a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) pelo método da integração trapezoidal (SHANER; FINNEY, 1977).

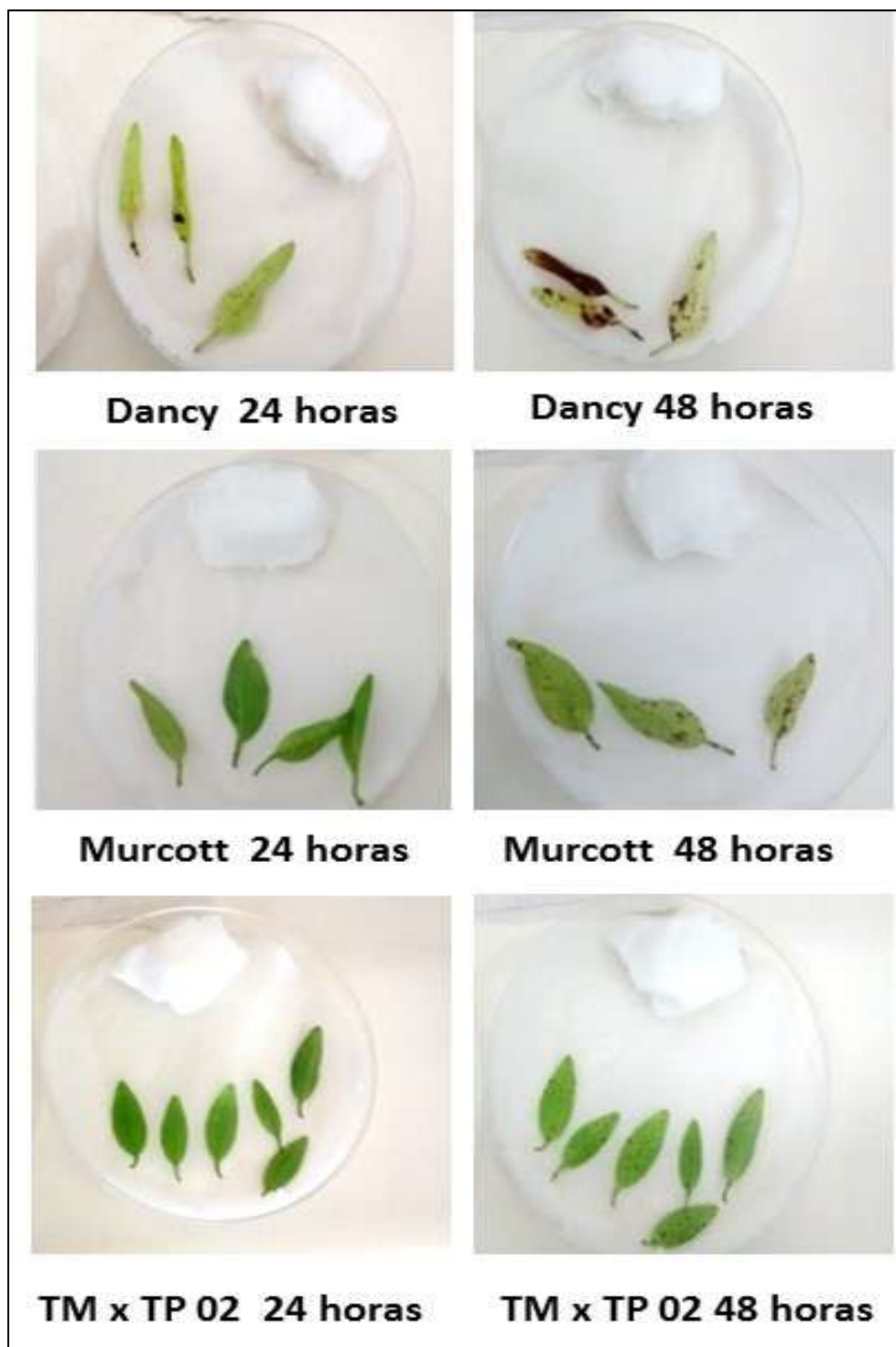
Os dados de qualidade de fruta e doença foram submetidos à análise multivariada, que foi realizada por meio de método de agrupamento. Para a realização dessa análise empregou-se o método hierárquico UPGMA (Unweighted Pair Grouped Method Average), utilizando-se o programa NTSYS versão 2.2 (ROHLF, 2005).

## **4 Resultados e Discussão**

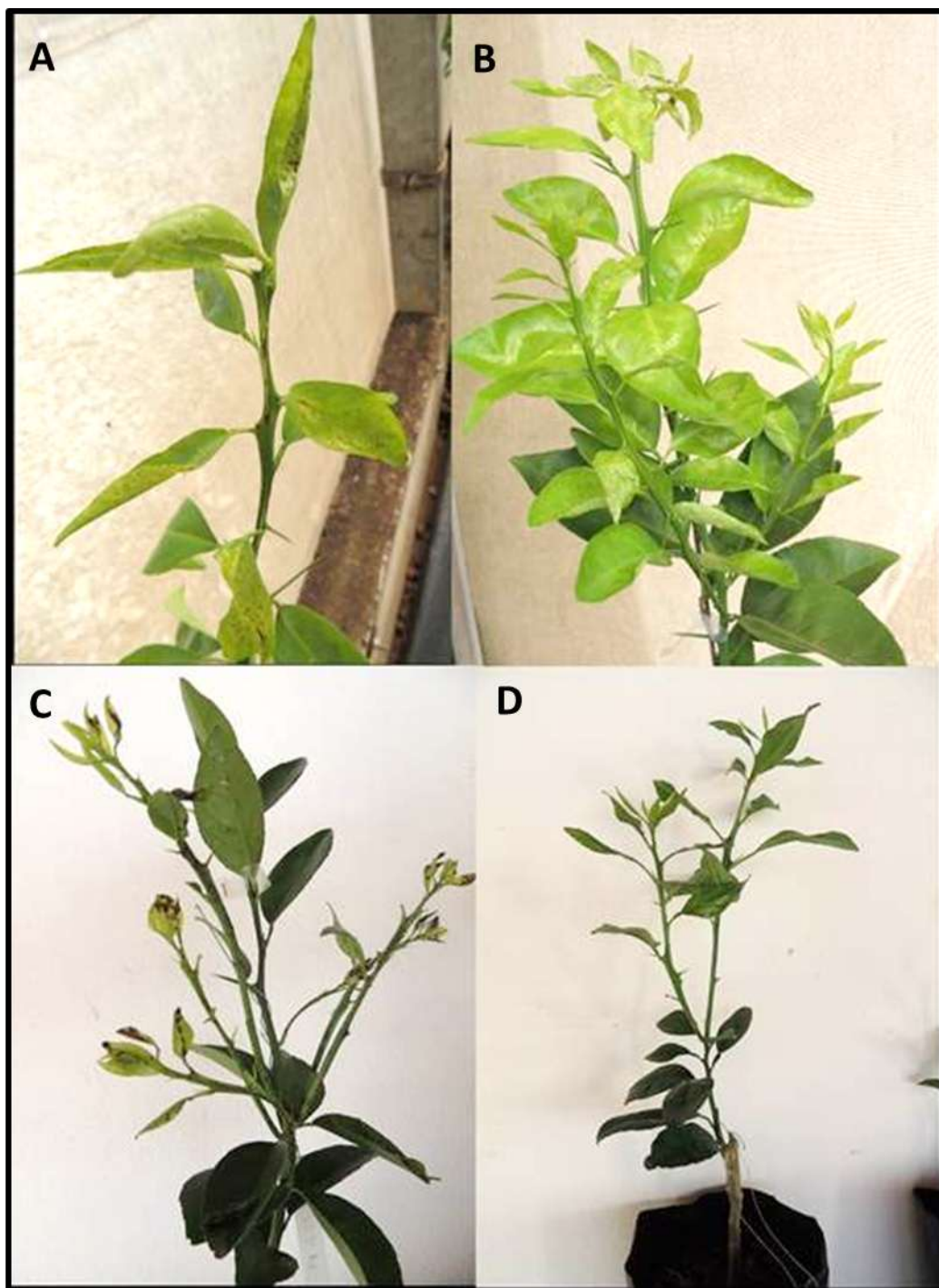
### **4.1 Avaliação dos sintomas de mancha marrom de alternaria**

Sintomas típicos de MMA foram observados após 24 horas de inoculação com o fungo em folhas destacadas em alguns híbridos, genitores e testemunha suscetível (tangerina Dancy). Estes sintomas se caracterizavam por pequenas manchas, de coloração marrom a preta, de tamanho variado nas folhas, que em alguns casos se expandiram nas avaliações subsequentes para grandes áreas necrosadas dos tecidos foliares, possivelmente pela ação da toxina ACT, como descrito por alguns autores (KOHMOTO et al., 1993; AKIMITSU et al., 2003). Na figura 3 pode ser visualizada a evolução dos sintomas em Dancy (testemunha suscetível), Murcott (genitor suscetível) e no híbrido TM x TP 02 obtido do cruzamento entre tangor Murcott e tangerina Ponkan. Em plantas, os sintomas iniciaram após 24 horas e foram avaliados após 72 horas da inoculação (Figura 4).

Foi observada uma grande variabilidade em resposta à inoculação de *A. alternata* entre os híbridos avaliados, tanto em folhas destacadas quanto em plantas jovens (Tabela 2). Em folhas destacadas (*in vitro*) a porcentagem de área foliar com sintomas variou de 0 a 34 nos híbridos e de 0 a 21,3 entre os genitores após 72 horas de inoculação. Valores menores de porcentagem de área lesionada foram observados em resposta à inoculação do fungo nas plantas (*in vivo*), sendo a variação observada de 0 a 19,5% entre os híbridos e de 0 a 4,5% entre os genitores.



**Figura 4.** Sintomas de MMA em folhas dos genótipos tangerina Dancy, tangerina Murcott e do híbrido TM x TP 02, em 24 e 48 horas após a inoculação do fungo.



**Figura 5.** Sintomas de MMA em folhas jovens de plantas dos híbridos (A) TM x LP 258, (B) TM x LP 225, (C) TM x LP 265 e (D) planta assintomática de TM x LP 107, em 72 horas após a inoculação do fungo.

**Tabela 2.** Severidade (%) e área abaixo da curva de progresso (AACPD) da mancha marrom de alternaria avaliadas após inoculações *in vivo* e *in vitro* de *Alternaria alternata* em híbridos, seus genitores e variedades de citros.

Genótipo	<i>in vitro</i>			AACPD	<i>in vivo</i>	Genótipo	<i>in vitro</i>			AACPD	<i>in vivo</i>
	24 h	48 h	72h				24 h	48h	72h		
TM x LP 163	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 111	0,3 aA	0,3 aA	0,3 aA	14,4 a	0,56 a
TM x LP 16	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	1,76 a	TM x LP 42	0,3 aA	0,3 aA	0,3 aA	14,4 a	5,1 b
TM x LP 170	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 302	0,3 aA	0,3 aA	0,3 aA	14,4 a	2,43 a
TM x LP 202	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 203c	0 aA	0,1 aA	2,4 bB	31,6 b	*
TM x LP 200	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 253	0,2 aA	0,3 aA	2,4 bB	38,8 b	1,1 a
TM x LP 13	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TC x LP 62	0 aA	0,1 aA	3,5 bB	44,4 b	0 a
TC x LV 15	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 354	0 aA	0 aA	3,9 bB	47,2 b	0,23 a
TM x LP 107	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x TP 4	0,1 aA	0,3 aA	3,5 bB	50,4 b	*
TM x LP 14	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 50	0,3 aA	1,4 aA	3,5 bB	78,4 b	5,16 b
TM x LP 110	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 217	0 aA	0,1 aA	8 dB	98,4 b	17,9 b
TM x LP 203	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	3,36 b	TM x LP 180	0 aA	0,3 aA	8 bB	103,2 b	5,16 b
TM x TP 3	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 233	0,3 aA	2,4 bB	6,5 cC	140 c	0,3 a
TM x TP 11	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0,16 a	TM x LP 345	0,3 aA	3,5 bB	5 cB	147,6 c	2,56 a
TM x TP 9	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	1,36 a	TM x LP 112	3,5 bA	3,5 bA	3,5 bA	168 c	1,56 a
<b>Valência</b>	<b>0 aA</b>	<b>0 aA</b>	<b>0 aA</b>	<b>0 a</b>	<b>0 a</b>	TM x LP 285	3,5 bA	3,5 bA	3,5 bA	168 c	8,23 b
TO x LP 25	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TO x LP 6	0,3 aA	3,5 bB	7,3 cC	175,6 c	0,1 a
TM x LP 324	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 87	0,3 aA	3,5 bB	10 dC	211,6 c	0,86 a
TM x LP 279	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x TP 12	3,5 bA	3,5 bA	8,8 dB	232 c	8,16 b
TM x LP 326	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	1,46 a	TM x TP 13	3,8 bA	6,2 bA	6,2 bA	240 c	0,2 a
TM x LV 117A	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 222	0 aA	3,5 bB	15 fC	264 d	2,86 a
TM x LP 88	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 175	2,4 bA	3,5 bB	13 eC	265,2 c	1,26 a
TC x LP 88	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 113	1 aA	3,5 bB	15 fC	265,2 c	3,63 b
<b>T. Cravo</b>	<b>0 aA</b>	<b>0 aA</b>	<b>0 aA</b>	<b>0 a</b>	<b>0 a</b>	TM x LP 358	0,3 aA	3,5 bB	15 fC	267,6 d	2,06 a
<b>Pera</b>	<b>0 aA</b>	<b>0 aA</b>	<b>0 aA</b>	<b>0 a</b>	<b>0 a</b>	TM x TP 8	2,8 bA	8,8 dB	2,8 bA	278,4 d	0,66 a
TC x LP 05	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TC x LP 24	0,3 aA	1,4 aA	22 eB	295,6 c	0 a
TC x LP 47	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 353	3,9 bA	7,1 cA	7,1 cA	302,8 c	2,4 a
TC x LP 10	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x TP 2	3,5 bA	3,5 bA	15 fB	306 d	*
<b>Mex. Do Rio</b>	<b>0 aA</b>	<b>0 aA</b>	<b>0 aA</b>	<b>0 a</b>	<b>0 a</b>	TM x LP 12	0,3 aA	6,5 cB	13 eC	311,6 d	6,23 b
<b>Fremont</b>	<b>0 aA</b>	<b>0 aA</b>	<b>0 aA</b>	<b>0 a</b>	<b>0 a</b>	<b>Murcott</b>	<b>2,4 bA</b>	<b>6,5 cB</b>	<b>13 eC</b>	<b>337,2 d</b>	<b>3,83 b</b>
<b>Clementina Nules</b>	<b>0 aA</b>	<b>0 aA</b>	<b>0 aA</b>	<b>0 a</b>	<b>0 a</b>	TM x LP 281	0,3 aA	8 dB	15 fC	375,6 d	0,5 a
MC x LP 319	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 5	2,4 bA	10 dB	10 dB	401,2 d	0 a
MC x LP 7	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 258	0,3 aA	10 dB	15 fC	431,6 e	3,06 b
MC x LP 355	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 290	0 aA	15 eB	15 fB	540 e	0 a
MC x LP 367	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	<b>Ponkan</b>	<b>3,5 bA</b>	<b>10 dB</b>	<b>21 gC</b>	<b>546 e</b>	<b>1,7 a</b>
TC x LP 48	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 23	5 bA	15 eB	15 fB	600 e	1,63 a
TC x LP 66	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 157	1,4 aA	8 dB	34 iC	616,4 e	1,56 a
TC x LP 69	0 aA	0 aA	0 aA	0 a	0 a	TM x LP 321	0,3 aA	15 dB	21 gC	619,6 e	3,7 b
TM x LP 188	0 aA	0 aA	0,2 aA	2,4 a	0 a	TM x LP 124	8,8 cA	15 eB	17 fB	656 e	1,46 a
TM x LV104A	0 aA	0 aA	0,3 aA	3,6 a	0 a	TM x LP 225	3,5 bA	15 eB	21 gC	658 e	19,5 b
MC x LP 140	0 aA	0 aA	0,3 aA	3,6 a	0 a	TM x LP 338	3,9 bA	15 eB	28 hC	739,2 f	7,83 b
TM x LP 97	0 aA	0 aA	0,3 aA	3,6 a	0 a	TM x LP 265	3,5 bA	15 eB	34 iC	810 f	11,5 b
TM x LP 105	0 aA	0 aA	0,1 aA	3,6 a	0 a	TM x LP 33	5 bA	15 eB	34 iC	828 f	7,56 b
TM x LP 116	0,1 aA	0 aA	0,2 aA	6 a	3,8 b	<b>T. Orlando</b>	<b>5 bA</b>	<b>15 eB</b>	<b>34 iC</b>	<b>828 f</b>	<b>4,5 b</b>
TM x LP 61	0 aA	0 aA	0,3 aA	11 a	1,36 a	<b>Dancy</b>	<b>13 dA</b>	<b>86 fB</b>	<b>99 jC</b>	<b>3396 g</b>	<b>44,3 c</b>
TM x LP 246	0,2 aA	0 aA	0,3 aA	13 a	3,26 b						

Médias seguidas de mesma letra na coluna (minúscula) e na linha (maiúscula), não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p > 0,05$ ). Testemunhas: tangerinas Dancy (suscetível), Fremont e Clementina de Nules (resistentes). LP = laranja Pera; LV = laranja Valência; MR = mexerica Rio; TC = tangerina Cravo; TM = tangor Murcott; TO = tangelo Orlando; TP = tangerina Ponkan.

\*Genótipos não avaliados.



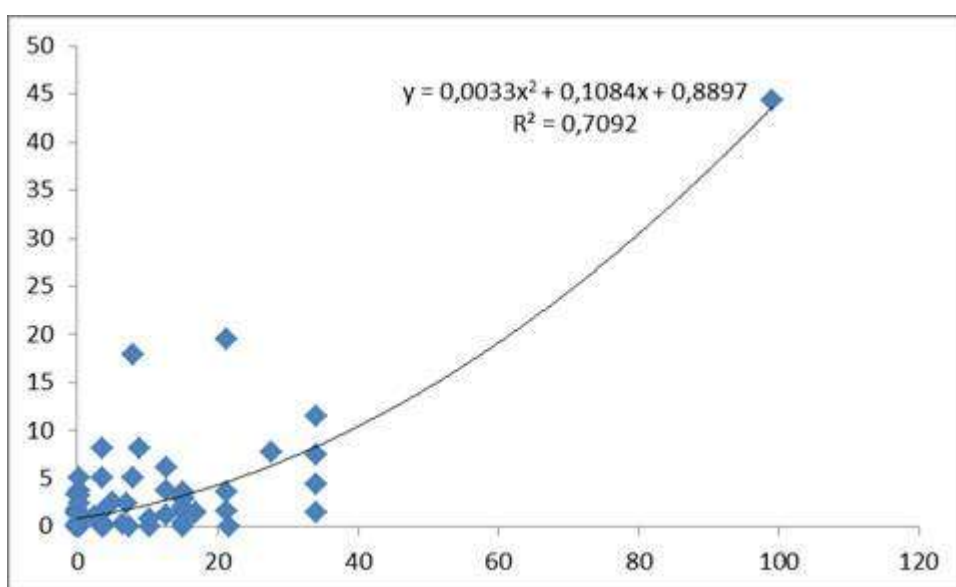
A tangerina Dancy, usada como testemunha suscetível, apresentou maior severidade dos sintomas, tanto em folhas destacadas (99%) quanto em planta (44,3%). Dentre os genitores o tangelo Orlando, o tangor Murcott e a tangerina Ponkan foram suscetíveis. Estudos anteriores demonstraram a alta suscetibilidade destes materiais a MMA (SOLEIL; KIMCHI, 1997; PEEVER et al., 2000; KARVAN et al., 2012; AZEVEDO et al., 2010). Já as laranjas (Valência e Pera), tangerina Cravo, mexerica do Rio, clementina Nules e tangerina Fremont, estas duas últimas utilizadas como testemunhas resistentes, não exibiram sintomas da doença. De fato, estas variedades têm sido relatadas como resistentes (AZEVEDO et al., 2010; CUENCA et al., 2013; BASTIANEL et al., 2014).

Embora não sejam encontrados relatos de MMA afetando naturalmente pomares de laranjas doces, alguns trabalhos utilizando diferentes métodos de inoculação mostram diferenças nas respostas a MMA entre variedades de *C. sinensis*. Elena (2006) relata que as variedades Lane Late, Navel Late, Oval Poros, Olinda, Navel Athos não foram suscetíveis, enquanto Karvan et al. (2012), com base em inoculações em folhas destacadas, relataram três variedades cultivadas no Iran (Thomson, Local e Lime) como moderadamente suscetíveis.

Soleil e Kimchi em 1997, também observaram a presença de sintomas em folhas destacadas das laranjas doces Shamouti, Washington Navel e Valência, embora tenham relatado que as mesmas são assintomáticas em campo na Florida, mesmo quando plantadas próximas a tangelo Minneola, altamente afetado pela doença. Já Gardner et al. (1986), que confirmaram a suscetibilidade de tangerinas e pomelos na Florida, relataram resultados inconclusivos em laranja doce. Quando os autores inocularam folhas de laranja Valência eles observaram apenas lesões imediatas, típicas de reação de hipersensibilidade no momento da inoculação. Estas diferenças em resposta à inoculação artificial de *A. alternata* em laranja doce poderiam estar relacionadas ao isolado do fungo, ou características fisiológicas das folhas. Neste trabalho não foram observados nenhum tipo de lesão em folhas destacadas ou em plantas das variedades de laranjas estudadas, comprovando a sua resistência ao isolado de *A. alternaria*.

Dos híbridos avaliados em folhas destacadas após 72 horas da inoculação, 31 não apresentaram sintomas da doença, 23 apresentaram poucos sintomas (% área lesionada menor que 8), não apresentando diferenças entre si. Os demais híbridos apresentaram diferentes níveis de suscetibilidade. Por outro lado, nas

inoculações em plantas, um maior número de genótipos (40) mostrou-se resistente, não exibindo nenhum sintoma da doença (Tabela 2). Diferenças na severidade em inoculações em folhas destacadas e plantas são relatadas por outros autores (AZEVEDO et al., 2010; REIS et al., 2007) e podem estar relacionadas às alterações fisiológicas e perda da capacidade de resposta de resistência em folhas destacadas (CHUTIA et al., 2009; AZEVEDO et al., 2010). Mesmo com algumas diferenças, a correlação existente entre os dois métodos de inoculação utilizados nesse trabalho foi alta ( $R^2 = 0,70$ ) (Figura 6), evidenciando que ambos os métodos podem ser utilizados para avaliar a resposta a *Alternaria alternata* em citros. Segundo Souza et al. (2009), avaliando diferentes métodos de inoculação em genótipos do Banco de Germoplasma da Estação Experimental de Citros Bebedouro (Bebedouro, SP), verificaram que há relação entre nível de suscetibilidade em folhas jovens destacadas, infecção natural de folhas e frutos, e infecção artificial por inoculação em frutos.



**Figura 6:** Curva de correlação entre as avaliações *in vivo* e *in vitro* da inoculação do fungo *Alternaria alternata*. No eixo x, valores de severidade (%) em folhas destacadas (média dos três tempos de avaliação) e no eixo y, valores de severidade (%) em plantas.

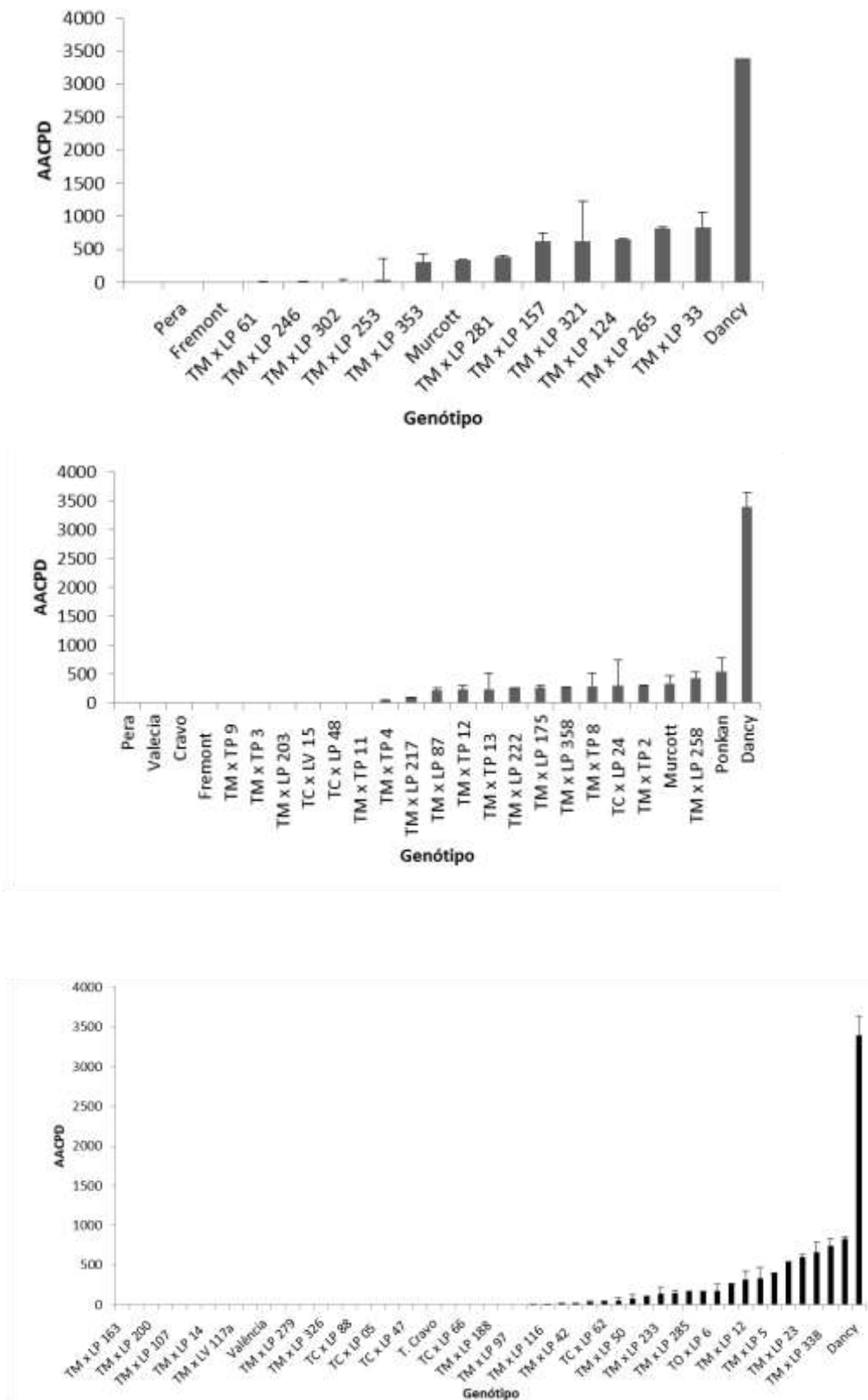
Quando se compara a severidade nos três tempos de avaliação se observa que os valores médios de porcentagem da área afetada com sintomas variaram de

0,1 a 12,7 após 24 horas da inoculação com o fungo, de 0,1 a 85,66% após 48 horas, sendo que oito novos híbridos apresentaram sintomas, e de 0,1 a 99% no final das avaliações (72 horas), quando outros cinco híbridos foram sintomáticos.

Quando se analisa a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), observa-se que houve um aumento dos sintomas (Tabela 2, Figura 7), com diferenças estatísticas entre si, variando de 2,4 a 828 entre os híbridos e genitores suscetíveis. A tangerina Dancy usada como padrão de suscetibilidade foi o genótipo que apresentou maior área de progresso da doença.

Quando se avalia a resposta entre as diferentes progênies, observa-se que os híbridos obtidos entre tangerina Cravo e laranja Pera (TC x LP), ambas resistentes, não mostraram sintomas quando inoculados em plantas, e apenas dois híbridos apresentaram baixa porcentagem de área com lesões apenas quando avaliados em folhas destacadas. O mesmo foi observado entre os híbridos obtidos entre mexerica Rio e laranja Pera, tendo entre estes apenas um híbrido com poucos sintomas e somente após 72 horas de inoculação. Já entre os híbridos de Murcott x Pera, 16 foram assintomáticos, quando inoculados em plantas, sendo que os demais mostraram diferentes níveis de suscetibilidade. O híbrido TC x LV 15 foi resistente e os híbridos TM x LV (104a e 117a) foram assintomáticos ou apresentaram baixa severidade dos sintomas (Tabela 2). Já os dois híbridos TO x LP foram distintos sendo um resistente (TO x LP 25) e outro suscetível (TO x LP 06).

Alguns trabalhos sugeriram que a herdabilidade genética para a suscetibilidade em citros para a mancha marrom de alternaria seria de herança simples e dominante (DALKILIC et al., 2005; GULSEN et al., 2010; CUENCA et al., 2013), sendo o alelo 'A' dominante para suscetibilidade e 'a' recessivo para a resistência a doença. Deste modo, com base no que foi proposto por estes autores, a laranja doce teria o genótipo 'aa' e o tangor Murcott 'Aa'. Assim na população obtida entre os dois genitores seria esperada uma segregação mendeliana de 1:1 (Resistentes:Suscetíveis).



**Figura 7:** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) no grupo de (A) tangores, (B) tangerinas e (C) laranjas.

Dentre os 52 híbridos de Murcott x Pera, foi observado que nas avaliações em folhas destacadas após 72 horas de inoculação com o fungo, 14 híbridos foram assintomáticos e, portanto, resistentes a *A. alternata*, nove híbridos foram moderadamente suscetíveis, apresentando uma baixa porcentagem de área com lesões (área de lesão menor a 2%) não diferindo estatisticamente dos indivíduos resistentes e 29 foram suscetíveis (área de lesão maior a 7,1%). Resultado similar foi observado nas avaliações em plantas, sendo 15 assintomáticos, 19 com poucos sintomas e 17 com diferentes níveis de sintomas que diferenciaram estatisticamente dos demais. Assim, os resultados mensurados com base na inoculação artificial com o fungo, sugerem desvios desta segregação na progênie, sendo de 23:29, utilizando-se folhas destacadas e 34:17, empregando-se plantas.

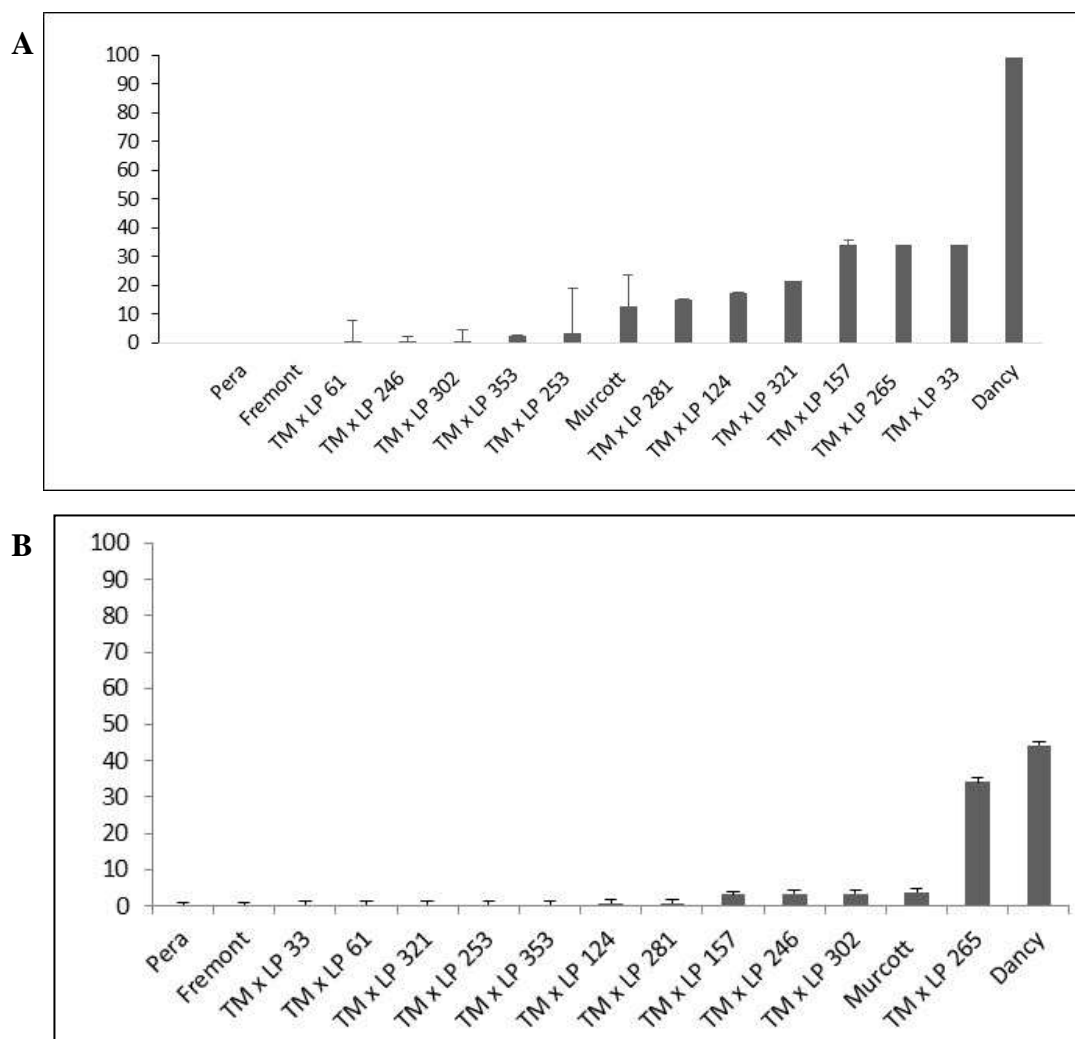
Poucos estudos têm sido conduzidos para avaliar a herança genética da doença nos citros e, até o momento, se desconhece algum trabalho desta natureza envolvendo populações obtidas entre tangerinas e laranjas. Sabe-se também que a toxina ACT, produzida por *A. alternata* é específica para uma determinada gama de hospedeiros (KOHMOTO et al., 1991; PEEVER et al., 1999), sendo algumas tangerinas e seus híbridos suscetíveis. Por outro lado, a observação de sintomas em algumas laranjas doces quando inoculadas *in vitro* (SOLEIL; KIMCHI, 1997; ELENA, 2006; KARVAN et al., 2012) sugerem que outros fatores ou outros genes podem estar envolvidos na interação *A. alternata* x citros.

Quando se avalia a resposta à inoculação controlada de *A. alternata* nos híbridos, dentro dos grupos hortícolas mexerica, tangerinas, laranjas e tangores, em folhas destacadas (*in vitro*) e em campo (*in vivo*), após 72 horas de inoculação com o fungo (Figura 8), se observa que todos os indivíduos apresentaram algum nível de sintomas dentro do grupo de tangores, sendo o grupo com maior severidade da doença. Vale lembrar que o tangor Murcott é muito apreciado pelo consumidor brasileiro e também se constitui um excelente fruto para exportação para o mercado de frutas frescas, entretanto, sua área de plantio no Estado de São Paulo tem sido consideravelmente diminuída em função da sua alta suscetibilidade a mancha marrom de alternaria (AZEVEDO et al., 2015; PACHECO et al., 2012). Apesar de os híbridos selecionados neste grupo terem apresentado sintomas, quando comparados com os outros grupos, cinco deles apresentaram níveis menores de severidade, quando comparados com a Murcott. Provavelmente estes materiais são

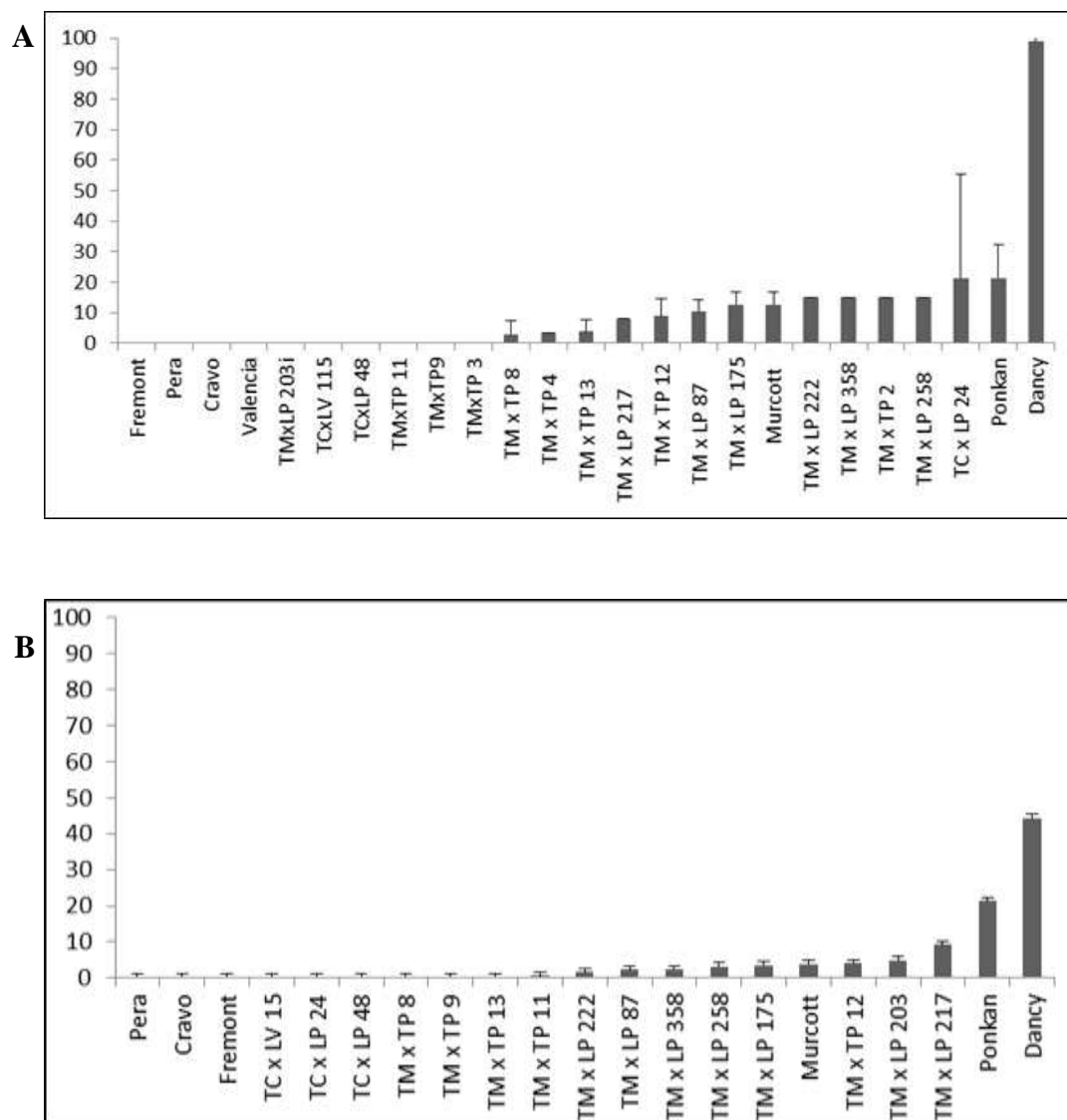
pouco suscetíveis ou resistentes no campo e podem se constituir em materiais interessantes para novas áreas comerciais. Estes híbridos foram o TM x LP 61, TM x LP 246, TM x LP 253; TM x LP 302 e TM x LP 353.

Dentro do grupo de mexericas, como esperado, quatro híbridos foram resistentes e um só mostrou poucos sintomas, após 72 horas de inoculação, em folhas destacadas, não diferenciando estatisticamente dos demais (Tabelas 2 e 3). E entre os híbridos com frutos tipo tangerina, seis híbridos (55%) foram resistentes (TC x LP 48, TC x LV 15, TM x LP 203i; TM x TP 3 e TM x TP 9, TM x TP 11), ou seja, não apresentando sintomas em folhas destacadas e em plantas e, portanto, podem se constituir em bons materiais visando o uso de resistência varietal como controle da MMA no campo (Figura 9).

Já entre os genótipos tipo laranja, dos 45 híbridos avaliados, 21 foram assintomáticos (47%) tanto em folhas destacadas como em plantas. Foram eles TM x LP (13, 14, 16, 88, 107, 110, 163, 170, 200, 202, 279, 324, 326), TM x LV 117A, TO 25 e TC x LP (5, 10, 47, 66, 69, 88). Pelo menos quatro outros híbridos exibiram poucos sintomas apenas em folhas destacadas (TM x LP 97, TM x LP 105, TM x LP 188 e TM x LV 104A) e, portanto, podem ser resistentes no campo (Figura 10). As laranjas são cultivadas em mais de 80% dos pomares no estado de São Paulo, ocupando extensas áreas de plantio cuja produção é destinada principalmente à indústria de suco. Se por um lado a diversificação de variedades é amplamente desejável, por outro é imprescindível que novas variedades plantadas sejam resistentes à doença para viabilidade econômica da cultura. Como a doença não ocorre neste grupo de citros nos pomares não é desejável o plantio de variedades suscetíveis. Apesar de 17 híbridos terem herdado a suscetibilidade a *A. alternata* do genitor Murcott, um número expressivo de novos genótipos (21 híbridos), foram resistentes. Todos os híbridos selecionados neste trabalho estão sendo validados como novas variedades em ensaios regionais no estado de São Paulo.

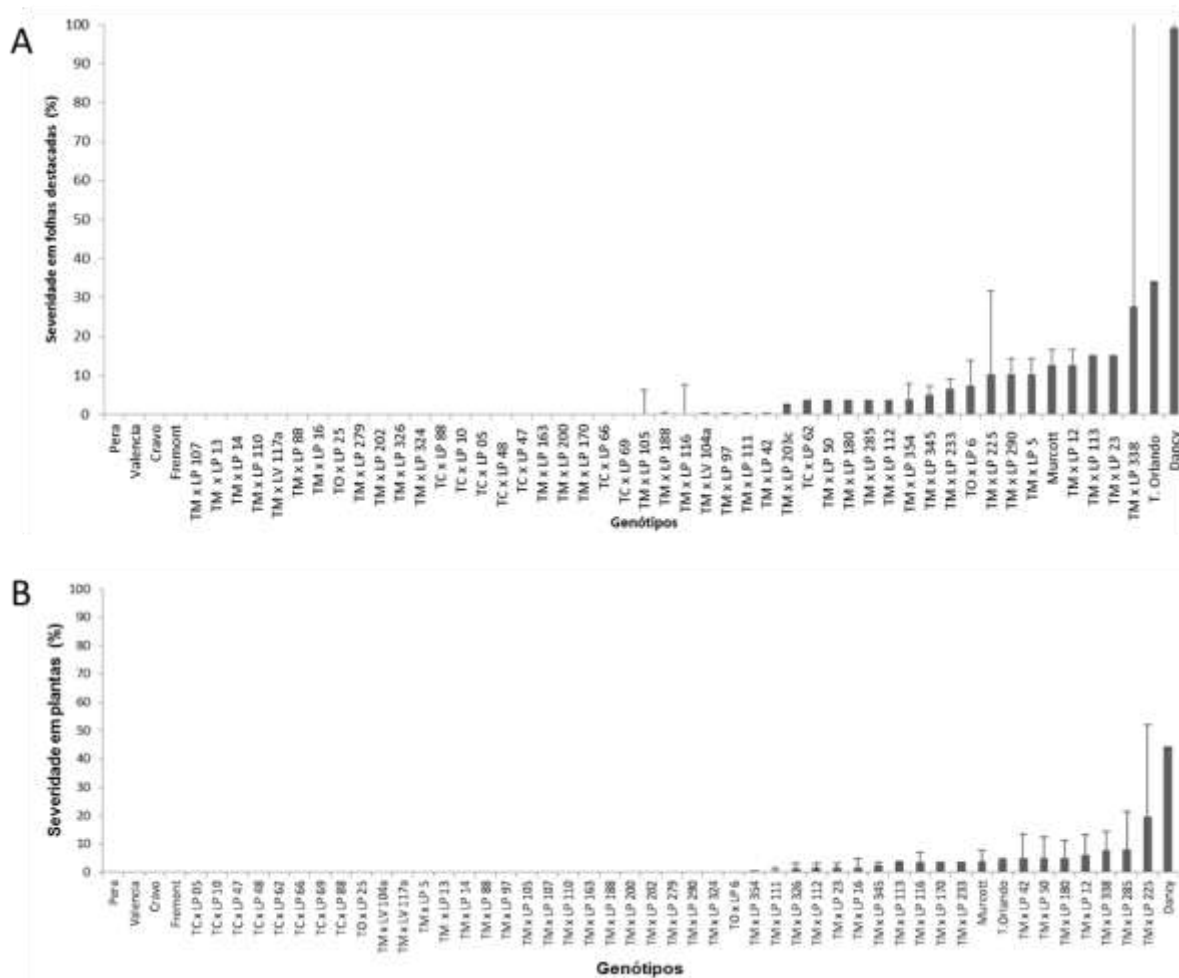


**Figura 8:** Severidade da doença (%) em (A) folhas destacadas (*in vitro*) e (B) em plantas (*in vivo*), após 72 horas de avaliação, dos híbridos pertencentes ao grupo “tipo Murcott”, genitores e testemunha resistente (Fremont) e suscetível (Dancy).



**Figura 9:** Severidade da doença (%) em (A) folhas destacadas (*in vitro*) e (B) em plantas (*in vivo*), após 72 horas de avaliação, dos híbridos pertencentes ao grupo “tipo tangerina”, genitores e testemunha resistente (Fremont) e suscetível (Dancy).





**Figura 10:** Severidade da doença (%) em (A) folhas destacadas (*in vitro*) e (B) em plantas (*in vivo*), após 72 horas de avaliação, dos híbridos pertencentes ao grupo “tipo laranja”, genitores e testemunha resistente (Fremont) e suscetível (Dancy).

## 4.2 Avaliação das características físico-químicas

Dentro de um programa de melhoramento de citros visando à obtenção de genótipos resistentes à doença, é de fundamental importância avaliar a qualidade de frutos. Novas variedades devem necessariamente atender às exigências do mercado consumidor, entre elas destacam-se as características físico-químicas dos frutos, como por exemplo, tamanho, coloração da polpa e do fruto e teor de sólidos solúveis. Assim, estes materiais presentes em um campo experimental localizado no município de Itapetininga, SP, também foram avaliados para estas características (Tabela 3).

Na construção do dendrograma foram consideradas características físicas e químicas de fruto (Tabela 3) como médias de massa do fruto, relação altura/diâmetro (A/D), rendimento de suco (RS) e número de frutos por caixa dos genótipos, assim como a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). A análise multivariada foi realizada por meio de método de agrupamento. Para a realização dessa análise empregou-se o método hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair Grouped Method Average*), adotando como medida de dissimilaridade a distância Euclidiana média, considerando os valores médios obtidos para os caracteres, a fim de representar as relações entre os acessos e caracterizar a diversidade. O método de agrupamento UPGMA obteve uma correlação cofenética de 0,7399786, o que indica que houve um bom ajustamento entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma (SOKAL; ROHLF, 1962).

No dendrograma (Figura 11), observa-se que os híbridos MC x LP 140 (G4) e TM x LP 163 (G35) são os que possuem a maior semelhança entre si. A tangerina Dancy (G2) é a mais divergente entre os acessos por apresentar características diferenciada dos demais, como menor massa do fruto (71 g). Os híbridos TM x LP 16 (G34) e o TM x LP 279 (G53) formaram um grupo e apresentaram maior dissimilaridade entre os demais acessos.

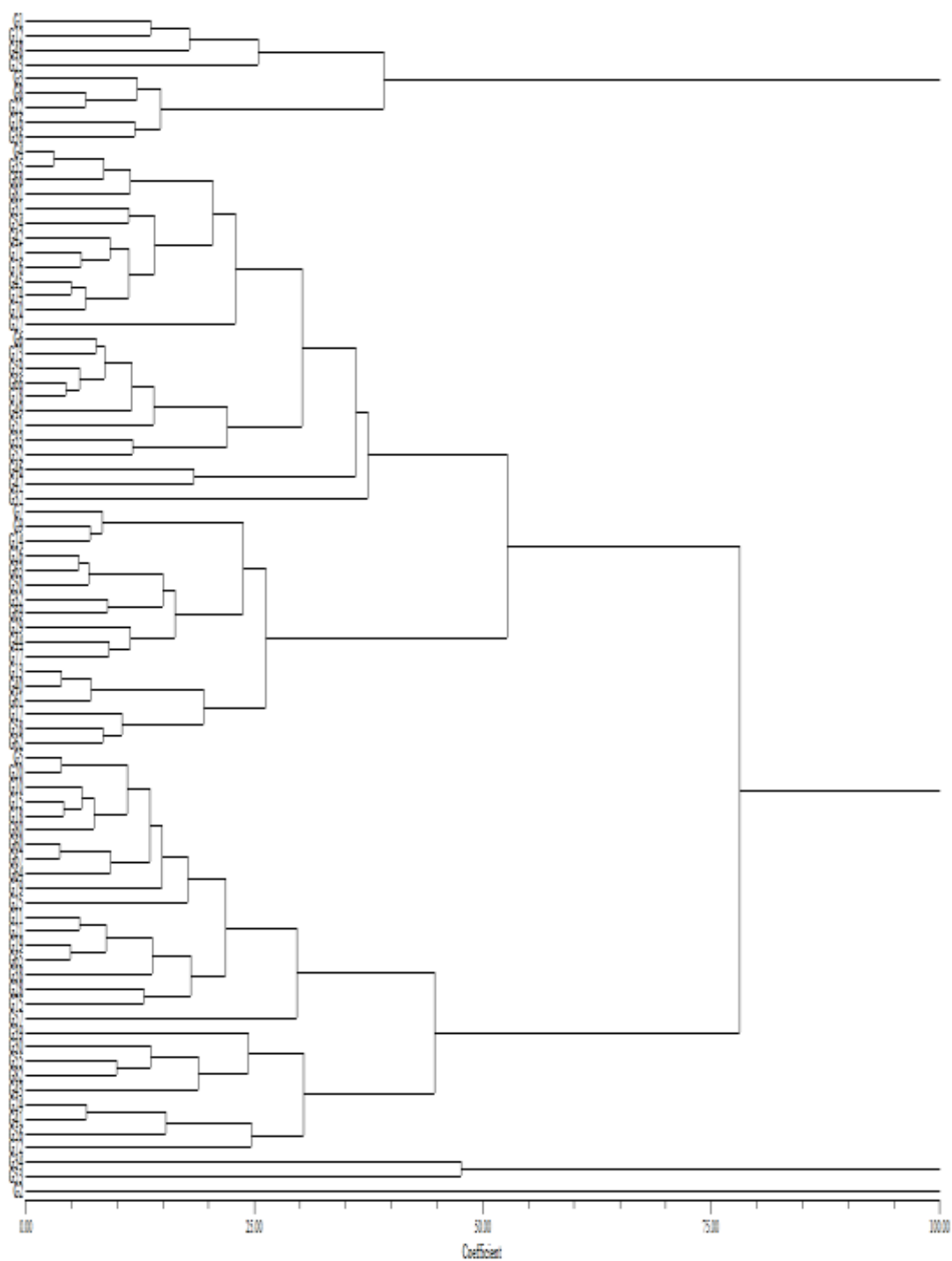
Como pode ser observado na Figura 11, a análise de agrupamento não refletiu a separação por grupos dada na Tabela 3, uma vez que, como exemplo, o híbrido MC x LP 140 foi classificado como mexerica e o TM x LP 163 como laranja, pelas características formato do fruto e casca solta ou aderida. Assim, possivelmente a doença não tem correlação com o formato/tipo de fruto.

**Tabela 3.** Médias de massa do fruto, relação altura/diâmetro (A/D), rendimento de suco (RS), número de frutos por caixa dos genótipos (Itapetininga, 21 de maio de 2015) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD)

Grupos	Genótipos	Massa (g)	A/D	RS (%)	Frutos/Cx	AACPD
<b>MEXERICA</b>	MCXLP140 (G4)	146,0	0,8	49,3	279,0	3,6 a
	MCXLP 355*					0 a
	MCXLP319 (G5)	179,0	0,8	46,2	227,0	0 a
	MCXLP367 (G7)	125,0	0,8	36,2	326,0	0 a
	MCXLP7 (G8)	114,3	0,8	46,9	356,0	0 a
	<b>M. Rio (G9)</b>	125,0	0,8	45,1	326,0	0 a
<b>MURCOTT</b>	<b>Murcott (G10)</b>	178,0	0,8	49,0	229,0	337 d
	TMXLP33 (G61)	139,0	0,8	47,5	293,0	828 f
	TMXLP61 (G69)	138,2	0,8	43,9	307,0	10,8 a
	TMX LP 124*					656 e
	TMXLP157 (G33)	170,3	0,8	47,8	250,3	616 e
	TMXLP246 (G49)	166,0	0,8	55,4	245,0	13,2 a
	TMXLP253 (G50)	136,0	0,8	45,0	300,0	38,8 b
	TMXLP265 (G52)	163,0	0,8	53,2	250,0	810 f
	TMXLP281 (G54)	148,3	0,9	41,0	266,0	376 d
	TMXLP302 (G57)	190,8	0,9	54,0	208,7	14,4 a
	TMXLP321 (G58)	133,0	0,9	50,4	306,0	620 e
	TMXLP 353*					302,8 c
<b>TANGERINA</b>	<b>Clementina (G1)</b>	104,5	1,0	52,0	390,0	0 a
	<b>Dancy (G2)</b>	71,0	0,9	47,0	574,0	3396 g
	<b>Fremont (G3)</b>	117,5	0,8	44,7	347,0	0 a
	<b>Ponkan (G2)</b>	107,0	0,8	42,0	381,0	546 e
	<b>T. Cravo (G14)</b>	126,0	0,8	40,5	323,0	0 a
	TCXLP24 (G16)	114,0	0,8	30,1	357,0	296 c
	TCXLP48 (G18)	176,4	0,8	42,1	231,0	0 a
	TMXLP87 (G70)	153,3	0,8	52,0	261,3	212 c
	TMXLP175 (G37)	189,3	0,9	52,3	260,7	265 c
	TMXLP203 (G42)	152,5	0,9	44,8	263,3	0 a
	TMXLP217 (G44)	132,8	0,9	42,7	307,0	98,4 b
	TMXLP222 (G45)	155,7	0,9	53,5	261,3	264 d
	TMXLP258 (G51)	165,0	0,9	53,9	247,0	432 e
	TMXLP358 (G65)	186,0	0,9	47,8	219,0	268 d
	TMXTP11 (G75)	182,0	0,9	30,0	224,0	0 a
	TMXTP12 (G76)	147,0	0,9	48,4	270,0	232 c
	TMXTP2 (G77)	129,0	0,9	41,5	308,3	306 d
	TMXTP3 (G78)	164,0	0,9	48,0	248,0	0 a
	TMXTP4 (G79)	167,4	0,9	47,2	226,7	50,4 b
	TMXTP8*					278,4 d
TMXTP9 (G80)	175,7	0,9	45,0	232,0	0 a	
TOXLP6 (G81)	143,0	1,0	55,0	285,0	176 c	
TOxLP25*					0 a	
<b>Valência (G82)</b>	207,7	1,0	49,6	196,0	0 a	
TMXLV104A (G73)	161,0	0,9	46,9	253,0	3,6 a	
TMXLV117A (G74)	157,0	0,9	49,7	259,0	0 a	

<b>LARANJA</b>	<b>Pera (G11)</b>	190,0	1,1	50,0	214,0	0 a
	<b>T. Orlando (G13)</b>	140,0	1,1	52,0	291,0	828 f
	TCxLP 5*					0 a
	TCXLP10 (G15)	176,0	1,1	45,3	231,0	0 a
	TCXLP47 (G17)	132,0	1,1	57,8	309,0	0 a
	TCXLP62 (G20)	181,5	1,1	47,9	225,0	44,4 b
	TCXLP66 (G21)	190,5	1,1	47,8	214,0	0 a
	TCXLP69 (G22)	113,3	1,2	41,9	360,0	0 a
	TCXLP88 (G23)	100,0	1,0	46,0	408,0	0 a
	TMXLP105 (G24)	209,6	1,0	50,4	219,0	3,6 a
	TMXLP107 (G25)	170,0	0,9	31,5	236,0	0 a
	TMXLP110 (G26)	132,7	1,0	44,1	293,7	0 a
	TMXLP111 (G27)	165,0	1,0	51,1	281,0	14,4 a
	TMXLP112 (G28)	186,5	1,0	36,2	218,0	168 c
	TMXLP113 (G29)	130,0	1,0	47,4	314,0	265 c
	TMXLP116 (G30)	218,3	0,9	54,1	194,0	6 a
	TMXLP12 (G31)	154,9	1,0	44,8	273,3	312 d
	TMxLP13*					0 a
	TMXLP14 (G32)	142,5	0,9	44,0	313,3	0 a
	TMXLP5 (G67)	176,8	0,9	46,6	238,3	0 a
	TMXLP16*					0 a
	TMXLP23 (G47)	160,3	1,0	44,1	284,0	600 e
	TMXLP42 (G66)	165,1	1,0	46,2	250,3	14,4 a
	TMXLP50 (G68)	144,6	0,8	43,1	281,7	78,4 b
	TMXLP88 (G71)	151,6	1,0	50,4	266,7	0 a
	TMXLP97 (G72)	230,0	1,0	50,7	208,7	3,6 a
	TMXLP163 (G35)	148,5	1,0	50,0	279,3	0 a
	TMXLP170 (G36)	114,4	1,0	39,9	357,0	0 a
	TMXLP180 (G38)	194,7	1,0	46,1	227,0	103 b
	TMXLP188 (G39)	229,5	1,0	44,2	184,0	2,4 a
	TMXLP200 (G40)	141,0	1,0	54,6	289,0	0 a
	TMXLP202 (G41)	212,8	1,0	50,3	224,0	0 a
	TMXLP203C (G43)	152,5	1,0	44,8	263,3	31,6 b
	TMXLP225 (G46)	173,5	1,0	40,9	293,7	658 e
	TMXLP233 (G48)	97,1	1,0	42,2	383,0	140 c
TMXLP279 (G279)	157,0	0,9	41,5	259,0	0 a	
TMXLP285 (G55)	209,9	0,9	51,8	187,0	168 c	
TMXLP290 (G56)	208,2	0,9	47,4	217,3	540 e	
TMXLP324 (G59)	167,8	0,9	48,6	247,3	0 a	
TMXLP326 (G60)	175,3	0,9	44,2	240,7	0 a	
TMXLP338 (G62)	134,0	0,9	48,3	304,0	739 f	
TMXLP345 (G63)	137,0	0,9	42,0	297,0	148 c	
TMXLP354 (G64)	170,0	0,9	45,6	240,0	47,2 b	

\*Híbridos não avaliados para características físico-químicas. Os dados de qualidade dos genitores e testemunhas utilizados foram os padrões para as variedades conforme disponibilidade na literatura.



**Figura 11.** Dendrograma utilizando o método de agrupamento UPGMA e a distância Euclidiana com base nas médias das avaliações de 5 características morfológicas e químicas e valores de AACPD de 82 genótipos de citros (G1 a G82) com o fungo *Alternaria alternata*.

## 5 Conclusões

- A inoculação com *Alternaria alternata* em folhas destacadas e em plantas jovens foi eficiente para a avaliação de híbridos de citros quanto à resposta a mancha marrom de alternaria.

- De 79 híbridos avaliados foram selecionados cinco no grupo das mexericas, seis no grupo das tangerinas e 21 no grupo das laranjas resistentes a mancha marrom de alternaria.

- Foram selecionados três híbridos no grupo dos tangores com baixa severidade da mancha marrom de alternaria e, portanto, com potencial para substituição dos pomares de Murcott, altamente suscetível a doença.

- Não há relação da severidade a MMA e tipo/formato de frutos em citros.

## 6 Literatura citada

AKIMITSU, K.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus.

**Molecular Plant Pathology**, Sheffield, v.4, p.435-436, 2003.

AZEVEDO, F.A.D.; MARTELLI, I.B.; POLYDORO, D.A.; PACHECO, C.D.A.; SCHINOR, E. H.; BASTIANEL, M. Positive relationship between citrus leaf miner and alternaria brown spot. **Ciência Rural**, v.45, n.7, p.1160-1163, 2015.

AZEVEDO, F.A.; POLYDORO, D.A.; BASTIANEL, M.; KUPPER, K.C.; STUART, R.M.; COSTA, F.P.; PIO, R.M. Resposta de diferentes genótipos de tangerinas e seus híbridos à inoculação in vitro e in vivo de *Alternaria alternata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, p.1-10, 2010.

BASTIANEL, M. ; SIMONETTI, L.M. ; SCHINOR, E.H. ; GIORGI NETO, R.O.; De NEGRI, J. D.; GOMES, D.N.; AZEVEDO, F.A. Avaliação do banco de germoplasma de mexericas com relação às características físico-químicas e suscetibilidade à mancha marrom de alternária. **Bragantia**, v.73, p.23-31, 2014.

BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALY, M.; OLIVEIRA, A.C. de; FREITAS-ASTÚA, J.; GARCIA, A.A.F.; RESENDE, M.D.V. de; RODRIGUES, V.; MACHADO, M.A. Quantitative trait loci analysis of citrus leprosis resistance in an interspecific backcross family of (*Citrus*

- reticulata* Blanco × *C. sinensis* L. Osbeck) × *C. sinensis* L. Osb. **Euphytica**, v.169, p.101-111, 2009.
- BELLA, P.; GUARINO, C.; LA ROSA, R.; CATARA, A. Severe infections of *Alternaria* spp on a mandarin hybrid. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v.83. p.231, 2001.
- CANILHOS, Y; PEEVER, T.L., TIMMER, L.W. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of *Minneola* tangelo leaves by *Alternaria* spp. **Plant Disease**, v.83, p.429-433, 1999.
- CHUTIA, M.; BHUYAN, P.D.; PATHAK, M.G.; SARMA, T.C.; BORUAH, P. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **Food Science and Technology**, v.42: p. 777–780. 2009.
- CRISTOFANI, M.; NOVELLI, V.M.; PERIN, M.S.; OLIVEIRA, A.C.; OLIVEIRA, R.P.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A. Programa de melhoramento de citros via hibridação controlada no Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC no período de 1997 a 2005. **Laranja**, v.26, n.1, p.121-134, 2005.
- CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. Ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. **Euphytica**, v.109, p.25-32, 1999.
- CUENCA, J.; ALEZA, P.; VICENT, A.; BRUNEL, D.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Genetically based location from triploid populations and gene ontology of a 3-3-Mb genome region linked to alternaria brown spot resistance in Citrus reveal clusters of resistance genes. **PLoS One**. 2013 Oct 8; 8(10):e76755. doi: 10.1371/journal.pone.0076755. eCollection 2013.
- DALKILIC, Z.; TIMMER, L.W.; GMITTER, F.G. Linkage of an *Alternaria* disease resistance gene in mandarin hybrids with RAPD fragments. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.130, n.2, p.191-195, 2005.
- ELENA K. *Alternaria* Brown Spot of *Minneola* in Greece; Evaluation of Citrus Species Susceptibility. **European Journal of Plant Pathology**, v.115, n.2, p.259-262, 2006

- FAOSTAT. Top production: Tangerines, mandarins, clementines, satsumas 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em março de 2016.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- GARDNER, J.M.; KONO, Y.; CHANDLER, J.L. Biossay and host-selectivity of *Alternaria citri* toxins affecting rough lemon and mandarins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 29, p. 293-304, 1986.
- GULSEN, O.; UZUN, A.; CANAN, I.; SEDAY, U.; CANIHOS, E. A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers. **Euphytica**, v.173, n.2, p.265-277, 2010.
- HUANG, F.; FU, Y.; NIE, D.; STEWART, J.E.; PEEVER T.L.; LI, H. Identification of a novel phylogenetic lineage of *Alternaria alternata* causing citrus brown spot in China. **Fungal biology**, v.119, n.5, p. 320-330, 2015.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agrícola Municipal. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam>>. Acesso em março de 2016.
- KAKVAN, N.; ZAMANIZADE, H.; MORID, H.B.; HAJMANSOR, S.; TAERI, H. Evaluation of Citrus Cultivars Resistance to *Alternaria alternata*, the Causal Agent of Brown Spot Disease, Using RAPD-PCR. **Journal of Research in Agricultural Science**, v.8, n.1, p.69-76, 2012.
- KOHMOTO, K.; AKIMITSU, K.; OTANI, H. Correlation of resistance and suscetibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxins. **Phytopathology**, v.81, p.719-722, 1991.
- KOHMOTO, K.; ITO, H.Y.; SHIMOMURA, N.; KONDOH, Y.; OTANI, H.; KODAMA, M.; NISHIMURA, S.; NAKATSUKA, S. Isolation and biological activities of two host-specific toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, v.83, p.495-502, 1993.
- MARTELLI, I.B. Manejo de mancha marrom de alternaria em citros: poda de limpeza e correlação com lagarta minadora. Campinas – SP, 2011. 41fls. Dissertação (Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical). Instituto Agrônômico de Campinas, IAC.



- OLIVEIRA, A.C.; BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALY, M.; AMARAL, A.M.; MACHADO, M. A. Development of genetic map of citrus varieties Murcott tangor and pera sweet orange by using fluorescent AFLP markers. **Journal of Applied Genetics**, v.48, p.219-231, 2007.
- PACHECO, C.A.; MARTELLI, I.B.; POLYDORO, D.A.; SCHINOR, E.H.; PIO, R.M.; KUPPER, K.C., AZEVEDO, F.A. Resistance and susceptibility of mandarins and their hybrids to *Alternaria alternata*. **Scientia Agricola**, v.69, n.6, p.386-392, 2012.
- PEEVER, T.L.; CANILHOS, Y.; OLSEN, L.; IBÁÑEZ, A.; LIU, Y.C.; TIMMER, L.W. Population genetic structure and host specificity of *Alternaria spp* causing brown spot of Minneola tangelo and rough lemon in Florida. **Phytopathology**, v.89, p.851-860, 1999.
- PEEVER, T. L.; OLSEN, L.; IBÁÑEZ, A.; TIMMER, L. W. Genetic differentiation and host specificity among populations of *Alternaria spp.* causing brown spot of grapefruit and tangerine x grapefruit hybrids in Florida. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n.4, p. 407-414, 2000.
- PERES, N.A.R.; AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Outbreaks of *Alternaria* brown spot of citrus in Brazil and Argentina. **Plant Disease**, v.87, p.750, 2003.
- REED, J.B.; HENDRIX JR, C.M.; HENDRIX, D.L. **Quality control manual for citrus processing plants**. Safety Harbour: Intercit, v.1, 250p, 1986.
- REIS, R.F.; ALMEIDA, T.F.; STUCHI, E.S.; GOES, A. Susceptibility of citrus species to *Alternaria alternata*, the causal agent of the *Alternaria* brown spot. **Scientia Horticulturae**, Wageningen, v.113, p.336-342, 2007.
- ROHLF, F.J. NTSYSpc (Numerical Taxonomy and Mutivariate Analysis System). Version 2.2. Exeter Software. Applied Biostatistics Inc. New York. USA, 2005.
- SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effects of nitrogen fertilization on the expression of slowmildwing in knox wheat. **Phytopathology**, v.67, p.1051-1055, 1977.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, Berlin, v.11, n.1, p.30-40, 1962.
- SOLEIL, Z. & KIMCHI, M. Susceptibility and resistance of citrus genotypes to *Alternaria alternata* pv. *citri*. **Journal Phytopathology**, v.145, p.389-391, 1997.

- SOLEIL, Z. *Alternaria* brown spot on Minneola tangelos in Israel. **Plant Pathology**, v.40, p.145-147, 1991.
- SOUZA, M.C.; STUCHI, E.S.; GOES, A. Evaluation of tangerine hybrid resistance to *Alternaria alternata*. **Scientia Horticulturae**, v.123 (1), p.1-138, 2009.
- SPÓSITO, M.B.; FEICHTENBERGER, E.; PIO, R.M.; CASTRO, J.L.; RENAUD, M. S.A. Ocorrência de mancha marrom de *Alternaria* em diferentes genótipos de citros nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.231, 2003.
- STUART, R.M.; BASTIANEL, M.; AZEVEDO, F.A.; MACHADO, M.A. *Alternaria* Brown Spot. **Laranja**, v.30, n.1-2, p.29-44, 2009.
- SWART, S.H.; WINGFIELD, M.J.; SWART, W.J.; SCHUTTE, G.C. Brown spot of Minneola tangelo and efficacy of fungicidal sprays programmes for disease control in South Africa. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, South Africa, v.1, p.379-384, 1996.
- TIMMER, L.W.; PEEVER, T.L. *Alternaria* Brown Spot found on Sumburst and grapefruit. **Citrus Industry**, v.78, p.46, 1997.
- TIMMER, L.W.; SOLEIL, Z.; OROZCO-SANTOS, M. *Alternaria* Brown Spot of mandarines. In: TIMMER, L.H.; GARNSEY, S.M. GRAHAM, J.H. (Eds). **Compendium of Citrus Diseases** 2.ed. Minnesota: APS Press ST Paul, 2000. v.1, p.19-2000.
- TIMMER, L.W.; PEEVER, T.L.; SOLEIL, Z.; AZUYA, K.; KIMITSU, A. *Alternaria* diseases of citrus-novel pathosystems. **Phytopathologia Mediterranea**, v.42, p.99-112, 2003.
- TIMMER, L.W.; SOLEIL, Z.; OROZCO SANTOS, M. *Alternaria* brown spot of mandarin. In: TIMMER, L.W.; GANSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. (Ed.). **Compendium of citrus diseases**. 2nd ed. Minnesota: APS Press, 2000.
- VICENT, A.; ARMENGOL, J.; SALLES, R.; ALFARO-LASSALA, F.; GARCIA-JIMÉNEZ, J. First report of *Alternaria* Brown Spot of citrus in Spain. **Plant Disease**, St Paul, v.84, p.1044, 2000.
- YANG, S.L.; YU, P-L.; CHUNG, K-R. The glutathione peroxidase-mediated reactive oxygen species resistance, fungicide sensitivity and cell wall construction in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*. **Environmental microbiology**, v.18, n.3, p.923-935, 2016.

## **CAPÍTULO 2: Identificação de marcadores moleculares associados à resposta à mancha marrom de alternaria em híbridos de citros**

### **1 Resumo**

O Brasil destaca-se como o quarto maior produtor mundial de tangerinas. A maioria das variedades de tangerina e seus híbridos, com grande expressão na produção de frutos de mesa, são altamente suscetíveis à mancha marrom de alternaria (MMA), enquanto as variedades de laranjas doces são resistentes. Essa doença é causada pelo fungo *Alternaria alternata* patótipo tangerina, que afeta brotações novas, folhas e frutos, e é responsável por sérios danos à planta em diversas regiões citrícolas do mundo, comprometendo a produção. Por se tratar de uma espécie perene, o programa de melhoramento de citros é um processo demorado, devido ao longo período de juvenilidade, e prevê-se que a seleção assistida por marcadores (MAS) possa superar este obstáculo e melhorar a eficiência dos métodos de melhoramento convencional. Objetivou-se com este estudo mapear a região genômica associada à resistência a *Alternaria alternata*, através da avaliação de 52 indivíduos da população de tangor Murcott e laranja Pera utilizando um mapa genético integrado para esta população obtido anteriormente. Os resultados obtidos pelo mapeamento utilizando os valores de AACPD, sugerem a presença de um QTL (*Quantitative trait loci*), ou seja, uma região genômica associada à resistência a *A. alternata* no grupo de ligação 3. A alta herdabilidade observada e a distribuição em classes fenotípicas distintas (com e sem sintomas), corroboram com as análises de QTL, ou seja, de que possivelmente pelo menos um gene de grande efeito esteja envolvido. A região genômica associada à resistência a *A. alternata* no grupo de ligação 3 apresenta genes relacionados à resistência a doenças e foram obtidos a partir de marcadores moleculares provenientes do genitor laranja Pera. Possivelmente, as laranjas apresentam mecanismos diferentes da resistência encontrada nas tangerinas.

## 2 Introdução

O Brasil destaca-se como o quarto maior produtor mundial de tangerinas (FAOSTAT, 2016), atrás apenas da China, Espanha e Turquia, com uso para consumo *in natura*. Possui uma área produtora de 52 mil hectares e uma produção de 1 milhão de toneladas nas regiões Sudeste e Sul do país, principalmente nos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Rio Grande do Sul. A produção, em 2012, nestes estados totalizou o equivalente a 86% da produção nacional de tangerinas (IBGE, 2016).

O estado de São Paulo é o maior produtor de tangerinas, concentrando em maior volume as variedades Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) e tangor Murcott (*C. sinensis* L Osbeck x *C. reticulata* Blanco), seguido das mexericas (*C. deliciosa* Tenore) e tangerina Cravo (*C. reticulata* Blanco) (CASER; AMARO, 2006).

A maior parte da produção nacional de tangerinas se destina ao mercado interno de frutas frescas e representa uma importante atividade para pequenos e médios produtores. Entretanto poucas variedades são utilizadas comercialmente, sendo necessária a ampliação destas para diminuir os riscos fitossanitários da cultura. As principais variedades destinadas ao consumo *in natura* (tangerina Ponkan e tangor Murcott) são altamente suscetíveis ao fungo *Alternaria alternata*, que encontra condições favoráveis para dispersão em todas as regiões produtoras.

A mancha marrom de alternaria (MMA) é uma doença grave, cujos sintomas em genótipos suscetíveis são lesões necróticas nas frutas e folhas jovens, desfolha e queda de frutos (TIMMER et al., 2000), estando presente em várias regiões do mundo. No Brasil, a primeira constatação da doença afetando tangerinas foi em 2001 (GÓES et al., 2011), no Rio de Janeiro, estando hoje disseminada em vários estados.

A doença é causada pelo patótipo tangerina do fungo *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, que possui um *cluster* gênico (ACTT) localizado em um pequeno (<2,0 Mb) cromossomo e responsável pela biossíntese da ACT-toxina. A toxina é específica para tangerinas e seus híbridos, não afetando laranjas doces, limões e limas ácidas. Esta toxina específica ao hospedeiro é liberada durante a germinação dos conídios e afetam rapidamente a integridade da membrana plasmática das células hospedeiras suscetíveis (STUART et al., 2009). O patótipo tangerina de *Alternaria alternata* é um fungo patogênico necrotrófico e a toxina ACT é essencial para a patogênese fúngica.

Há evidências da presença de receptores de toxina em genótipos suscetíveis e de que a capacidade de tolerar o estresse oxidativo também é vital para a patogênese da *A. alternata* em citros (YU et al., 2016).

Estas toxinas secretadas por fungos necrotróficos podem ser consideradas como efetores e são detectadas por genes R em plantas suscetíveis, de modo a desencadear a resposta de hipersensibilidade e iniciar a morte celular. Este fenômeno é conhecido como suscetibilidade dominante (LIU et al., 2009). Um exemplo muito citado na literatura é o gene *LOV1*, que tem sido relacionado à suscetibilidade dominante de *Arabidopsis* para a toxina *victorin* produzida por *Cochliobolus victoriae* Nelson. O gene *Lov1* tem uma estrutura de NBS-LRR típica dos genes de resistência a doenças (SWEAT et al., 2008).

Aparentemente, em vez de evitar o reconhecimento, patógenos necrotróficos exploram os mecanismos de morte celular do hospedeiro para seu próprio ganho nutricional e subsequente sucesso do patógeno. Assim, as interações entre efetores necrotróficos e genes para a susceptibilidade da planta são chamadas de interações inversas da teoria do gene-a-gene (OLIVER; SOLOMON, 2010).

Em citros, tem sido relatado que a suscetibilidade a mancha marrom de alternaria é, provavelmente, de herança simples e dominante (DALKILIC et al., 2005; GULSEN et al., 2010; CUENCA et al., 2013). Assim, o alelo 'A' seria dominante para suscetibilidade e 'a' recessivo para a resistência à doença.

O patógeno esporula em tecidos afetados, e conídios são disseminados por correntes de ar e respingo de chuva. Temperaturas amenas e umidade prolongada na planta são necessárias para a infecção. O período de incubação é muito curto, e lesões são visíveis 1 ou 2 dias após o início da infecção, devido ao rápido efeito da ACT-toxina (TIMMER et al., 2003).

Atualmente, o controle da MMA baseia-se principalmente na aplicação de fungicidas. Dependendo do clima da região e a suscetibilidade da cultivar, até 25 pulverizações com fungicida por ano são necessárias para produzir frutas de qualidade para o mercado de produtos frescos. Apesar deste elevado número de pulverizações, o controle da doença nem sempre é satisfatório, e o cultivo de cultivares suscetíveis, diminuiu significativamente nos últimos anos (AZEVEDO et al., 2010; STUART et al., 2009).

A utilização de variedades resistentes é sem dúvida, dentre as estratégias de manejo, uma das alternativas mais desejáveis considerando a diminuição dos custos de produção e menor dano ao ambiente.

Quanto à resistência e suscetibilidade de genótipos de citros à mancha marrom de alternaria, merecem destaque pela alta suscetibilidade, variedades como as tangerinas Dancy, Ponkan, Sunburst (*C. reticulata* Blanco x *C. paradisi* Macf.) e o tangor Murcott. Quanto às variedades resistentes, constata-se as tangerinas Clementinas (*C. reticulata*), Satsumas (*C. unshiu* Marcovitch), os híbridos Fremont (*C. clementina* Hort. ex Tan. x *C. reticulata* Blanco) e Thomas (SOUZA et al., 2009; STUART et al., 2009, AZEVEDO et al., 2010; PACHECO et al., 2012). A maior parte das variedades de tangerina Clementina e seus híbridos, bem como tangerina Cleópatra, limas, limões, laranja Azeda e laranja doce são resistentes à doença.

A obtenção de genótipos portadores de resistência genética a patógenos em citros é uma alternativa diante ao combate aos problemas fitossanitários da cultura. O longo período juvenil, heterozigose, incompatibilidade gametofítica, esterilidade masculina, apomixia, frutos sem sementes, instabilidade das características sob diferentes condições ambientais e grandes áreas de campo necessárias para o cultivo populações de citros, impuseram grandes limitações no melhoramento de citros por métodos convencionais.

Várias técnicas de biologia molecular têm sido empregadas com o objetivo de superar esses obstáculos e melhorar a eficiência dos programas de melhoramento convencional. Entre elas, os marcadores de DNA têm sido utilizados para identificar embriões zigóticos e nucelares, em estudos de diversidade genética, construção de mapas genéticos e localização de marcadores associados à resistência a doenças visando à seleção assistida por marcadores (SAM).

Mais recentemente, novas tecnologias de sequenciamento (NGS-next generation sequencing) têm se mostrado ferramentas poderosas na geração de marcadores de DNA e identificação de novos polimorfismos (ELLEGRÉN, 2014). A plataforma DArT\_seq<sup>TM</sup> combina o uso de método de redução de complexidade do genoma da técnica DArT (*Diversity Arrays Technology*) com as novas tecnologias de sequenciamento proporcionando milhares de marcadores dominantes e um conjunto de SNPs co-dominantes (JACCOUD et al., 2001; CRUZ et al., 2013). Estes marcadores foram utilizados para construção de mapas genéticos em maçã (SCHOUTEN et al., 2012), banana (HIPPOLYTE et al., 2010), morango (SÁNCHEZ-

SEVILLA et al., 2015) e recentemente, mapa integrado em citros (CURTOLO et al., 2015).

Algumas importantes características e patossistemas foram estudados com base na localização de QTL (*Quantitative trait loci*) em citros, como por exemplo, resistência a nematóide (LING et al., 2000; WEBER et al., 2003), resistência à gomose de *Phytophthora* (SIVIERO et al., 2006), resistência ao *Citrus tristeza virus* (FANG et al., 1998; CRISTOFANI et al., 1999), resistência a *Xylella fastidiosa* (OLIVEIRA et al., 2004), resistência a *Citrus leprosis virus* (BASTIANEL et al., 2009), entre outros. GULSEN et al. (2009) avaliaram a segregação da mancha marrom de alternaria em uma população de 164 indivíduos obtidos entre Clementina (*C. reticulata*) x tangelo Orlando (*C. paradisi* x *C. reticulata*), observando uma segregação fenotípica de 1:1 para esta característica. Os autores encontraram um loco ligado a MMA no mapa de ligação de tangelo Orlando. Cuenca et al. (2013) analisaram locos de resistência à mancha marrom de alternaria, através do marcador SNP (*single nucleotide polymorphism*).

Na década de 90, foram realizadas hibridações controladas entre tangor Murcott x laranja Pera (TM x LP) (CRISTOFANI et al., 2005), com o objetivo de manter as características agrônômicas da laranja Pera, com genes de resistência presentes no tangor Murcott e vice versa, visando a obtenção de variedades de interesse comercial e com resistência a doenças.

Portanto, objetivou-se com este estudo mapear a região genômica associada à resistência a *Alternaria alternata* através da avaliação de 52 indivíduos da população de tangor Murcott e laranja Pera utilizando um mapa genético integrado para esta população obtido anteriormente (CURTOLO et al., 2015) visando à seleção assistida por marcadores (SAM).

### **3 Materiais e Métodos**

#### **3.1 Material vegetal**

Para realização do trabalho utilizou-se uma população de 52 indivíduos híbridos e seus genitores tangor Murcott (*Citrus reticulata* x *C. sinensis*) x laranja Pera (*C. sinensis*), obtida no ano de 1997, disponível para a avaliação em casa de vegetação, no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” do Instituto Agrônomo - IAC.

### 3.2 Isolado do fungo e preparo do inóculo

Os isolados de *Alternaria alternata* foram obtidos a partir de lesões típicas da doença (folhas e frutos) de tangor Murcott, altamente suscetível, coletados no campo em plantio estabelecido no Centro de Citricultura Sylvio Moreira-IAC em Cordeirópolis, SP, local onde ocorre o fungo de forma endêmica. Para a obtenção do isolado foi utilizada a metodologia descrita por Peever et al. (1999), com modificações (AZEVEDO et al., 2010). As lesões foram separadas e desinfestadas superficialmente por meio de lavagens (etanol 70%, hipoclorito 3% de cloro ativo e água destilada esterilizada) e incubadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (200 g batata, 20 g dextrose, 15 g agar L<sup>-1</sup>), acrescentando o fungicida carbendazin (640 mg L<sup>-1</sup> do i.a.) para excluir a proliferação de outros fungos oportunistas, sendo em seguida, mantidos em fotoperíodo de 12 horas, a 27 °C, por 48 horas em BOD.

Após período de incubação (48 horas), hifas características foram identificadas com o auxílio de microscópio óptico, sendo estas transferidas e incubadas nas mesmas condições do isolado inicial, durante período de cinco dias onde ocorreu a indução do crescimento micelial do fungo fitopatogênico. A obtenção do isolado do fungo, assim como os experimentos de inoculação foram conduzidos no laboratório de Melhoramento e Qualidade do fruto (MQF) do Centro de Citricultura, em Cordeirópolis, SP.

Foram transferidos 50 discos de micélio do fungo (5 mm de diâmetro) para placas de Petri contendo meio de esporulação (30 g de CaCO<sub>3</sub>, 20 g de sacarose e 20 g de ágar L<sup>-1</sup>), sendo estas incubadas em fotoperíodo de 12 horas, por quatro dias, em BOD, a 27 °C, conforme descrito por Canihos et al. (1999). Na sequência, com a ajuda de uma espátula estéril, os conídios foram retirados da superfície da placa, e ressuspensos em água destilada esterilizada. A suspensão de conídios foi filtrada em duas camadas de gazes esterilizadas, para a remoção dos fragmentos miceliais, sendo a concentração ajustada para 10<sup>5</sup> conídios mL<sup>-1</sup>, com auxílio de hemocitômetro.



### **3.3 Inoculação de *Alternaria alternata***

A inoculação com o fungo *Alternaria alternata* foi realizada em folhas destacadas (*in vitro*). O experimento de avaliação em folhas destacadas foi instalado em Câmara BOD, nas dependências do Laboratório MQF do Centro de Citricultura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada uma composta por uma placa de Petri contendo três folhas de cada genótipo. Folhas jovens de cada genótipo (2-3 cm de comprimento) foram coletadas de plantas desenvolvidas em vasos de 20 L e mantidas em casa de vegetação (Banco de Germoplasma de Citros). Em seguida, as folhas foram lavadas em água corrente e acondicionadas em placas de Petri, contendo uma camada de papel de filtro e uma pequena porção de algodão umedecido. A inoculação foi realizada com uma suspensão de esporos de *A. alternata* ( $10^5$  esporos mL<sup>-1</sup>), utilizando-se um borrifador manual (2 mL folha<sup>-1</sup>). As placas foram mantidas em BOD a 27 °C com fotoperíodo de 12 horas, por 3 dias.

### **3.4 Avaliação dos sintomas de mancha marrom de alternaria**

As avaliações da doença nas folhas destacadas foram realizadas após 24, 48 e 72 horas da inoculação do patógeno, de acordo com uma escala diagramática, descrita por Martelli (2011), representando os níveis de sintoma em dez notas devidamente ilustradas, onde “0” representa folha sem sintomas, e as notas de “1” a “9” representam 0,3; 3,5; 8; 15; 34; 61; 80; 90 e 97 por cento de área foliar tomada por sintomas de *Alternaria alternata*.

### **3.5 Análises estatísticas da severidade da doença**

As análises dos dados das avaliações de severidade da doença foram realizadas utilizando-se o *software* SISVAR 4.5 (FERREIRA, 2011). As médias foram transformadas em raiz quadrada ( $Y + 1,0$ ) e após a análise de variância, realizou-se a comparação de médias pelo teste Scott Knott à 5% de probabilidade. Para os dados de severidade no experimento em folhas destacadas, foi calculada a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) pelo método da integração trapezoidal (SHANER; FINNEY, 1977).

Foram calculados os parâmetros genéticos (herdabilidade, variância, coeficiente de variação) para a variável mensurada de acordo com uma escala diagramática, descrita por Martelli (2011), após 24, 48 e 72 horas da inoculação do patógeno, utilizando o aplicativo SELEGEN-REML/BLUP (RESENDE, 2002).

### **3.6 Associação entre marcadores e dados fenotípicos**

Para associação entre genótipo (marcadores DArT\_seq) e os dados fenotípicos das análises de AACPD de 52 indivíduos da população de tangor Murcott e laranja Pera, foi utilizado o programa FullSibQTL (GAZAFFI, et al, 2014), através da abordagem de mapeamento por intervalo composto (CIM), utilizando um mapa genético integrado para esta população obtido anteriormente (CURTOLO et al., 2015).

Todos os genes encontrados na região genômica entre os marcadores que flanqueavam a região associada à resposta à mancha marrom de alternaria foram alinhados com o genoma sequenciado de *Citrus sinensis* L. Osbeck disponível em (<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/index.php>). Esta posição foi considerada como uma coordenada para que fosse possível buscar os genes localizados dentro de cada intervalo e suas respectivas funções.

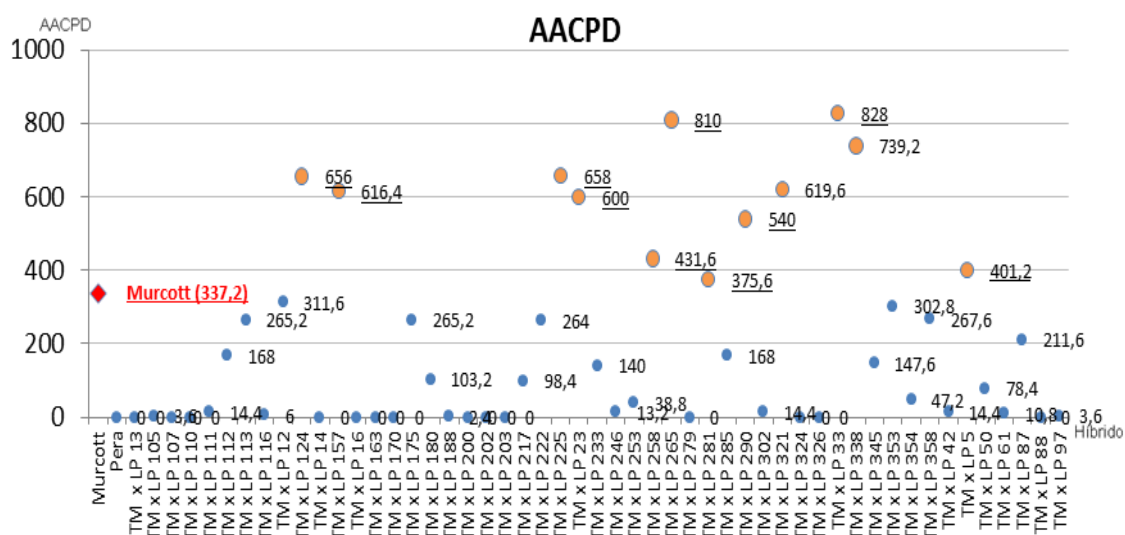
## **4 Resultados e Discussão**

### **4.1 Avaliação dos sintomas de mancha marrom de alternaria**

As avaliações em folhas destacadas, após 72 horas de inoculação com o fungo, resultaram em 14 híbridos assintomáticos e, portanto, resistentes a *A. alternata*, nove híbridos moderadamente suscetíveis, apresentando uma baixa porcentagem de área com lesões (área de lesão menor a 2%) não diferindo estatisticamente dos indivíduos resistentes e 29 suscetíveis (área de lesão maior a 7,1%), dentre os 52 híbridos da população de tangor Murcott e laranja Pera (dados não mostrados). Assim, a proporção de indivíduos resistentes para suscetíveis ficou em 23:29, que corresponde a segregação mendeliana de 1:1 ( $\chi^2 = 0,69$ ), confirmando o controle monogênico como estabelecido por Dalkilic et al. (2005) e Cuenca et al. (2013).

Vários estudos têm proposto que a herança da resistência a MMA em citros é controlada por um único alelo recessivo em homozigose (GULSEN et al., 2010; CUENCA et al., 2013). Recentemente, estudos conduzidos por Cuenca et al. (2013), com populações de triplóides, confirmam estes resultados e sugerem que o tangor Murcott seria heterozigoto. Assim é esperado que nas populações em que este genótipo foi utilizado como genitor haja segregação na progênie com híbridos suscetíveis e resistentes.

Nesta progênie se observa ainda que de acordo com as análises de área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD), 12 híbridos foram transgressivos quanto à suscetibilidade em relação ao genitor tangor Murcott (Figura 1), o genitor suscetível. Dezesete híbridos apresentaram resposta intermediária ao tangor Murcott de laranja Pera, o genitor resistente, e 23 não apresentaram sintomas ou uma baixa porcentagem de área com lesões. Os doze genótipos que, nas condições de avaliação deste trabalho, apresentaram maior severidade em relação ao genitor Murcott, não são indicados para plantios em regiões com alta incidência da doença, pois demandariam de um grande número de aplicação de fungicidas para controle do fungo e viabilidade de plantio.



**Figura 1.** Distribuição dos valores de AACPD em laranja Pera, tangor Murcott e híbridos.

A utilização de variedades resistentes é sem dúvida, dentre as estratégias de manejo, uma das alternativas mais desejáveis considerando sua compatibilidade com outras práticas de manejo e não ser prejudicial ao ambiente.

Uma vez que 52 híbridos  $F_1$  fazem parte da progênie do cruzamento TM x LP (tangor Murcott x laranja Pera), foi possível realizar a estimativa dos parâmetros genéticos (herdabilidade, variância, coeficiente de variação) para a variável mensurada (porcentagem de área foliar com sintoma da mancha marrom de alternaria) 24, 48 e 72 horas após a inoculação (Tabela 1).

Foram observados valores elevados de herdabilidade de parcelas individuais no sentido amplo ( $h^2_g$ ) de 0,69 a 0,96. Também foi observada variabilidade genotípica variando de 127,88 a 171,35, expressa pelo coeficiente de variação genotípica ( $CVg$ ).

As estimativas das variâncias genéticas entre as médias das progênies foram superiores às variâncias de ambiente para os tempos estudados. Elevados valores de herdabilidade e variabilidade genotípica indicam que a seleção de plantas resistentes na progênie pode ser realizada com sucesso, isto é, os híbridos apresentam variabilidade genética adequada para seleção.

**Tabela 1.** Parâmetros genéticos estimados com base em 52 híbridos  $F_1$  da progênie do cruzamento TM x LP (tangor Murcott x laranja Pera) após três tempos da inoculação com *Alternaria alternata*.

Parâmetros	24 h	48h	72h
<b>Genéticos</b>			
$h^2_g$	0,69 ± 0,19	0,96 ± 0,22	0,91 ± 0,22
$CVg$ (%)	171,35	143,49	127,88
$CVe$ (%)	114,72	26,15	39,88
Média Geral	0,78	3,72	7,60

**Legenda:**  $h^2_g$  herdabilidade de parcelas individuais no sentido amplo, ou seja, dos efeitos genotípicos;  $CVg$ (%): coeficiente de variação genotípica em porcentagem;  $CVe$ (%): coeficiente de variação ambiental em porcentagem; Média: média geral do experimento.

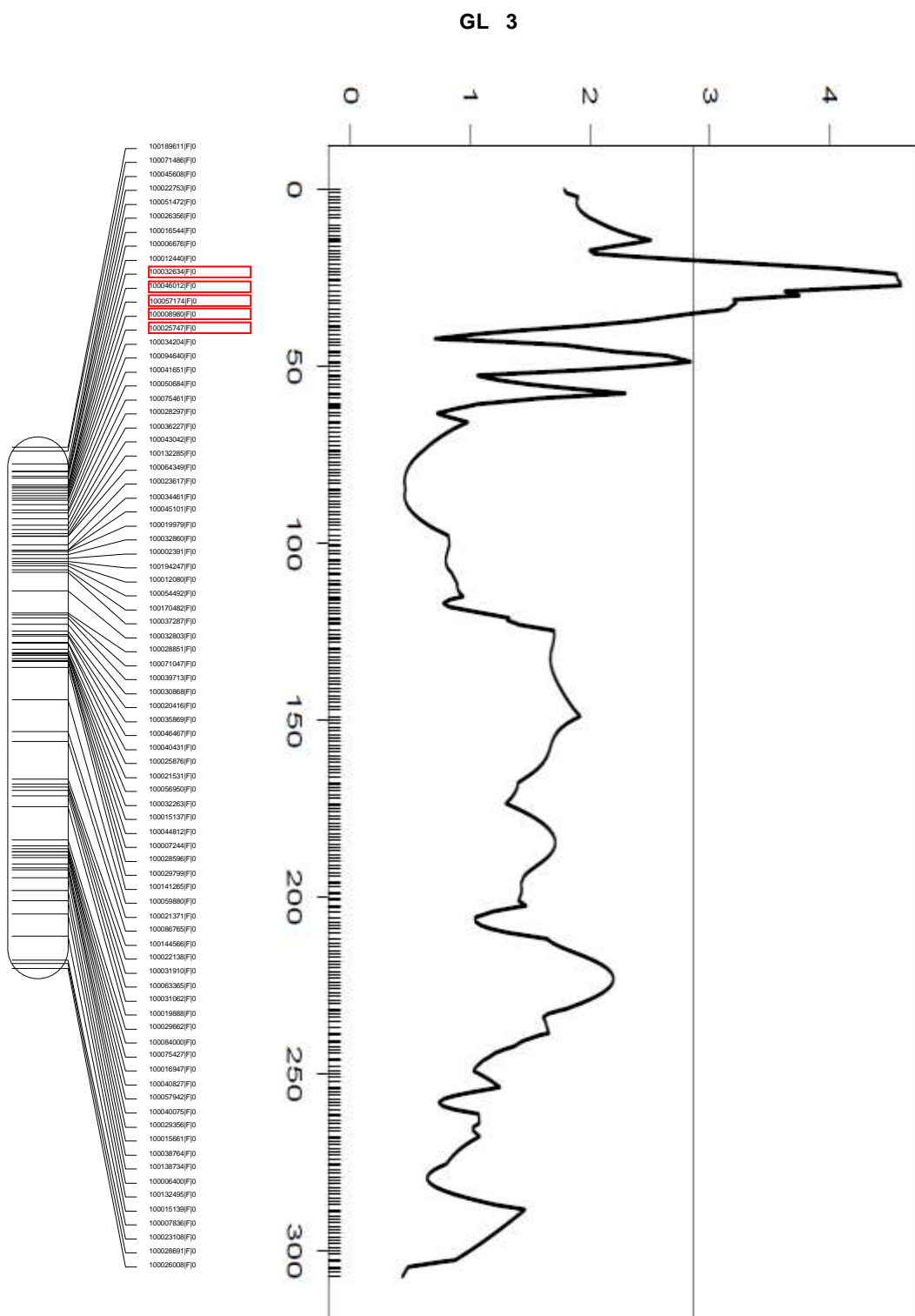
## 4.2 Identificação de marcadores moleculares associados à resposta à mancha marrom de alternaria

Cuenca et al. (2013) analisaram locos de resistência à mancha marrom de alternaria, através do marcador SNP e SSR. Entre os marcadores SNP com ligação significativa à resistência MMA, cinco mostraram a conformação alélica condizente com os genitores (heterozigotos em Fortune, genitor suscetível e homozigotos em Mexerica, genitor resistente). No presente trabalho, o marcador (100057174|F|0) no intervalo do QTL identificado foi heterozigoto para laranja Pera (Tabela 2). A análise indica que os genitores contribuíram igualmente para a variabilidade da característica, uma vez, que foi detectado um efeito significativo positivo para ambos os genitores, além do efeito de dominância.

**Tabela 2.** Identificação de marcadores moleculares associados à resposta à mancha marrom de alternaria no grupo de ligação (GL) 3 do mapa genético integrado de tangor Murcott e laranja Pera.

GL*	cM	Marcadores flanqueadores	LOD	p	LOD	q	LOD	pq	LOD	Seg.	R <sup>2</sup>
3	27,17	100057174 F 0	4,59	1,52	4,56	1,49	2,3	-1,01	7,23	1:1	0,94

\*G.L=grupo de ligação, cM= posição em *centimorgan* do QTL identificado, LOD=*LOD-score*, p= efeito para o genitor Murcott, q=efeito para o genitor laranja Pera, pq=efeito da interação dos genitores da população de mapeamento, Seg= segregação do QTL. R<sup>2</sup>= variação fenotípica explicada.



**Figura 2.** Grupo de ligação 3 do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera e a localização da região genômica associada à resistência a *Alternaria alternata*.

No presente estudo, os resultados obtidos pelo mapeamento utilizando os valores de AACPD, sugerem a presença de um QTL (*Quantitative trait loci*), ou seja, uma região genômica associada à resistência a *A. alternata* no grupo de ligação 3. A alta herdabilidade observada e a distribuição em classes fenotípicas distintas (com e sem sintomas), corroboram com as análises de QTL, ou seja, de que possivelmente pelo menos um gene de grande efeito esteja envolvido, embora, não exclua a possibilidade de outros genes, de efeito menor, possam estar envolvidos na herança da característica uma vez que observamos uma grande variação nos valores de AACPD (Figura 1) em relação aos genitores. Caracteres de alta herdabilidade apresentam controle genético mais simples, sendo provavelmente controlados por um menor número de genes, e assim, para esses caracteres existe uma maior probabilidade de detecção de QTLs (RESENDE, 2002).

Alguns trabalhos sugeriram que a herança genética para a suscetibilidade em citros para a mancha marrom de alternaria seria uma herança monogênica e dominante (DALKILIC et al., 2005; GULSEN et al., 2010; CUENCA et al., 2013), sendo o alelo 'A' dominante para suscetibilidade e 'a' recessivo para a resistência a doença. Assim, com base no que foi proposto por estes autores, a laranja doce teria o genótipo 'aa' e o tangor Murcott 'Aa'. Assim na população obtida entre os dois genitores seria esperada uma segregação mendeliana de 1:1 (Resistentes:Suscetíveis).

Em citros, mecanismos genéticos de heranças monogênicas foram relatados para a resistência ao nematóide *Tylenchulus semipenetrans* (LING et al. 2000) e para o vírus da tristeza dos citros [CTV-*Citrus tristeza virus* (CRISTOFANI et al., 1999)]. Para a leprose dos citros, um estudo, utilizando a mesma progênie de híbridos do presente trabalho, encontrou um único QTL que explicou 84% da variância fenotípica associado a marcadores AFLP provenientes do genitor resistente, tangor Murcott (BASTIANEL et al., 2009). Tal resultado corrobora com a hipótese de segregação monogênica para a resistência a mancha marrom de alterária.

A resistência aos patótipos de *Alternaria* de morango e Pera, que produzem toxinas estruturalmente análogas aos do patótipo tangerina, bem como a resistência ao patótipo da maçã, é controlada da mesma maneira, por um único alelo recessivo. Portanto, as cultivares resistentes são consideradas homozigotas recessivas para

este *locus*, enquanto cultivares suscetíveis podem ser heterozigotas ou homozigotas dominante.

Cuenca et al. (2013) analisaram locos de resistência à mancha marrom de alternaria, através do marcador SNP e SSR. Entre os marcadores SNP com ligação significativa à resistência MMA, cinco mostraram a conformação alélica condizente com os genitores (heterozigotos em Fortune, genitor suscetível e homozigotos em Mexerica, genitor resistente). No presente trabalho, o marcador 100046012|F|0 foi heterozigoto para tangor Murcott, os marcadores 100032634|F|0, 100057174|F|0 e 100008980|F|0 foram heterozigotos para laranja Pera e o marcador 100025747|F|0 estava presente em ambos os genitores. A análise indica que, de modo geral, os genitores contribuíram igualmente para a variabilidade da característica. A interação (pq= -1,01) aponta que os efeitos dos genitores (Tabela 2) estão em fase de repulsão.

#### **4.3 Conteúdo gênico na região genômica associada à resistência a *A. alternata***

No trabalho de Cuenca et al. (2013), na região definida pelos dois marcadores flanqueando o *locus* MMA, foram encontrados 33 genes homólogos a genes de resistência a doenças. Trinta destes genes codificam proteínas com um domínio central (NBS), 28 estão envolvidos em apoptose, e 29 têm um domínio C terminal em repetições ricas em leucina (LRR). Seis dos 30 NBS têm atividade transmembranar. Entre os genes de resistência identificados, 15 são homólogos ao gene *LOV1*, que tem sido relacionado à suscetibilidade dominante de *Arabidopsis* para a toxina *victorin* produzida por *Cochliobolus victoriae* Nelson. O gene *Lov1* tem uma estrutura de NBS-LRR típica dos genes de resistência a doenças. Outros três genes de resistência pertencem à família *MLO*, que conferem resistência de amplo espectro contra o patógeno de oídio da cevada.

No presente trabalho, as sequências dos marcadores DArT-seq<sup>TM</sup>, que flanquearam a região genômica associada à característica estudada, foram então posicionados na atual versão do genoma de referência de *Citrus* (<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/>) e suas coordenadas foram usadas para buscar os genes presentes no intervalo (Tabela 3).



**Tabela 3** - QTL detectado para a característica e os modelos gênicos preditos observados nos intervalos genômicos correspondentes na versão atual do genoma de referência de *Citrus sinensis*.

<b>Característica</b>	<b>GL</b>	<b>Gene</b>	<b>Função</b>
	3	orange1.1t05621	TMV resistance protein N; Probable WRKY transcription factor 16; Protein DA1-related 4; Putative disease resistance protein
		At4g11170	Protein SUPPRESSOR OF npr1-1, CONSTITUTIVE 1;TIR-NBS-LRR-TIR type disease resistance protein (Fragment)
		orange1.1t05622	Polyubiquitin 3; Polyubiquitin-B; Ubiquitin-60S ribosomal protein L40; Polyubiquitin-C; Polyubiquitin (Fragment); Polyubiquitin-A; Polyubiquitin-G; Polyubiquitin-D; Polyubiquitin-F; Polyubiquitin-H;Polyubiquitin containing 7 ubiquitin monomers
		orange1.1t05623	Putative uncharacterized protein Sb08g020230 Probable rRNA-processing protein EBP2 homolog
		orange1.1t05624	Beta-D-xylosidase 4; Beta-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase 2; Beta-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase 1 (Fragment); Probable beta-D-xylosidase 2; Probable exo-1,4-beta-xylosidase xlnD; Probable exo-1,4-beta-xylosidase bxIB; Putative beta-D-xylosidase (Fragment); Exo-1,4-beta-xylosidase bxIB; Exo-1,4-beta-xylosidase xlnD;Alpha-L-arabinofuranosidase/beta-D-xylosidase isoenzyme ARA-I
		orange1.1t02681	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1; Somatic embryogenesis receptor kinase 1; Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase
		orange1.1t02682	LL-diaminopimelate aminotransferase, chloroplastic; LL-diaminopimelate aminotransferase;LL-diaminopimelate aminotransferase diaminopimelate aminotransferase
		orange1.1t02683	F-box/kelch-repeat protein
		orange1.1t02684	Putative disease resistance protein RGA3; Disease resistance protein RGA2;
		orange1.1t04513	Putative uncharacterized protein Sb10g000700;60S ribosomal protein L9-1; 50S ribosomal protein L6P; 60S ribosomal protein L9 (Fragment)
		orange1.1t04514	Putative disease resistance protein RGA3; Disease resistance protein RGA2
		orange1.1t04515	Galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase; Fucosyltransferase 2; Probable fucosyltransferase 7; Putative fucosyltransferase 10;Galactoside 2-alpha-L-

---

	fucosyltransferase, putative
orange1.1t04275	Whole genome shotgun sequence assembly, scaffold_96, strain Mel28;Protein ELC-like; Protein ELC; Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 3; Tumor susceptibility gene 101 protein; ESCRT-I complex subunit tsg101;
orange1.1t04276	Suppressor protein STP22 of temperature-sensitive alpha-factor receptor and arginine permease
orange1.1t04277	Pentatricopeptide repeat-containing protein, putative;Pentatricopeptide repeat-containing protein
orange1.1t04278	Putative uncharacterized protein At4g02550/T10P11_16
orange1.1t02892	Putative uncharacterized protein OJ1008_C03.26-1;DNA-binding protein BIN4
orange1.1t02893	Putative uncharacterized protein Sb01g017460
orange1.1t02894	Putative uncharacterized protein OJ1653_D06.3;Probable ribonuclease P/MRP protein subunit POP5; Ribonucleases P/MRP protein subunit POP5

---

Neste trabalho, na região compreendida entre os marcadores 100032634|F| e 100025747|F|0 (Figura 2, Tabela 2) foram encontrados dois genes homólogos a genes de resistência a doenças. Um deles com uma estrutura de NBS-LRR típica dos genes de resistência a doenças. A terceira e maior classe de genes R é caracterizada por representantes que sintetizam proteínas que contêm domínios chamados Sítio de Ligação de Nucleotídeo (NBS; Nucleotide Binding Site) e Repetições Ricas em Leucina (LRR; Leucine Rich Repeats) (WAN et al., 2010).

O domínio LRR está envolvido no reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro durante o processo de infecção. O domínio LRR é encontrado em proteínas de resistência de plantas, que são responsáveis pela imunidade inata (R) da planta (GLOWACKI et al., 2011). Também foram encontrados genes homólogos a Brassinosteróides (BR), que é uma classe de fitormônios esteróides que desempenham um papel importante durante o crescimento e desenvolvimento da planta (WANG et al, 2014). Em *Arabidopsis*, o aumento dos níveis de BR resultou num aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO (CUI et al, 2011), demonstrando que podem também operar como moléculas de sinalização para induzir reações de resistência da planta.

As proteínas de repetição do pentatricopeptídeo (PPR) são codificadas no núcleo celular e modulam a expressão dos genes de organelas participando em vários aspectos do metabolismo do RNA de mitocôndrias e cloroplastos. Um trabalho em arroz revelou que o gene *WSL* codifica uma proteína PPR que tem como alvo os cloroplastos. O mutante *ws/* mostra maior sensibilidade à ABA, salinidade e acumula mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que o tipo selvagem (TAN et al., 2014).

A herança genética para resistência a MMA foi descrita como monogênica e controlada por um alelo recessivo (DALKILIC et al., 2005; GULSEN et al., 2010; CUENCA et al., 2013). Entretanto, poucos estudos têm sido conduzidos para avaliar a herança genética da doença nos citros e, até o momento, se desconhece algum trabalho desta natureza envolvendo populações obtidas entre tangerinas e laranjas. Sabe-se também que a toxina ACT, produzida por *A. alternata* é específica para uma determinada gama de hospedeiros (KOHMOTO et al., 1991; PEEVER et al., 1999), sendo algumas tangerinas e seus híbridos suscetíveis.

Através dos resultados obtidos pelo presente estudo, foi constatado um QTL no grupo de ligação 3 do mapa integrado de tangor Murcott e laranja Pera e que marcadores moleculares provenientes do genitor Pera estão associados à resistência a MMA. Possivelmente, a laranja apresenta genes de resistência a *Alternaria alternata*, com mecanismos diferentes da resistência encontrada nas tangerinas. Isto é, enquanto nas tangerinas a suscetibilidade é dominante, nas laranjas pode ser que a resistência seja dominante, pois foram encontrados marcadores em heterozigose na laranja Pera no *locus* relacionado com a resistência a *Alternaria alternata*. Entretanto, a população utilizada no presente estudo é pequena e novos estudos serão realizados aumentando o tamanho da população. A identificação do gene para a resistência MMA envolverá o mapeamento com a construção de mapas com alta densidade de marcadores e com populações diplóides maiores do que a que foi utilizada no presente estudo. Para os genótipos suscetíveis é provável que um maior número de genes possa estar envolvido, uma vez que foram observados diferentes níveis de suscetibilidade entre os híbridos de tangor Murcott e laranja Pera.

## 5 Conclusões

- Os resultados obtidos pelo mapeamento utilizando os valores de AACPD, sugerem a presença de um QTL (*Quantitative trait loci*), ou seja, uma região genômica associada à resistência a *A. alternata* no grupo de ligação 3. A alta herdabilidade observada e a distribuição em classes fenotípicas distintas (com e sem sintomas), corroboram com as análises de QTL, ou seja, de que possivelmente pelo menos um gene de grande efeito esteja envolvido, embora, não exclua a possibilidade de que outros genes, de efeito menor, possam estar envolvidos na herança da característica uma vez que observou-se uma grande variação nos valores de AACPD.
- A região genômica associada à resistência a *A. alternata* no grupo de ligação 3 apresenta genes relacionados à resistência a doenças e foram obtidos a partir de marcadores moleculares provenientes do genitor laranja Pera. Possivelmente, as laranjas apresentam mecanismos diferentes da resistência encontrada nas tangerinas.

## 6 Literatura citada

- AZEVEDO, F.A.; POLYDORO, D.A.; BASTIANEL, M.; KUPPER, K.C.; STUART, R.M.; COSTA, F.P.; PIO, R.M. Resposta de diferentes genótipos de tangerinas e seus híbridos à inoculação *in vitro* e *in vivo* de *Alternaria alternata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, p.1-10, 2010.
- BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALY, M.; OLIVEIRA, A.C. de; FREITAS-ASTÚA, J.; GARCIA, A.A.F.; RESENDE, M.D.V. de; RODRIGUES, V.; MACHADO, M.A. Quantitative trait loci analysis of citrus leprosis resistance in an interspecific backcross family of (*Citrus reticulata* Blanco × *C. sinensis* L. Osbeck) × *C. sinensis* L. Osb. **Euphytica**, v.169, p.101-111, 2009.
- CANILHOS, Y.; PEEVER, T.L., TIMMER, L.W. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of *Minneola* tangelo leaves by *Alternaria* spp. **Plant Disease**, v.83, p.429-433, 1999.
- CASER, D.V.; AMARO, A.A. **Tangerina: tendências no cultivo no Estado de São Paulo**. Análises e indicadores do Agronegócio. v.1, 3p., 2006.

- CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. Ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. **Euphytica**, v.109, p.25-32, 1999.
- CRISTOFANI, M.; NOVELLI, V.M.; PERIN, M.S.; OLIVEIRA, A.C.; OLIVEIRA, R.P.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A. Programa de melhoramento de citros via hibridação controlada no Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC no período de 1997 a 2005. **Laranja**, v.26, n.1, p.121-134, 2005.
- CRUZ, V.M.V.; KILIAN, A.; DIERIG, D. Development of DArT marker platforms and genetic diversity assessment of the U.S. collection of the new oilseed crop *Lesquerella* and related species. **PLoS One** 8:e64062. doi: 10.1371/journal.pone.0064062, 2013.
- CUENCA, J.; ALEZA, P.; VICENT, A.; BRUNEL, D.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Genetically based location from triploid populations and gene ontology of a 3-3-Mb genome region linked to alternaria brown spot resistance in Citrus reveal clusters of resistance genes. **PLoS One**. 2013 Oct 8;8(10):e76755. doi: 10.1371/journal.pone.0076755. eCollection 2013.
- CUI, J.X.; ZHOU, Y.H.; DING, J.G.; XIA XJ, SHI K, CHEN SC, ASAMI T, CHEN Z, YU JQ. Role of nitric oxide in hydrogen peroxide-dependent induction of abiotic stress tolerance by brassinosteroids in cucumber. **Plant Cell Environment**, v. 34, p.347–358, 2011.
- CURTOLO, M.; CRISTOFANI-YALY, M.; TAKITA, M.A.; GAZAFFI, R.; FIGUEIRA, A.V.O.; MACHADO, M.A. Linkage maps partially integrated of Murcott tangor and Pera sweet orange using DArT\_seq<sup>TM</sup> markers. 11th International Congress of Plant Molecular Biology, Foz do Iguaçu, Brasil, outubro, 2015
- DALKILIC, Z.; TIMMER, L.W.; GMITTER, F.G. Linkage of an Alternaria disease resistance gene in mandarin hybrids with RAPD fragments. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.130, n.2, p.191-195, 2005.
- ELEGREN, H. Genome sequencing and population genomics in non-model organisms. **Trends in ecology & evolution**, 29:51-63, 2014.
- FANG, D. Q.; FEDERICI, C. T.; ROOSE, M. L. A High-Resolution Linkage Map of the Citrus Tristeza Virus Resistance Gene Region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Genetics**, n. 150, p. 883–890, 1998.

- FAOSTAT. Top production: Tangerines, mandarins, clementines, satsumas 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em março de 2016.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- GAZAFFI, R.; MARGARIDO, G.R.A.; PASTINA, M.M.; MOLLINARI, M.; GARCIA, A.A.F. Garcia A model for quantitative trait loci mapping, linkage phase, and segregation pattern estimation for a full-sib progeny. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 10, p. 791–801, 2014.
- GLOWACKI, S.; MACIOSZEK, V.K.; KONONOWICZ, A. R. Proteins as fundamentals of plant innate immunity. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Poland, v. 16, p. 1-24, 2011.
- GOES, A.; MONTES de OCA, A.G.; REIS, R.F. Ocorrência de la mancha de *Alternaria* em mandarina “Dancy” en el estado de Rio de Janeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.26 (suplemento), p. 386, 2001.
- GULSEN, O.; UZUN, A.; CANAN, I.; SEDAY, U.; CANIHOS, E. A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers. **Euphytica**, v.173, n.2, p.265-277, 2010.
- HIPPOLYTE, I.; BAKRY, F.; SEGUIN, M.; GARDES, L.; RIVALLAN, R.; RISTERUCCI, A.M.; JENNY, C.; PERRIER, X.; CARREEL, F.; ARGOUT, X.; PIFFANELLI, P.; KHAN, I.; MILLER, R.N.; PAPPAS, G.J.; MBEGUIE-A-MBEGUIE, D.; MATSUMOTO, T.; DE BERNARDINIS, V.; HUTTNER, E.; KILIAN, A.; BAURENS, F.C.; D'HONT, A.; COTE, F.; COURTOIS, B.; GLASZMANN, J.C. A saturated SSR/DArT linkage map of *Musa acuminata* addressing genome rearrangements among bananas. **BMC Plant Biology**, v.10, p.65, 2010.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agrícola Municipal. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam>>. Acesso em março de 2016.
- KOHMOTO, K.; AKIMITSU, K.; OTANI, H. Correlation of resistance and susceptibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxins. **Phytopathology**, v.81, p.719-722, 1991.

- KORBIN, M.U. Molecular approaches to disease resistance in *Fragaria* spp. **Journal of Plant Protection Research** vol. 51, no. 1 (2011) Skierniewice, Poland.
- LING, P.; DUNCAN, L.W.; DENG, Z.; DUNN, D.; HU, X.; HUANG, S.; GMITTER, F.G. Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. **Theoretical Applied Genetic**, v.00, p.1010–1017, 2000.
- LIU, Z., FARIS, J. D., OLIVER, R. P., TAN, K. C., SOLOMON, P. S., MCDONALD, M. C., FRIESEN, T. L. SnTox3 acts in effector triggered susceptibility to induce disease on wheat carrying the Snn3 gene. **PLoS Pathogens**, 5(9), e1000581. 2009.
- MARTELLI, I.B. Manejo de mancha marrom de alternaria em citros: poda de limpeza e correlação com lagarta minadora. Campinas – SP, 2011. 41fls. Dissertação (Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical). Instituto Agronômico de Campinas, IAC.
- OLIVEIRA, A.C.; BASTIANEL, M.; MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C.; GOLDMAN, G.H.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Mapeamento genético para resistência à *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, Cordeirópolis, v.25, n.2, p.427-438, 2004.
- OLIVER, R.P.; SOLOMON, P.S. New developments in pathogenicity and virulence of necrotrophs. **Current Opinion in Plant Biology** 13: 415–419, 2010.
- PACHECO, C.A.; MARTELLI, I.B.; POLYDORO, D.A.; SCHINOR, E.H.; PIO, R.M.; KUPPER, K.C., AZEVEDO, F.A. Resistance and susceptibility of mandarins and their hybrids to *Alternaria alternata*. **Scientia Agricola**, v.69, n.6, p.386-392, 2012.
- PEEVER, T.L.; CANILHOS, Y.; OLSEN, L.; IBÁÑEZ, A.; LIU, Y.C.; TIMMER, L.W. Population genetic structure and host specificity of *Alternaria spp* causing brown spot of Minneola tangelo and rough lemon in Florida. **Phytopathology**, v.89, p.851-860, 1999.
- RESENDE, M.D.V. Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes. Brasília, DF: Embrapa **Informação Tecnológica**, 2002. 975 p.
- SÁNCHEZ-SEVILLA, J.F.; HORVATH, A.; BOTELLA, M.A.; GASTON, A.; FOLTA, K.; KILIAN, A.; et al. Diversity Arrays Technology (DArT) Marker Platforms for Diversity Analysis and Linkage Mapping in a Complex Crop, the Octoploid

- Cultivated Strawberry (*Fragaria × ananassa*). **PLoS ONE** 10(12): e0144960.doi:10.1371/journal.pone.0144960, 2015.
- SCHOUTEN, H.J.; WEG, W.E.; CARLING, J.; KHAN, S.A.; MCKAY, S.J.; KAAUWEN, M.P.W.; et al. Diversity arrays technology (DART) markers in apple for genetic linkage maps. **Molecular Breeding**, v. 29, p. 645–660, 2012.
- SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effects of nitrogen fertilization on the expression of slowmildwing in knox wheat. **Phytopathology**, v.67, p.1051-1055, 1977.
- SIVIERO, A.; CRISTOFANI, M.; FURTADO, E. L.; GARCIA, A. A. F.; COELHO, A. S. G.; MACHADO, M. A., Identification of QTLs associated with citrus resistance to *Phytophthora* gummosis. **Journal of Applied Genetics**, v. 47, n. 1, p. 23–28, 2006.
- SOUZA, M.C.; STUCHI, E.S.; GOES, A. Evaluation of tangerine hybrid resistance to *Alternaria alternata*. **Scientia Horticulturae**, v.123 (1), p.1-138, 2009.
- STUART, R.M.; BASTIANEL, M.; AZEVEDO, F.A.; MACHADO, M.A. *Alternaria* Brown Spot. **Laranja**, v.30, n.1-2, p.29-44, 2009.
- SWEAT, T.A.; LORANG, J.M.; BAKKER, E.G; WOLPERT, T.J. Characterization of natural and induced variation in the LOV1 gene, a CC-NBLRR gene conferring victorin sensitivity and disease susceptibility in Arabidopsis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, p.7-19, 2008
- TAN, J.; TAN, Z.; WU, F.; SHENG, P.; HENG, Y.; WANG, X.; REN, Y.; WANG, J.; GUO, X.; ZHANG, X.; CHENG, Z.; JIANG, L.; LIU, X.; WANG, H.; WAN, J.A. Novel Chloroplast-Localized Pentatricopeptide Repeat Protein Involved in Splicing Affects Chloroplast Development and Abiotic Stress Response in Rice. **Molecular Plant**, v. 7, p.1329–1349, 2014.
- TIMMER, L.W.; SOLEIL, Z.; OROZCO-SANTOS, M. *Alternaria* Brown Spot of mandarines. In: TIMMER, L.H.; GARNSEY, S.M. GRAHAM, J.H. (Eds). **Compendium of Citrus Diseases** 2.ed. Minnesota: APS Press ST Paul, 2000. v.1, p.19-2000.
- WAN, H.; ZHAO, Z.; MALIK, A.A.; QIAN, C.; CHEN, J. Identification and characterization of potential NBS-encoding resistance genes and induction kinetics of a putative candidate gene associated with downy mildew resistance in Cucumis. **BMC Plant Biology**, v.10, p.186-198, 2010.



WANG, X.; JIANG, N.; LIU, J.; LIU, W.; WANG, G.L. The role of effectors and host immunity in plant–necrotrophic fungal interactions. **Virulence**, v. 5, n.7, p. 722–732; 2014.

YANG, S.L.; YU, P-L.; CHUNG, K-R. The glutathione peroxidase-mediated reactive oxygen species resistance, fungicide sensitivity and cell wall construction in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*. **Environmental microbiology**, v.18, n.3, p.923-935, 2016.

YU, P.L.; CHEN, L.H.; CHUNG, K.R. How the pathogenic fungus *Alternaria alternata* copes with stress via the response regulators SSK1 and SHO1. **PLoS ONE** 11(2): e0149153. doi:10.1371/ journal.pone.0149153, 2016.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho possibilitou a seleção de novos híbridos resistentes a inoculação com *Alternaria alternata* em folhas destacadas e plantas. Estes híbridos foram obtidos e pré-selecionados no Programa de Melhoramento de Citros do Centro APTA Citros Sylvio Moreira do Instituto Agronômico de Campinas, através de cruzamentos com diferentes genitores, entre eles o tangor Murcott e o tangelo Orlando, altamente suscetíveis a doença. Entre os genótipos previamente selecionados pelas características de frutos, mais de 30 se mostraram resistentes ao fungo e podem se constituir em novas variedades comerciais tanto para o mercado de fruta fresca quanto para a indústria de suco.

A avaliação genética conduzida na população de tangor Murcott x laranja Pera mostrou que a resistência à mancha marrom de alternaria tem alta herdabilidade genética, é possivelmente de herança monogênica e, portanto, pode ser facilmente transferida para as progênies. Com base nestas informações, novos cruzamentos com genitores que segregam para esta característica podem ser idealizados dentro do Programa de Melhoramento com o intuito de se obter novas variedades resistentes a *A. alternata*.

Este trabalho foi apenas mais uma etapa de seleção no Programa de Melhoramento, sendo que a próxima etapa será a de avaliação destes materiais selecionados em campo e avaliação de características agronômicas de interesse

comercial, como produção, produtividade e época de produção de seus frutos. A seleção precoce de materiais para as principais doenças da citricultura, assim como a mancha marrom de alternaria, é de extrema importância, principalmente para plantas perenes e de longo ciclo vegetativo, assim como os citros. Assim para a próxima etapa de seleção no campo, apenas os híbridos selecionados para a MMA serão avaliados, diminuindo o número de plantas e os custos de produção.