



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

**MAPEAMENTO DE QTLs ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A
Alternaria alternata EM HÍBRIDOS DE CITROS**

KELLY APARECIDA FERNANDES DE CAMPOS

**Araras
2016**



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

**MAPEAMENTO DE QTLs ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A
Alternaria alternata EM HÍBRIDOS DE CITROS**

KELLY APARECIDA FERNANDES DE CAMPOS

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)

C198m Campos, Kelly Aparecida Fernandes de
Mapeamento de qtls associados à resistência a
Alternaria alternata em híbridos de citros / Kelly
Aparecida Fernandes de Campos. -- São Carlos :
UFSCar, 2016.
57 p.

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

1. Citros . 2. Tangerina. 3. Laranja. 4. Mancha
marrom de alternaria. I. Título.



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Kelly Aparecida Fernandes de Campos, realizada em 29/08/2016:

Prof. Dra. Mariângela Cristofani-Yaly
IAC

Prof. Dra. Valdenice Moreira Novelli
IAC

Prof. Dr. Evandro Henrique Schinor
UFSCar

Dedico à minha filha Samanta Pandora, pela ausência na primeira infância para realização deste trabalho acadêmico, a Rodolfo pelo companheirismo, paciência, além de seu apoio...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me capacitar e permitir a realização deste trabalho, aos meus pais Maria Elisa e Waldomiro Jr., pelo cuidado e apoio incondicional dedicado a mim, aos meus irmãos Karina e Kevin pelo incentivo.

À Universidade Federal de São Carlos, ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À Profa. Dra. Mariângela Cristofani Yaly, pela excelente orientação, confiança e oportunidade, que se fizeram de extrema importância na minha vida.

À Profa. Dra. Marinês Bastianel, por aceitar a co-orientação e apoiar este projeto, auxiliando sempre com conselhos valiosos, na condução da experimentação.

A Maiara Curtolo pela colaboração na construção de mapa genético e localização de QTLs.

A todos os amigos e funcionários do Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo (IAC) que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1 Mancha marrom de alternária.....	5
3.1.1 Histórico da doença.....	5
3.1.2 Agente causal	6
3.1.3 Interação planta x patógeno	6
3.1.4 Sintomatologia.....	7
3.1.5 Resistência de plantas cítricas.....	8
3.1.6 Controle da doença.....	8
3.2 Melhoramento de citros.....	9
3.3 Mapeamento genético e localização de QTLs.....	11
3.3.1 Mapas genéticos em citros.....	11
3.3.2 Mapeamento de QTLs e seleção assistida por marcadores.....	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 Material vegetal	16
4.2 Fenotipagem para resistência de <i>Alternaria</i> <i>alternata</i> f. sp <i>citri</i>	17
4.2.1 Isolamento e cultura de <i>A. alternata</i>	17
4.2.2 Inoculação <i>in vitro</i> e avaliações de sintomas.....	18
4.2.3 Análise estatística.....	20
4.3 Mapeamento genético.....	20
4.3.1 Extração de DNA.....	20
4.3.2 Desenvolvimento dos marcadores DArT_seq.....	21
4.3.3 Marcadores Moleculares SSRs.....	22
4.3.4 Avaliação de segregação.....	22
4.3.5 Mapa e comparação com o genoma de referência	23
4.3.6 Mapeamento de QTLs.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 Avaliação da resistência a <i>A. alternata in vitro</i> em folhas destacadas.....	24
5.2 Construção do mapa de ligação integrado e Mapeamento de QTLs.....	31
5.3 Genes encontrados na região genômica associada à resistência a <i>A. alternata</i>	38
6. CONCLUSÕES.....	40
7. LITERATURA CITADA.....	41

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Severidade (%) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliadas após inoculação de <i>A. alternata</i> em híbridos, seus genitores e variedades de citros.....	25
Tabela 2. Número de marcadores e comprimento dos nove grupos de ligação do mapa integrado de LPA vs H163 de acordo com a segregação mendeliana.....	32
Tabela 3. Parâmetros genéticos estimados com base em valores de AACPD de 235 híbridos F ₁ da progênie do cruzamento laranja Pera de Abril x H163.....	36
Tabela 4. QTLs associados com resistência a MMA, por análise de mapeamento por intervalo composto na progênie LPA vs H163.....	37
Tabela 5 - Grupos de ligação em que foram detectados QTLs, genes encontrados nos intervalos genômicos correspondentes na versão atual do genoma de referência de <i>Citrus sinensis</i> e suas funções.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. H163, híbrido resultante de cruzamento de tangor Murcott (<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>) x <i>C. sinensis</i>	16
Figura 2. Conídios e hifas de <i>A. alternata</i> f. sp <i>citri</i>	18
Figura 3. Escala diagramática usada, para determinar a porcentagem de área foliar, com sintoma de MMA (MARTELLI, 2011).....	19
Figura 4. Folhas dos híbridos avaliados mostrando lesões típicas causadas por <i>A. alternaria</i> , em 24 horas após a inoculação. A - Dancy (Suscetível - S), B - Murcott (S), C - Fremont (Resistente - R), D - PAX163 85 (R), E - PAX163 67 (S), F- PAX163 131 (S). Em 48 horas, G - Dancy, H - Murcott, I - Fremont, J - PAX163 37 (S), K - PAX163 69 (S) e L, PAX163 269 (R). Em 72 horas, M - Dancy, N - Murcott, O - Fremont, P - PAX163 67 (S), Q - PAX163 268 (S) e R - PAX163 80 (R).....	28
Figura 5. Histograma de frequência de distribuição de médias da AACPD de 235 híbridos e seus genitores.....	29
Figura 6. Mapa de ligação gênica integrado de LPA vs H163. Em preto marcadores D1 (configuração ao x oo) – marcadores informativos para H163, em vermelho marcadores D2 (configuração oo x ao) marcadores informativos para o genitor LPA, em verde marcadores C informativos para ambos genitores com segregação 3:1 (configuração ao x ao).....	33
Figura 7. Comparação entre os nove grupos de ligação do mapa integrado de LPA vs H163, com o genoma de <i>C. sinensis</i> (<i>Chr</i>).....	35
Figura 8 - QTLs associados à resistência <i>A. alternata</i> , eixo Y: valor de <i>LOD Score</i> ; eixo X: grupos de ligação (GL). Linha horizontal: valor de <i>LOD Score</i> definido.....	38

MAPEAMENTO DE QTLs ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A *Alternaria alternata* EM HÍBRIDOS DE CITROS

Autora: KELLY APARECIDA FERNANDES DE CAMPOS

Orientadora: Profa. Dra. MARIÂNGELA CRISTOFANI YALY

Co-orientadora: Profa. Dra. MARINÊS BASTIANEL

RESUMO

A mancha marrom de alternaria (MMA) é uma doença causada por um fungo do gênero *Alternaria*, que causa lesões e depreciação em frutos de tangerinas, quedas de folhas, seca de ponteiros e de brotações novas. A ação do fungo *Alternaria alternata* f. sp. *citri* está diretamente associada à presença de receptores de toxinas em genótipos suscetíveis. Os objetivos do presente estudo foram: (1) caracterizar o fenótipo de 264 híbridos de citros obtidos do cruzamento de LPA (laranja Pera de Abril) (*Citrus sinensis* L. Osbeck) vs o H163, híbrido de tangor Murcott (*C. reticulata* x *C. sinensis*) x laranja Pera (*C. sinensis*), quanto à resposta à *A. alternata* e (2) construir um mapa de ligação integrado utilizando marcadores moleculares DArT_seq e localizar QTLs (*Quantitative trait loci*) associados à resistência à doença. A partir de lesões de tangor Murcott, com sintomas de MMA, foi obtido um isolado do fungo e foram avaliados 235 híbridos após inoculação de suspensão de conídios em folhas jovens destacadas (*in vitro*). Após 72 horas de inoculação, setenta híbridos (30%) apresentaram diferentes níveis de sintomas da doença e 165 (70%) dos indivíduos foram assintomáticos. O mapa de ligação integrado, construído com o programa *OneMap*, resultou em 726 marcadores DArT_seqTM e três SSR cobrindo 9 grupos de ligação, correspondendo ao número haplóide de cromossomos da espécie. Os sete QTLs (*Quantitative trait Loci*) localizados, associados à resistência a *A. alternata*, foram oriundos de utilização de valores de BLUP (*Best Linear Unbiased Prediction*), obtidos a partir da AACPD (Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença). O mapa de ligação gênica integrado de LPA vs H163 apresenta alto grau de sintenia com os pseudo-cromossomos de laranja doce (*C. sinensis*).

Palavras-chave: Citros, Tangerina, Laranja, Mancha marrom de alternaria.

QTL MAPPING ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO *Alternaria alternata* IN CITRUS HYBRIDS

Author: KELLY APARECIDA FERNANDES DE CAMPO

Adviser: Profa. Dra. MARIANGELA CRISTOFANI-YALY

Co-adviser: Profa. Dra. MARINES BASTIANEL

ABSTRACT

Alternaria brown spot (ABS) disease is caused by a fungus of *Alternaria* genus, that causes injury and fruit depreciation, leaves fall, drought of pointers and new shoots. The action of the fungus *Alternaria alternata* f. sp. *citri* is directly associated by the presence of toxin receptors on susceptible genotypes. The objectives of this study were: (1) to characterize the phenotype of 264 citrus hybrids obtained from crossing LPA Pera de Abril sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) vs H163, a hybrid between Murcott tangor (*C. reticulata* x *C. sinensis*) x Pera sweet orange (*C. sinensis*), for response to *A. alternata*, via conidia suspension inoculation of detached young leaves (*in vitro*) and (2) construction of a linkage map using DArT_seq markers to identify possible QTL (Quantitative Trait Loci) associated to disease resistance. The fungus was isolated from lesions of Murcott tangor fruits with ABS symptoms and inoculated via conidia suspension on detached young leaves (*in vitro*). Two hundred and thirty five hybrids were evaluated and 70 (30%) showed different levels of disease symptoms after 72 hours of inoculation with the fungus on detached leaves and 165 (70%) were asymptomatic. The integrated linkage map, built with OneMap program, resulted in 726 DArT_seqTM and three SSR molecular markers that covered nine linkage groups, corresponding to the haploid number of chromosomes of the specie. Using the values of AUDPC, seven QTLs associated with resistance to ABS were localized in linkage groups of the integrated map. The integrated linkage map of Pera de Abril sweet orange (LPA) vs. H163 has a high degree of synteny with pseudo-chromosomes of sweet orange (*C. sinensis*).

Keywords: Citrus, Mandarin, Orange, *Alternaria* brown spot

1 INTRODUÇÃO

A citricultura é uma importante cadeia produtiva do agronegócio brasileiro, em termos econômicos e sociais. Em 2013, a produção mundial de citros situou-se em 136,3 milhões de toneladas, sendo a China (24,4%), Brasil (14,4%) e USA (7,4%) os principais produtores. O Brasil (24,5%) é o maior produtor de laranja, vindo a seguir os EUA (10,5%) e a China (10,4%), enquanto que em tangerinas o grande destaque na produção é a China (53,5%) seguindo-se, com parcelas muito inferiores, a Espanha (7,6%) e o Brasil (3,2%) (FAO, 2016).

Vários fatores influenciam na produtividade de citros, por exemplo, as condições edafoclimáticas desfavoráveis, o manejo inadequado, as pragas e as doenças podem ocasionar uma redução significativa na produtividade dos pomares citrícolas. As principais doenças que afetam a citricultura brasileira incluem a tristeza (CTV, *Citrus tristeza virus*) (MÜLLER; COSTA, 1993), o cancro cítrico (ROSSETTI, 1981), a clorose variegada dos citros (CVC) (DE NEGRI, 1990), a leprose (BITANCOURT, 1955) e o huanglongbing (HLB ou *Greening*) (COLETTA FILHO et al., 2004). Em especial para as tangerinas, destaca-se a mancha marrom de alternaria (MMA), por afetar as principais variedades comerciais no país, a tangerina Ponkan (*C. reticulata* Blanco) e o tangor Murcott (*C. reticulata* x *C. sinensis*) (AZEVEDO et al., 2010, 2015).

A MMA tem principal ocorrência em regiões semiáridas, úmidas ou locais com períodos de chuvas frequentes (BASSIMBA et al., 2014), como os encontrados no estado de São Paulo. A principal forma de disseminação da MMA se dá pela produção de conídios (esporos assexuais) do fungo, que quando germinam produzem toxinas específicas ao hospedeiro (*host-specific toxin-HST*) (TSUGE et al., 2013).

O número de variedades utilizadas nos pomares comerciais ainda é muito restrito, acarretando em grandes riscos fitossanitários a citricultura, embora seja grande o número de variedades e clones de plantas cítricas em Bancos Ativos de Germoplasma (BAG). No Brasil destacam-se o BAG do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), com mais de 1700 acessos de citros além de outras espécies relacionadas (MACHADO et al., 2005) e o BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, com 626 acessos que compreende diversas espécies do gênero (OLIVEIRA, 2006).

Com a perspectiva de diversificação, novos genótipos produtivos e resistentes às principais doenças cítricas, vêm sendo selecionados no IAC, tanto entre variedades do BAG Citros como de variedades obtidas por cruzamentos dirigidos. Dentre as populações, o cruzamento entre tangor Murcott (TM) (*C. reticulata* x *C. sinensis*) e laranja Pêra (LP) (*C. sinensis*) foi estudado e avaliado quanto à resistência a clorose variegada dos citros - CVC (OLIVEIRA et al., 2004) e a leprose (BASTIANEL et al., 2009), uma vez que os genitores são contrastantes para estas doenças. Deste cruzamento, o híbrido H163 foi selecionado, por apresentar boas características de frutos, com teor de sólidos solúveis de 10°Brix, *ratio* de 7,3, peso aproximado de 145,9 g (dados ainda não publicados), apresentar características morfológicas semelhantes às da laranja doce e, ainda ser resistente à CVC.

Para aumentar a variabilidade e selecionar materiais com características ainda mais próximas à laranja doce, este híbrido foi cruzado com LPA (laranja Pêra de Abril) (*C. sinensis*). Esta variedade foi utilizada como genitor feminino, por apresentar características morfológicas semelhantes às da laranja Pêra e ser monoembriônica. Por ser monoembriônica, não foi necessária a identificação e seleção de plantas de origem híbrida entre os indivíduos a população gerada.

Considerando as características contrastantes dos genitores deste cruzamento a etapa seguinte foi avaliar a progênie resultante, utilizando estratégias de biologia molecular. Dentre as ferramentas, os mapas genéticos, baseados na

frequência de recombinação entre marcadores polimórficos em uma progênie, tornaram-se fundamentais para acelerar esse processo de seleção de marcadores associados a caracteres qualitativos e quantitativos (DANAN et al., 2011). Assim, o mapeamento genético visa encontrar associações entre os marcadores mapeados e as observações das características fenotípicas, principalmente de natureza quantitativa.

A construção de mapas de ligação e a localização de QTLs (*Quantitative Traits Loci*), visando à seleção, o entendimento da herança, estrutura e organização do genoma de citros (OLLITRAULT et al., 2012) são alternativas viáveis no melhoramento de citros, como exemplo já foram localizados QTLs para a resistência e/ou tolerância à tristeza (CRISTOFANI-YALY et al., 1999), à gomose de *Phytophthora* (SIVIERO et al., 2006), à leprose (BASTIANEL et al., 2009), apomixia (SIVIERO et al., 2002), entre outros.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Localizar QTLs associados à resposta a *A. alternata*, utilizando uma população de híbridos de citros (LPA vs H163).

Objetivos Específicos

- a) Caracterização da população de híbridos entre LPA vs H163, quanto à resposta à *A. alternata*, via inoculação de conídios em folhas jovens destacadas;
- b) Construção de mapa de ligação utilizando de marcadores moleculares DArT_seqTM e SSR ;
- c) Identificação de QTLs ligados à resistência a *A. alternata*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Mancha marrom de alternaria

3.1.1 Histórico da doença

A mancha marrom de alternaria (MMA) foi identificada, pela primeira vez, na Austrália em tangerina Emperor (*Citrus reticulata* Blanco) por volta de 1903, e logo foi disseminada a outros locais no mundo, estando presente em vários países como Turquia, Espanha, Itália, EUA, China, Brasil e Argentina (STUART et al., 2009; CUENCA et al., 2013; HUANG et al., 2015). No Brasil foi constatada no Rio de Janeiro em 2001 (GOES et al., 2001), em tangerina Dancy, sendo posteriormente disseminada para outros estados, como Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo (SPÓSITO et al., 2003; STUART et al., 2009).

Atualmente se constitui na principal doença fúngica das tangerinas (*C. reticulata*) e seus híbridos, sendo que, as principais variedades plantadas em pomares no estado de São Paulo; tangerina Ponkan (PIO et al., 2005) e o tangor Murcott (POMPEU JUNIOR, 2001) são muito suscetíveis à doença. A incidência desta leva à queda de produtividade (PRATES, 2004; BASSANEZI et al., 2014) e, conseqüentemente, a danos econômicos (CHUNG, 2012).

3.1.2 Agente causal

A doença é causada por um fungo, do gênero *Alternaria*, em que a principal forma de disseminação é por meio da formação de conídios, que são esporos assexuais caracterizados pela coloração escura e a presença de septos longitudinais e transversais (BARNETT; HUNTER, 1998). Os esporos quando germinam produzem toxinas específicas ao hospedeiro (*host-specific toxin*-HST) (TSUGE et al., 2013). A dispersão dos conídios ocorre pelo vento e em condições edafoclimáticas ideais, relacionadas com as chuvas ou mudanças bruscas de umidade (TIMMER et al., 2000), atingem genótipos suscetíveis e desencadeiam a sintomatologia da doença.

O gênero *Alternaria* compreende uma gama de fungos com patótipos diferentes, que são produtores de toxinas específicas, podendo apresentar a liberação de apenas uma toxina como, por exemplo, a ACT-Toxin, ou ainda ter vias de biossíntese de outras toxinas como ACTG-Toxin e ACR-Toxin (THOMMA, 2003). No entanto, somente o grupo produtor de ACT-Toxin afeta as tangerinas e pomelos (*C. paradisi* Macf.) (PERES et al., 2003), enquanto que a ACR-Toxin é efetiva na espécie *C. jambhiri* Lush., causando a mancha foliar do limão Rugoso. Patótipos específicos de *Alternaria* também afetam outras espécies cultivadas como a soja (DANELLI et al., 2011), batata (MIGUEL, 2012), café (MELLO et al., 2001), entre outras.

3.1.3 Interações planta x patógeno

Existem três principais vias de infecção por fungos em plantas, a primeira direta, onde ocorre a permeabilização da membrana celular do tecido da planta (TIMMER, 2000), ou a entrada do patógeno pelos estômatos (SOLEL; KIMCHI, 1998; AKIMITSU et al., 2003; STUART, 2011) ou ainda a presença de ferimentos no tecido vegetal (MARTELLI, 2011).

Em variedades resistentes de tangerinas a defesa provável é através de mecanismos de respostas mediadas por processos bioquímicos na interação entre planta – patógeno (STUART et al., 2010), além da possível ausência de receptores de toxinas (CUENCA et al., 2013). Nestas variedades a ação bem sucedida do fungo se estabelece pela germinação dos esporos e liberação da toxina HST (*host-specific toxin*) no hospedeiro (CHUNG, 2012; TSUGE et al., 2013). HST são metabólitos

secundários, com baixo peso molecular (MIYAMOTO et al., 2008; STUART et al., 2010).

No fungo, a biossíntese destas toxinas é controlada por genes que estão em um pequeno cromossomo de tamanho entre 1,1 a 1,9 Mb, que varia de acordo com o isolado (MASUNAKA et al., 2005). Estes genes são homólogos a região YAP1 (AaAP1) relacionados a vias metabólicas que impedem a ação de peróxidos, produzidos pela planta, este impedimento levaria a morte de *A. alternata*, pois em um ensaio onde o patógeno possui ausência de AaAP1, observou-se menor intensidade de sintomas do que estirpes selvagens (LIN et al., 2009).

O principal local de ação da toxina é a membrana plasmática, onde ocorre a perda rápida de eletrólito (MIYAMOTO et al., 2008) garantindo a destruição das células ao redor da penetração. Este tecido se torna necrótico no hospedeiro infectado, agindo também em constituintes celulares, tais como complexo de Golgi, retículo endoplasmático, cloroplasto e mitocôndrias (TSUGE et al., 2013).

O efeito da toxina no tecido é demasiadamente rápido e nos genótipos suscetíveis, as lesões pontuais podem ser observadas de 24 a 48 horas após a infecção (PACHECO, 2012; CUENCA et al., 2013).

3.1.4 Sintomatologia

Os sintomas ocorrem preferencialmente em folhas, ramos, frutos de tangerinas, em tecidos imaturos, ou em fase de crescimento, inicialmente com lesões pequenas e expandindo-se pela ação da toxina, chegando ao desfolhamento intenso durante os períodos de maior infecção (TIMMER et al., 2003).

Conseqüentemente, ocorre à queda de frutos imaturos, seca de ponteiros e brotações novas (COLTURATO, 2009). Nas folhas jovens, os sintomas iniciais da doença se caracterizam por pequenas manchas de coloração marrom ou preta, que posteriormente se estendem podendo abranger grande área da folha (AZEVEDO et al., 2010). 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). Nos frutos maduros ocorrem manchas necróticas de 1 a 10 mm de diâmetro e a qualidade externa destes frutos é seriamente

reduzida, depreciando-os para o consumo (TIMMER et al., 2003; TSUGE et al., 2013; BASSIMBA et al., 2014).

3.1.5 Resistência de plantas cítricas

Quanto à resistência de plantas cítricas à *A. alternata*, tem sido observado que algumas espécies de citros, como a laranja doce (STUART et al., 2009) e as tangerinas Fremont, Thomas, Clementina, Cleópatra e Cravo (REIS et al., 2007, SOUZA et al., 2009, PACHECO et al., 2012) são resistente ao patógeno. Segundo Stuart (2011), o patossistema citros-*A. alternata* é variável e complexo, sendo que em plantas resistentes (Clementina e Cleópatra) ocorre a indução, das vias de sinalização, por etileno, ácido jasmônico e produção de proteínas PR.

Poucos estudos foram conduzidos para determinar a origem da resistência e a suscetibilidade de genótipos de citros à MMA, tendo sido relatado que a suscetibilidade é, provavelmente, de herança simples e dominante (DALKILIC et al., 2005; GULSEN et al., 2010). Assim, o alelo 'A' seria dominante para suscetibilidade e 'a' recessivo para a resistência à doença. Portanto, genótipos 'Aa' ou 'AA' são suscetíveis, enquanto 'aa' apresenta o fenótipo resistente.

Estudos conduzidos por CUENCA et al. (2013) com populações de triploides confirmaram estes resultados e sugerem que o tangor Murcott e o tangelo Orlando seriam heterozigotos (Aa), enquanto mexericas e clementinas seriam resistentes (aa). Assim, estudos relacionados à herança de resistência *A. alternata*, se tornam evidentemente necessários e de extrema importância, já que a produção comercial de tangerinas no Brasil é quase que totalmente com variedades suscetíveis.

3.1.6 Controle da doença

A doença é frequente nos pomares novos, de variedades comerciais de tangerinas e seus híbridos, sendo o fungo considerado um agente causal com alta disseminação e de difícil controle e presente nas principais regiões citrícolas do Brasil, onde há condições favoráveis para o seu desenvolvimento (BASSANEZI et al., 2014).

Desta maneira, o controle químico do patógeno requer várias aplicações de fungicidas. Nas regiões do estado de São Paulo que apresentam condições climáticas favoráveis para a doença, o número de aplicações anuais de fungicidas pode variar de 15 a 20 (AZEVEDO et al., 2010), nos pomares de tangor Murcott, o

que tem elevado os custos de produção da fruta e desestimulado o plantio de novas áreas. O controle da doença nem sempre é satisfatório, como o relatado por Vicent et al. (2008), contribuindo para a redução de áreas plantadas. Na Espanha, por exemplo, o autor relata uma diminuição significativa nos plantios da tangerina Fortune, variedade muito suscetível a MMA (CUENCA et al., 2013). Além disso, a aplicação sistemática de fungicidas para o controle da mancha marrom de alternaria, ao longo de muitos anos, acarreta problemas ambientais e de saúde pública.

3.2 Melhoramento de citros

O melhoramento de plantas tem obtido sucesso no desenvolvimento de novas variedades usando metodologias convencionais (melhoramento clássico) em muitas espécies de importância econômica. Em citros, embora seja grande o número de variedades e clones em bancos ativos de germoplasma (BAG), um número relativamente pequeno é utilizado nos pomares, contribuindo para o agravamento dos problemas fitossanitários na cultura. Além disso, tais problemas têm dificultado o estabelecimento e manutenção de experimentos em condições de campo, uma vez que, para algumas doenças a erradicação de plantas infectadas é uma das poucas formas de controle.

Dentre os principais fatores que afetam a obtenção de novas variedades de citros, destacam-se o longo período de juvenilidade (PASQUAL et al., 2015) e a apomixia facultativa, onde os embriões são formados em tecido somático do óvulo, sem a fusão de gametas, ocorrendo simultaneamente com a formação do embrião sexual. Esse processo garante a fixação da heterose, perpetuando as combinações vigorosas e é uma característica muito desejável para a obtenção e multiplicação de porta-enxertos como relatado por Santos et al. (2015), mas por outro lado tem dificultado o melhoramento convencional.

Para transpor estas e outras dificuldades do melhoramento, técnicas que envolvem os marcadores moleculares, vêm sendo amplamente empregadas em diferentes etapas nos programas de melhoramento de citros. Marcadores moleculares são usados para identificar plantas zigóticas em progênies de cruzamentos dirigidos (BASTIANEL et al., 1998), sendo vantajosos para a seleção de um grande número de indivíduos em populações híbridas (CRISTOFANI-YALY et al., 2015) e também para caracterizar o germoplasma disponível (NOVELLI et al., 2006).

Uma grande vantagem dos marcadores moleculares é a possibilidade de construção de mapas de ligação; fundamentais em plantas perenes e de longo ciclo vegetativo, pois permitem a associação de regiões genômicas com as características de interesse agrônomo (CRISTOFANI-YALY et al., 2015). A estratégia de localização de características quantitativas (QTLs) e a relação destas a seus efeitos (BASTIANEL et al., 2009; OLLITRAULT et al., 2012b), permite o entendimento da herança gênica, elucidando o controle das características complexas (SCHUTER; CRUZ, 2004).

A seleção de variedades resistentes às principais doenças vem sendo uma das principais estratégias dos programas de melhoramento. O Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo - IAC, desde a década de 1990, por meio de cruzamentos dirigidos, e uso de marcadores moleculares, selecionou e estabeleceu populações de híbridos em várias regiões do estado de São Paulo. Dentre as quais, destaca-se o cruzamento realizado entre o tangor Murcott (TM) e a laranja Pêra (LP), gerando cerca de 350 indivíduos, que foram avaliados quanto à resistência à CVC (OLIVEIRA et al., 2004) e à leprose (BASTIANEL et al., 2006, 2009). Deste cruzamento, o híbrido H163 foi selecionado, por apresentar boas características de frutos de laranja doce e ainda ser resistente à CVC.

Este híbrido, em 2010, foi cruzado com a laranja Pêra de Abril IAC, variedade utilizada como genitor feminino por não apresentar poliembrionia, sendo o único acesso do banco ativo de germoplasma de citros do Instituto Agrônomo de Campinas (BAG Citros IAC), dentre as laranjas doces, com essa característica (DOMINGUES et al., 2000; GONZAGLA et al., 2006). Desde 2005, este acesso vem sendo utilizado no programa de melhoramento como genitor feminino em cruzamentos interespecíficos com tangerinas, tangores e outras espécies e híbridos do gênero *Citrus* (SOUZA, 2010), permitindo transpor a etapa de identificação e seleção de plantas zigóticas oriundas do cruzamento. A progênie LPA x H163 é a primeira população de retrocruzamento do IAC e conta com 600 indivíduos disponíveis para estudos de mapeamento genético e avaliação de características hortícolas e de resistência a doenças.

3.3 Mapeamento genético e localização de QTLs

3.3.1 Mapas genéticos em citros

Os *Citrus* e gêneros relacionados são plantas alógamas, compatíveis sexualmente, apresentam 18 cromossomos nas células somáticas (OLIVEIRA, 2006). São diplóides, com ocorrência de triplóides naturais, como a lima ácida Tahiti, em menor frequência e apresentam conteúdo genômico reduzido ($1C = 0,62 \text{ pg}$) (GUERRA, 1993), quadro que favorece a construção de mapas de ligação.

Em espécies perenes e heterozigotas, a obtenção de linhagens é dificultada devido à depressão por endogamia e longo período juvenil. Desta forma, a construção de mapas de ligação pode ser realizada utilizando um cruzamento biparental entre indivíduos não-endogâmicos, resultando uma progênie de irmãos completos. A utilização desta população e a obtenção de marcadores com padrão de segregação mendeliana 1:1 permitem a construção de mapas de ligação para cada um dos genitores, estratégia denominada duplo *pseudo-testcross* (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994).

Em diplóides, os marcadores moleculares como, exemplos SNPs e microssatélites, podem ter padrões de segregação 1:1:1:1, 1:2:1, 3:1 ou 1:1, dependendo do número e da configuração dos alelos dos genitores. Estes marcadores, com padrões distintos de segregação, podem ser utilizados na construção de mapas integrados. Wu et al. (2002) e Tong et al. (2010) utilizaram métodos propostos com base em análises multiponto e de máxima verossimilhança usando modelos ocultos de Markov (Hidden Markov Models - HMM), os quais, foram incorporados em programas, tal como *OneMap* (MARGARIDO et al., 2007, 2011). A principal vantagem destes métodos é a capacidade de se obter mapas de ligação integrados com maior saturação e boa representação do polimorfismo genético gerado pelo cruzamento, onde todos os marcadores com diferentes padrões de segregação podem ser utilizados nas análises de mapeamento genético (GAZAFFI et al., 2014).

Várias classes de marcadores moleculares foram desenvolvidas nas últimas décadas. Marcadores de loco-específicos codominantes, que detectam polimorfismo de nucleotídeo único, por localização de sítios alvo da enzima de restrição ou RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (JARRELL et al., 1992), permitem a

detecção de *loci* que tenham inserções e/ou deleções e translocações e/ou inversões no fragmento sob análise.

Destaca-se o uso do marcador microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), amplificados via PCR (Reação em cadeia da polimerase), que são fragmentos de sequências de nucleotídeos repetidas *in tandem*. Em citros, estes marcadores foram obtidos de sequências genômicas e expressas (EST's), sendo utilizados na construção de mapas genéticos (CHEN et al., 2008; GULSEN et al., 2010).

Gmitter Jr. et al. (1996) construíram, utilizando-se marcadores dominantes RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*), o primeiro mapa genético em citros com localização de QTLs de regiões ligadas a resistência a tristeza dos citros (CTV). Tais marcadores possibilitaram obtenção de mapas de ligação, entretanto, são considerados marcadores com limitações de reprodutibilidade e de interpretação (OLIVEIRA et al., 2004). Marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (ALZATE-MARIN et al., 2005), também dominantes, foram utilizados com sucesso na obtenção de um mapa de ligação em citros e localização de QTLs relacionados à leprose dos citros (BASTIANEL et al., 2009).

O uso dos marcadores SCAR (*Sequence-characterized Amplified Region*) é relatado por Deng et al. (1997; 2001) em saturação de regiões gênicas de resistência à tristeza dos citros (CTV) e também por Raga et al. (2012) na construção de mapas e localização de QTLs de juvenalidade de plantas. Além destes, outros marcadores como CAPs (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) (GARCIA et al., 2000), IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) (RAGA et al., 2012), RGA (*Resistance Genes Analogs*) (GULSEN et al., 2010), fAFLP (*Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism*) (OLIVEIRA et al., 2007), já foram aplicados.

Na construção de mapas genéticos é importante a disponibilidade de marcadores que sejam altamente polimórficos e cubram todo o genoma como, por exemplo, DArTs (Diversity Arrays Technology) e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) e inserções/deleções (Indel), além de apresentarem transferibilidade interespecífica (JACCOUD et al., 2001).

Os marcadores DArT_seq foram desenvolvidos por meio da união de técnicas como a redução da complexidade genômica através corte do DNA genômico com enzimas de restrição, e sequenciamento de última geração (NGS – Next Generation

Sequencing). Detectando variações existentes nas sequências de DNA, nos sítios de restrição, por sequenciamento e alinhamento com genoma de referência (KILLIAN et al., 2012; ZOU et al., 2014; RAMAN et al., 2014).

O uso dos marcadores DArT permitiu a construção de um mapa de alta densidade e o estudo de diversidade de *Brassica juncea* (ZOU et al., 2015), bem como estudos de predição de efeitos gênicos (BOUVET et al., 2016).

A alta eficiência torna os marcadores DArT_seq interessantes para estudos genéticos em populações de citros, principalmente para cruzamentos cujos genitores são pouco contrastantes, pela alta cobertura do genoma e transferibilidade entre espécies dos marcadores.

Visando ao entendimento da herança genética de características como resistência a doenças ou outros aspectos agrônômicos de interesse, vários mapas de ligação foram desenvolvidos para os citros (DURHAM et al., 1992; LURO et al., 1995, FANG et al., 1998; DENG et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2004; SIVIEIRO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007, BASTIANEL et al., 2009; GULSEN et al., 2010).

De acordo com Ollitrault et al. (2012b), a maior parte dos mapas genéticos em citros baseavam-se em híbridos intergenéricos entre *Citrus* e *Poncirus*, devido à importância de *P. trifoliata* para o melhoramento de porta-enxertos. Mas, os trabalhos de mapeamento passaram a focar em variedades copa, em mapas construídos através de híbridos de laranja doce cv Pêra x tangerina Cravo (OLIVEIRA et al., 2004b, 2005) e laranja doce cv Pêra x tangor Murcott (OLIVEIRA et al., 2007; BASTIANEL et al., 2009).

Vale ressaltar que, independente do tipo de cruzamento, o desejável é o elevado contraste entre os genitores. Conseqüentemente, haverá polimorfismo máximo; premissa básica para admitir menores distâncias entre *loci* ligados para o mapeamento (GRIFFITHS et al., 2015).

Em comparação com outras culturas, o mapeamento genético em citros é menos informativo. De acordo com Ollitrault et al. (2012b), os mapas genéticos construídos com marcadores codominantes (principalmente SSRs) abrangem cerca de 150 marcadores, enquanto mapas com base em marcadores dominantes, tais como AFLPs, SRAPs (*Sequence Related Amplified Polymorphism*), ISSRs (*Inter Single Sequence Repeats*), e RAPDs incluem pouco mais de 200 marcadores. Ollitrault et al. (2012b) construíram um mapa de referência para *C. clementina* com 961 marcadores SNP, SSR e Indel, em 9 grupos de ligação e 1.084,1 cM.

A cobertura dos mapas construídos para citros variam desde a saturação em regiões ligadas a resistência a doenças (GMITTER Jr et al., 1996; DENG et al., 1997; FANG et al., 1998), a mapas que cobrem o genoma haplóide da espécie visando ao estudo de características quantitativas complexas associadas ou não à resistência a doenças, como a leprose dos citros (BASTIANEL et al., 2009) e a mancha marrom de alternária (GULSEN et al., 2010).

Os mapas construídos em citros, adotando as estratégias *pseudo-testcross* ou mapeamento integrado, são considerados de média densidade (GULSEN et al., 2010; OLLITRAULT et al., 2012b) e busca-se o desenvolvimento de mapas de ligação altamente saturados (CHUTIMANITSAKUN et al., 2011), para isso um número maior de marcadores devem integrar os grupos de ligação.

Quanto aos *softwares* utilizados para mapeamento em citros destacam-se três principais: *Mapmaker*, *Joinmap* e o *Onemap*. O *Mapmaker* foi utilizado em oito trabalhos publicados na construção de mapas de ligação para populações cítricas (DURHAM et al., 1992; JARRELL et al., 1992; CAI et al., 1994; LURO et al., 1995; CRISTOFANI et al., 1999; DENG et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2004b; SIVIEIRO et al., 2006).

Foram encontradas sete publicações com a utilização do *Mapmaker* e o *Joinmap* (GMITTER Jr et al., 1996; KIJAS et al., 1997; FANG et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2004a; DALKILIC et al., 2005; CHEN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2007). O *Joinmap* foi utilizado para construção de mapas em dez trabalhos (DENG et al., 1997; GARCIA et al., 1999; GARCIA et al., 2000; ROOSE et al., 2000; RUIZ; ASINS, 2002; BASTIANEL et al., 2009; GULSEN et al., 2010; OLLITRAULT et al., 2012b; RAGA et al., 2012; XU et al., 2012).

Em citros, comparou-se o uso dos programas *Joinmap* e *Onemap*, para mapeamento, havendo similaridade entre os mapas gerados para híbridos intraespecíficos de laranja doce (SOUZA, 2010).

3.3.2 Mapeamento de QTLs e seleção assistida por marcadores

Após a construção do mapa genético, estudos relacionados às características quantitativas (*Quantitative Traits Loci*, QTL), puderam ser desenvolvidos, com o intuito de identificar a posição de genes relacionados a elas no genoma e estimar os efeitos genéticos como: aditivo, dominância ou outros efeitos (TOLEDO et al., 2008).

A construção de mapas de ligação utilizando os marcadores moleculares e estudos relacionados à localização de QTLs, responsáveis pela expressão de características quantitativas, permitem o entendimento da herança genética da característica, estrutura e organização de genomas (OLLITRAULT et al., 2012b). A localização de QTLs em mapas genéticos de citros vem sendo realizada para resistência e/ou tolerância à Tristeza dos citros (CTV) (CRISTOFANI et al., 1999), gomose de *Phytophthora* (SIVIERO et al., 2006), para apomixia (SIVIERO et al., 2002), para resistência do vírus da leprose (BASTIANEL et al., 2009), entre outros.

A atribuição de marcador molecular para seleção assistida por marcadores (SAM) pode aperfeiçoar o processo em programas de melhoramento (RODRIGUES et al., 2010). Porém, ainda não foi possível estabelecer marcadores SAM, em programas de melhoramento de citros (CRISTOFANI-YALY et al., 2015). Neste sentido, é preciso combinar informações dos mapas de ligação gênica e QTLs mapeados (BASTIANEL et al., 2009; OLLITRAULT et al., 2012b); consolidar uma base de dados de sequências de diferentes espécies de citros, incluindo bibliotecas feitas a partir de plantas submetidas a várias condições de estresse biótico; explorar as informações de expressão gênica global usando microarranjos (BOAVA et al., 2011) e de RNA_seq; ampliar bibliotecas BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) (OLLITRAULT et al., 2012a); e as informações de sequenciamento do genoma completo de citros (XU et al., 2013; WU et al., 2014).

Para a resistência de *A. alternata*, uma região genômica associada a esta característica foi localizada através da combinação de duas estratégias, isto é, a utilização de marcadores SNP e SSR e a técnica de BSA (*Bulked Segregant Analysis*) (CUENCA et al., 2013). Este trabalho permitiu a localização de uma região genômica de 3,3 Mb flanqueada por marcadores SNPs e SSR associada à resistência a MMA, no grupo de ligação III do mapa genético de Clementina. Estes marcadores são candidatos promissores para serem utilizados na seleção assistida por marcadores (SAM).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Para realização do trabalho utilizou-se uma população de 264 híbridos, obtidos no ano de 2010, do cruzamento de laranja Pera de Abril (LPA) (*C. sinensis*) vs H163, híbrido resultante de cruzamento de tangor Murcott (*C. reticulata* x *C. sinensis*) x *C. sinensis* (Figura 1). Esta população é mantida em casa de vegetação, no Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônômico (CCSM-IAC).



Figura 1. H163, híbrido resultante de cruzamento de tangor Murcott (*C. reticulata* x *C. sinensis*) x *C. sinensis*.

4.2 Fenotipagem para resistência de *Alternaria alternata* sp *citri*

4.2.1 Isolamento e cultivo de *Alternaria alternata* sp *citri*

Um isolado de *A. alternata* foi obtido a partir de tecidos lesionados de fruto de tangor Murcott, coletado em plantas mantidas em campo no CCSM-IAC. Os tecidos lesionados foram cortados em pequenos pedaços com o auxílio de um bisturi. A desinfecção superficial foi feita através da imersão, com a utilização de álcool etílico comercial (96%) por 1 minuto, e em hipoclorito de sódio a 2% por 2 minutos.

Em seguida, incubados em placas de Petri, contendo meio de cultura BDA (200g batata, 20g dextrose, 15 g/L⁻¹ agar). Para evitar crescimento de outros fungos contaminantes, acrescentou-se o fungicida carbendazin (Nortox) na concentração de 640 mg/L do ingrediente ativo. A espécie em estudo tem alta capacidade de degradação deste fungicida (PACHECO et al., 2012), além de ser eficiente na eliminação de *Colletotrichum gloeosporioides* (HUANG et al., 2015).

Para evitar o crescimento de bactérias foram utilizados 50 µg/mL de Tetraciclina (Tetramed) junto ao meio de cultura e as placas mantidas em fotoperíodo de 12 horas, 27°C, conforme metodologia descrita por Sasseron (2008).

Após período de sete dias, foi preparado meio de carbonato de cálcio, composto por 30 g de CaCO₃; 20 g de sacarose e 20 g de Agar em volume de 1L, e vertido em placas de Petri. Foram transferidos 50 discos de 5 mm, com crescimento de tecido micelial, para indução de esporulação. Este material foi mantido à 27°C, por cinco dias em fotoperíodo de 12 h. A identidade dos isolados foi confirmada por meio de estruturas de reprodução assexuada, via microscopia ótica (Figura 2). A partir dos isolados de folhas e frutos foi escolhido o isolado patogênico com boa formação de esporos em condições laboratoriais, para a utilização neste experimento.

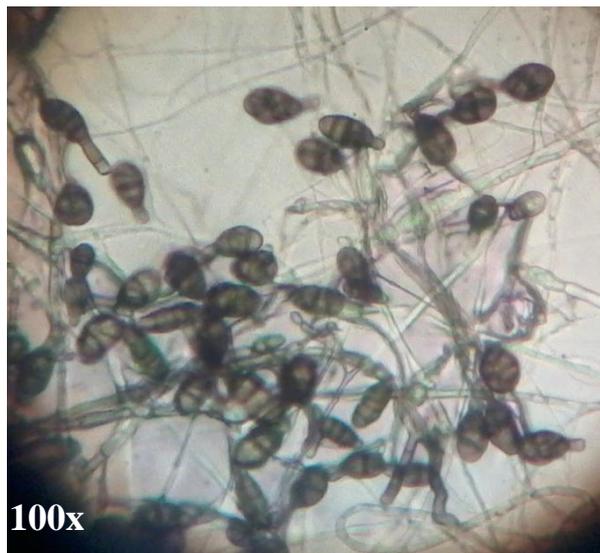


Figura 2. Conídios e hifas de *A. alternata* f. sp *citri*.

4.2.2. Inoculação *in vitro* e avaliação dos sintomas

Para a obtenção da suspensão de conídios, para inoculações *in vitro*, foram adicionados 10 ml de água destilada esterilizada, nas superfícies de placas de meio de carbonato de cálcio, com a ajuda de uma espátula estéril raspou-se a formação colonial, e obteve-se uma suspensão de conídios, que foi filtrada e ajustada em concentração de 10^5 conídios/mL, através de uso de câmara de Neubauer.

Foram coletadas folhas jovens de todos os híbridos juntamente com os genitores, três folhas por indivíduos, com cerca de 2-3 cm. Como controle para avaliar a população em estudo, foram consideradas as folhas de tangerina Dancy, tangor Murcott, variedades suscetíveis a *A. alternata*, e a tangerina Fremont, variedade resistente, conforme descrito por Azevedo et al. (2010).

As folhas foram acondicionadas, com a parte abaxial voltada para cima, em placas de Petri forradas com papel filtro e algodão umedecido, borrifando cerca de 2 mL de suspensão de conídios, conforme metodologia descrita por Peever et al. (1999) e Caninhos et al. (1999). As inoculações *in vitro* foram conduzidas no laboratório de Melhoramento e Qualidade da fruta (MQL) do CCSM-IAC, Cordeirópolis-SP, em câmara BOD (FANEM, 347CGD), a 27°C, com fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações das lesões ocasionadas pelo fungo foram realizadas em 24, 48 e 72 horas após a inoculação, pela observação da presença de sintomas típicos da doença e, posteriormente, em determinações da área lesionada (% da folha tomada

pela doença) (Figura 3) conforme descrito por Martelli (2011). Foram avaliadas as médias das três folhas avaliadas de cada placa.

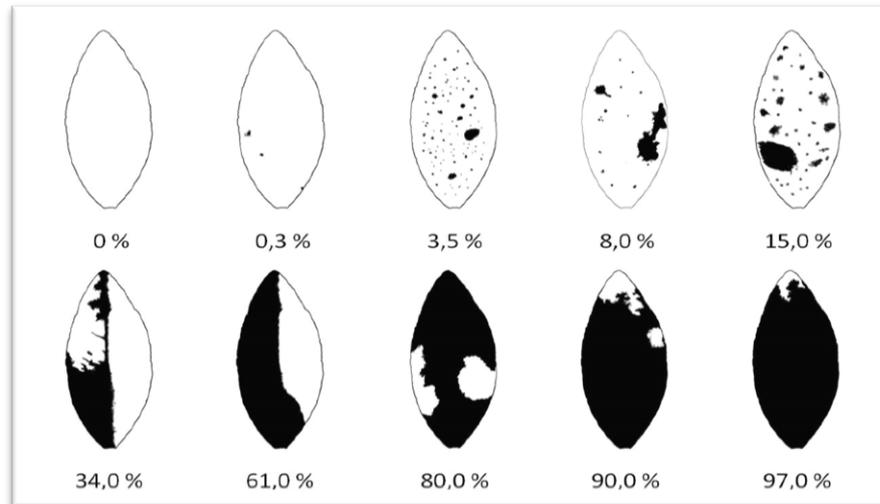


Figura 3. Escala diagramática usada, para determinar a porcentagem de área foliar, com sintoma de MMA (MARTELLI, 2011).

Com os dados de severidade da doença nos três tempos de avaliação foram calculados os valores da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) com a fórmula abaixo:

$$AACPD = \sum [((y1 + y2)/2)*(t2-t1)]$$

onde $y1$ e $y2$ são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos $t1$ e $t2$, respectivamente (MENEGON et al., 2005). Este cálculo permite verificar o comportamento da doença pela curva de progresso (BERGAMIN, 1995), a partir de modelos matemáticos.

4.2.3 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três folhas por placa de cada híbrido, genitor ou testemunha. Os valores de AACPD foram utilizados para cálculo dos parâmetros genéticos. Os parâmetros genéticos foram estimados pela metodologia de modelos mistos (REML/BLUP) utilizando-se o programa para análises genéticas, SELEGEN - REML/BLUP (RESENDE; SILVA, 2014).

4.3 Mapeamento genético

4.3.1 Extração de DNA

A extração do material genômico (DNA) foi feita de acordo com a metodologia descrita por Murray e Thompson (1980), com adaptações introduzidas por Machado et al. (1996). Foram coletadas folhas frescas de cada híbrido, lavadas sem atrito em água destilada e trituradas em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Cerca de 2 g do material foi acondicionado em microtubos de 1 mL, e armazenados em ultra freezer à -80°C, para posterior processamento.

A extração de DNA procedeu-se com a adição de 700 µL de tampão composto por 1% CTAB; 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,7M NaCl; 2% sarcosil e 2% mercaptoetanol em cada tubo, estes foram incubados a 65°C por 30 minutos. Após resfriamento, sobre bancada, até o material atingir temperatura ambiente foi adicionado ao extrato o mesmo volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Os microtubos, em seguida, foram agitados por 3 minutos e centrifugados por 8 min a 12.000 rpm.

Em capela de exaustão, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e homogeneizado com o mesmo volume de CTAB 10% (10% CTAB; 0,7M NaCl), e adicionado clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e novamente centrifugado por 8 min a 13.400 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a ele, adicionado igual volume de tampão de precipitação (1% CTAB; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA) misturado gentilmente, permanecendo 30 min em repouso e, posteriormente, centrifugado por 5 min a 12.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimentado (*pellet*) formado dissolvido em 80 µL de TE, com alta

concentração de NaCl (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1M NaCl) a 65°C, até completa dissolução.

Posteriormente, após resfriamento, o DNA foi precipitado com 160 µL de etanol 100% e mantido a - 20°C por 12 horas. Após, o material foi centrifugado por 6 min a 12.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e o DNA precipitado foi dissolvido em 80 µL de H₂O MilliQ contendo 10 µg/µL de RNase para a eliminação completa de contaminação por RNA.

4.3.2 Desenvolvimento dos marcadores DArT_seq

Amostras de DNA dos genitores, H163 e LPA, dos 264 híbridos, obtidos do cruzamento, foram ressuspensas em 40 µL de tampão TE (10 mM Tris pH 7,5 and 1 mM EDTA) na concentração de 100 ng/µL, após quantificação em espectrofotômetro (NanoDrop[®] ND-8000). As amostras foram enviadas, para sequenciamento e desenvolvimento de marcadores DArT_seqTM na empresa Diversity Arrays Technology Pty Ltd (DArT P/L) (Yarralumla, Austrália).

Para a redução da complexidade do genoma foram utilizadas enzimas de restrição *Pst*I/*Taq*I, em regiões hipometiladas, ricas em DNA de alta complexidade, adaptadores específicos (*Barcodes*) foram ligados à sequência complementar indexando os fragmentos, podendo-se rastrear a origem das sequências, direcionando assim a representação genômica desejada via PCR.

As amostras foram sequenciadas em equipamento Illumina Hiseq2000 e as sequências (arquivos FASTQ) resultantes foram analisadas, com nível de corte em 90% de confiança (KILIAN et al., 2012). Várias etapas estatísticas de controle de qualidade e limpeza de sequências foram feitas e alinhadas com o genoma de referência (*C. clementina*) publicado no site (<https://phytozome.jgi.doe.gov>).

Os arquivos do alinhamento foram processados utilizando um *pipeline* de análise desenvolvido pela empresa DArT Pty Ltd, o qual gerou um arquivo com *clusters* baseados em similaridade de sequências, aceitando um máximo de 3 bases divergentes por *read*. A partir destes *clusters*, o polimorfismo foi detectado pela presença ou ausência de sequências entre amostras, sendo registrado através de um sistema binário (1 ou 0). Este polimorfismo é derivado da variabilidade na distribuição dos sítios de restrição entre sequências em comum entre amostras.

4.3.3 Marcadores moleculares SSRs

Foram utilizados nove pares de *primers* SSRs desenvolvidos a partir de informações de sequenciamento de ESTs – CitEST (PALMIERI et al, 2007), 4 SSRs descritos por Cuenca et al. (2013), localizados em região associada à resistência a *A. alternata* no mapa genético de tangerina Clementina. As reações de amplificação foram feitas em volume final de 14 μ L contendo, 100 ng de DNA, 0,8 U de Taq polimerase, tampão da reação Tris-HCl (pH 9) 750 mM, KCl 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 200 mM, 0.001% (BSA- *bovine serum albumin*), MgCl_2 5 mM, dNTP (0,2 mM) e 0,3 mM de cada *primer*. A amplificação foi realizada em termociclador MJ Research Thermocycler.

Para os *primers* citados por Palmieri et al. (2007) o programa utilizado foi de 30 ciclos de 94°C por 30s, 65-56°C por 30s e 72°C por 5s, com temperatura de anelamento inicial de 65°C e diminuindo 0,3°C a cada ciclo, seguido por 3 ciclos de anelamento a 56°C. Para os *primers* de Cuenca et al. (2013) a amplificação foi com desnaturação à 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30s, 55°C por 1 min. e 72°C por 30 s, extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 3% e corados com brometo de etídio (0,5 ng/mL).

4.3.4 Avaliação de segregação

Para a construção do mapa integrado, foram considerados todos os *loci* DArT e SSRs que não apresentaram desvio da segregação esperada, por meio teste de qui-quadrado X^2 (STEEL; TORRIE, 1980), com a correção de Bonferroni (RICE, 1989). Os DArT_seq resultaram em segregações do tipo 1:1 e 3:1 e, para os SSRs, as segregações foram do tipo 1:1, 3:1 e 1:1:1:1.

Os marcadores selecionados para a construção do mapa foram codificados seguindo a notação proposta por Wu et al. (2002). Os marcadores exclusivos para o genitor H163 foram denominados como D1 (configuração ao x oo), marcadores informativos para o genitor LPA foram codificados D2 (configuração oo x ao), os marcadores informativos para ambos genitores com segregação 3:1 foram denominados como C (configuração ao x ao) e com segregação 1:1:1:1 foram denominados A2 (configuração ac x bc).

4.3.5 Mapeamento genético e comparação com genoma de referência

O mapa foi construído utilizando-se o software *OneMap* (MARGARIDO et al., 2007), com marcas apresentando segregações 1:1 e 3:1. A partir do critério de *LOD Score* de 8 e a frequência de recombinação inferior a 0,3, foram formados os grupos de ligação. Os marcadores foram ordenados removendo-se aqueles considerados redundantes pelo algoritmo de RCD (delineação rápida em cadeia - DOERGE, 1996).

Foi realizada a análise comparativa entre o mapa de ligação integrado construído no presente estudo com o genoma de referência de *Citrus sinensis*. Para que fosse possível esta comparação, todas as sequências dos marcadores ancorados no mapa integrado foram alinhadas com o genoma, a partir do *blastn*, onde somente o resultado do primeiro melhor alinhamento, com base no *E-value*, foi utilizado para a comparação. Com o intuito de facilitar a visualização dos resultados dos alinhamentos obtidos, de modo a permitir a identificação de sintenias, foi gerada uma visualização gráfica a partir a plataforma <http://mkweb.bcgsc.ca/tableviewer/>. A avaliação da ordem dos marcadores no mapa de ligação com a posição física dos marcadores no genoma foi estimada alinhando-se os nove grupos de ligação com os pseudocromossomos de *C. sinensis*.

4.3.6 Mapeamento de QTLs

Os dados coletados da genotipagem dos marcadores moleculares DArT_seq e SSRs foram utilizados para a construção do mapa genético integrado. Para procurar associação entre genótipo (*Loci* DArT_seq e SSRs) e os dados fenotípicos das análises BLUP foi utilizado o programa *FULLSibQTL* (GAZAFFI et al., 2014).

A estratégia adotada foi a busca no genoma a cada 1 cM, através da abordagem de mapeamento por intervalo composto (CIM) (JANSEN, 1994; ZENG, 1994). Todos os genes encontrados na região genômica entre os marcadores que flanqueavam a região associada à resposta a *A. alternata* foram alinhados com o genoma sequenciado de *C. sinensis*, 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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da resistência a *Alternaria alternata in vitro* em folhas destacadas

Foi avaliado um total de 235 híbridos, dentre os 264 disponíveis para a construção dos mapas, incluídos os genitores H163 e LPA. Como controles foram utilizadas folhas de tangerina Fremont, considerada resistente a MMA, e duas variedades consideradas suscetíveis (sintomáticas), tangerina Dancy e tangor Murcott (AZEVEDO et al., 2015), totalizando 240 avaliações (Tabela1).

Na tabela 1 são apresentados os valores de severidade avaliados por meio da escala de severidade e valores da curva de progresso da doença.

Tabela 1. Severidade (%) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliadas após inoculação de *A. alternata* em híbridos, seus genitores e variedades de citros.

(continuação)																
Genótipos	Horas após inoculação			AACPD	Genótipos	Horas após inoculação			AACPD							
	24 h	48 h	72h			24 h	48 h	72h								
PAx163 174	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	a						
PAx163 175	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	a						
PAx163 177	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	a						
PAx163 179	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	a						
PAx163 33	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	0,3	aA	14,4	a				
PAx163 35	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	3,5	aA	49,2	b		
PAx163 38	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	3,5	aA	49,2	b		
PAx163 39	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	3,5	bB	49,2	b		
PAx163 4	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	1,4	aA	1,4	aA	5,0	bB	109,2	c
PAx163 40	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	3,5	bB	3,5	bB	126,0	c
PAx163 41	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	3,5	bB	3,5	bB	126,0	c
PAx163 42	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	3,5	bB	3,5	bB	129,6	c
PAx163 44	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	10,3	cB	131,2	c
PAx163 45	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	3,5	bB	8,0	cC	183,6	d
PAx163 46	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	3,9	bA	3,9	bA	3,9	bA	188,8	c
PAx163 47	0,0	aA	0,2	aA	0,2	aA	0,0	aA	1,3	aA	3,8	bB	7,7	bC	199,2	c
PAx163 48	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	2,4	bB	12,7	dC	210,9	d
PAx163 49	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,2	aA	3,9	bB	10,3	cC	220,8	d
PAx163 5	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	3,9	bA	3,9	bA	8,8	cB	247,6	d
PAx163 50	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	1,4	aA	5,0	cB	10,3	cC	260,4	d
PAx163 51	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	3,5	bB	15,0	dC	264,0	d
PAx163 52	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	3,5	bB	15,0	dC	264,0	d
PAx163 53	0,3	aA	0,3	aA	0,3	aA	0,0	aA	2,3	bA	5,4	cB	10,1	cC	279,6	d
PAx163 55	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	6,5	cB	12,7	dC	311,6	d
PAx163 57	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	0,3	aA	27,7	fB	342,8	e
PAx163 6	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	8,0	dB	15,0	dC	372,0	e
PAx163 60	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	10,3	dB	10,3	cB	375,6	e
PAx163 61	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	8,0	dB	15,0	dC	375,6	e
PAx163 63	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	5,0	cB	21,3	eC	376,0	e
PAx163 64	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	5,0	cB	21,3	eC	376,0	e
PAx163 65	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	8,0	dB	21,3	eC	451,6	e
PAx163 66	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	12,7	eB	27,7	fC	636,0	f
PAx163 68	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	12,7	eB	27,7	fC	678,0	f
PAx163 7	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	10,3	dB	43,0	hC	767,6	f
PAx163 70	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	15,0	fB	34,0	gC	771,6	f
PAx163 71	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	1,4	aA	10,3	d	43,0	hC	780,4	f
PAx163 72	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	15,0	fB	45,7	hC	908,0	f
PAx163 75	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	12,7	eB	52,0	iC	931,6	f
PAx163 79	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	12,7	eB	64,7	jC	1083,6	g
PAx163 8	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	12,7	eB	64,7	jC	1083,6	g
PAx163 80	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	1,3	aA	16,3	eB	56,7	hC	1087,2	g
PAx163 81	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	15,0	fB	61,0	jC	1095,6	g
PAx163 82	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	1,4	aA	15,0	fB	61,0	jC	1108,4	g
PAx163 83	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	1,4	aA	12,7	eB	73,7	kC	1204,4	g
PAx163 84	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	15,0	fB	80,0	lC	1323,6	h
PAx163 85	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	15,0	fB	80,0	lC	1323,6	h
PAx163 86	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	15,0	fB	80,0	lC	1323,6	h
PAx163 87	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	15,0	fB	80,0	lC	1323,6	h
PAx163 88	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	1,2	aA	21,3	gB	70,7	mC	1374,0	h
PAx163 89	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	3,5	bA	21,3	gB	70,7	kC	1402,0	h
PAx163 90	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	15,0	fB	90,0	mC	1440,0	h
PAx163 91	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	21,3	gB	83,3	lC	1515,6	h
PAx163 94	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	5,4	bA	27,7	hB	73,7	kC	1613,2	i
PAx163 95	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	34,3	hB	67,3	jC	1635,2	h
Pera de A.	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	27,7	hB	86,7	mC	1707,6	i

Tabela 1. Severidade (%) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), avaliadas após inoculação de *A. alternata* em híbridos, seus genitores e variedades de citros.

Genótipos	Horas após inoculação						AACPD	Genótipos	Horas após inoculação						AACPD	(conclusão)	
	24 h		48 h		72h				24 h		48 h		72h				
	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA			0,0	a	0,3	aA	27,7	hB			86,7
TM x LP163	0,0	aA	0,0	aA	0,0	aA	0,0	a	PAx163 227	0,3	aA	27,7	hB	86,7	m	1707,6	i
PAx163 237	0,0	aA	0,0	aA	0,3	aA	3,6	a	PAx163 2	0,3	aA	34,0	iB	76,0	kC	1731,6	i
PAx163 103	0,1	aA	0,1	aA	0,1	aA	4,8	a	PAx163 131	3,5	bA	27,7	hB	86,7	mC	1746,0	i
PAx163 201	0,1	aA	0,1	aA	0,1	aA	4,8	a	Murcott	3,5	bA	34,0	iB	83,3	IC	1858,0	j
PAx163 205	0,1	aA	1,4	aA	5,0	aA	9,4	b	PAx163 17	3,5	bA	34,0	iB	90,0	mC	1938,0	j
PAx163 182	0,2	aA	0,2	aA	0,2	aA	9,6	a	PAx163 256	0,3	aA	36,7	iB	89,0	mC	1951,6	j
PAx163 274	0,2	aA	0,3	aA	0,3	aA	13,2	a	PAx163 3	0,3	aA	34,0	iB	97,0	mC	1983,6	j
PAx163 129	0,3	aA	0,3	aA	0,3	aA	14,4	a	Dancy	5,0	bA	43,0	jB	86,7	mC	2132,0	j
PAx163 207	0,3	aA	0,3	aA	0,3	aA	14,4	a	PAx163 98	0,3	aA	52,0	kB	94,7	mC	2387,6	j
PAx163 230	0,3	aA	0,3	aA	0,3	aA	14,4	a									

Médias seguidas das mesmas letras na coluna (minúscula) e na linha (maiúscula), não diferem entre si pelo teste Scott-knott ($p > 0,05$) testemunhas: tangerina Dancy e tangor Murcott (suscetível); Fremont (resistente) e os genitores LPA e H163.

Na primeira avaliação, após 24 horas da inoculação das folhas destacadas *in vitro*, foram observadas lesões foliares em 54 indivíduos (22,9%) e nas variedades utilizadas como controle positivo (tangor Murcott e tangerina Dancy), como esperado (Figura 4). Após 48 horas da inoculação, além dos 54 indivíduos que já haviam sido considerados sintomáticos, 14 novos híbridos do cruzamento apresentaram sintomas típicos da doença.

Observou-se maior porcentagem de área foliar afetada, nas folhas onde os sintomas, iniciaram-se em 24 horas, a partir da escala diagramática de Martelli (2011) os valores de 0,3% (estágios iniciais), até estágios mais avançados, com 61% da área foliar com sintoma. Após 48 horas de inoculação observou-se um aumento na porcentagem de indivíduos exibindo sintomas, passando de 22,98% (24h) para 28,94% da população.

Em 72 horas, houve o aparecimento de um novo híbrido com sintomas, mas esse fato pode ter sido ocasionado pela murcha foliar, já que em genótipos suscetíveis os sintomas em folhas destacadas aparecem durante as primeiras 48 horas ou segundo dia após a inoculação (CUENCA et al., 2013).

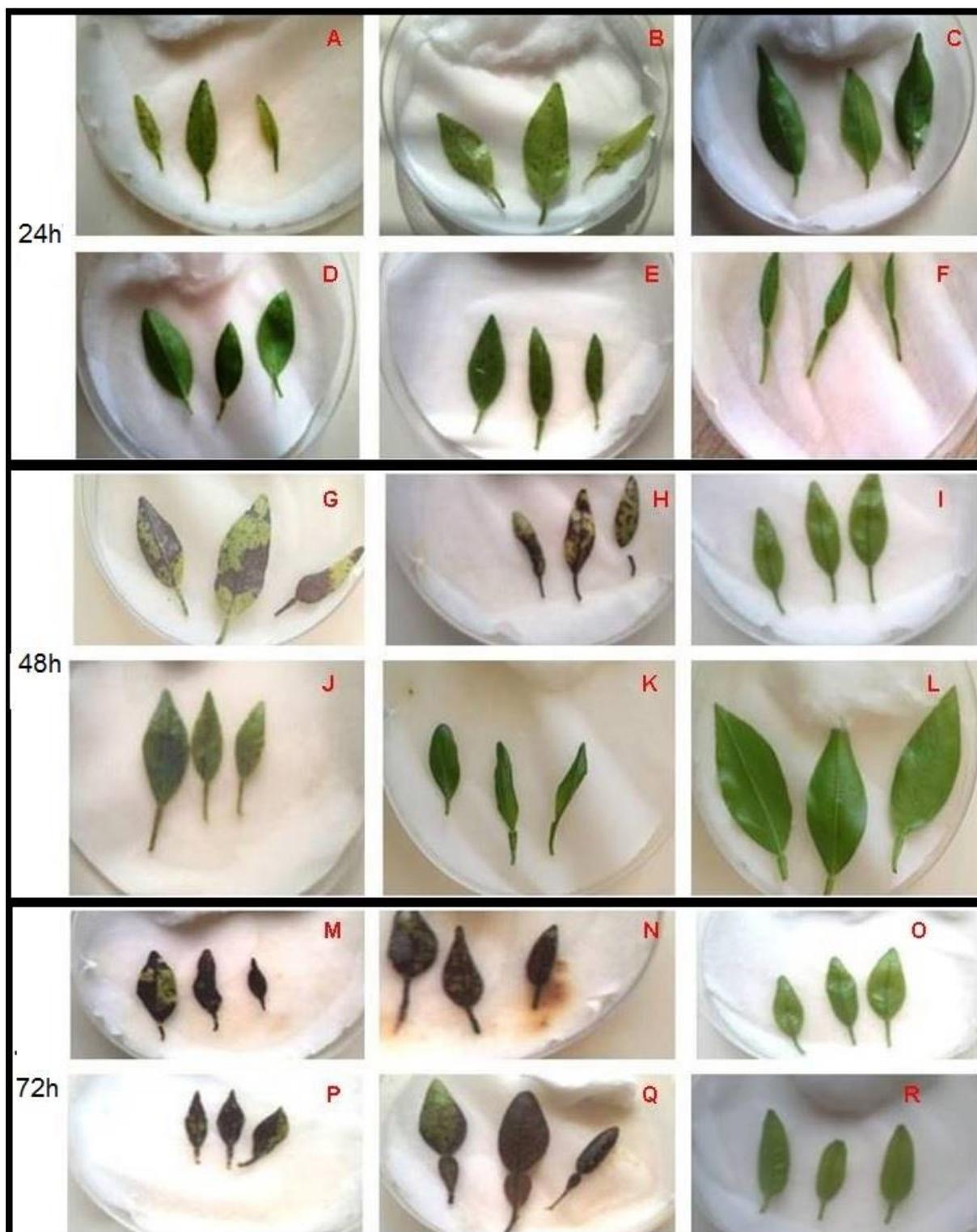


Figura 4. Folhas dos híbridos avaliados mostrando lesões típicas causadas por *A. alternaria*, em 24 horas após a inoculação. A - Dancy (Suscetível - S), B - Murcott (S), C - Fremont (Resistente - R), D - PAX163 85 (R), E - PAX163 67 (S), F- PAX163 131 (S). Em 48 horas, G - Dancy, H - Murcott, I - Fremont, J - PAX163 37 (S), K - PAX163 69 (S) e L, PAX163 269 (R). Em 72 horas, M - Dancy, N - Murcott, O - Fremont, P - PAX163 67 (S), Q - PAX163 268 (S) e R - PAX163 80 (R).

O aumento da severidade, nesta etapa de avaliação, chegou a valores máximos (97%), para o híbrido PAX163 3. A população em estudo apresentou ao final de 72 horas, o total de 165 (70%) de indivíduos assintomáticos e 70 (30%) apresentando diferentes níveis de severidade dos sintomas. Para melhor compreensão do aumento da severidade dos sintomas no tempo, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), de acordo com os valores obtidos elaborou-se um histograma da frequência de distribuição de médias da AACPD de 235 híbridos e seus, com auxílio do *software* R (Figura 5).

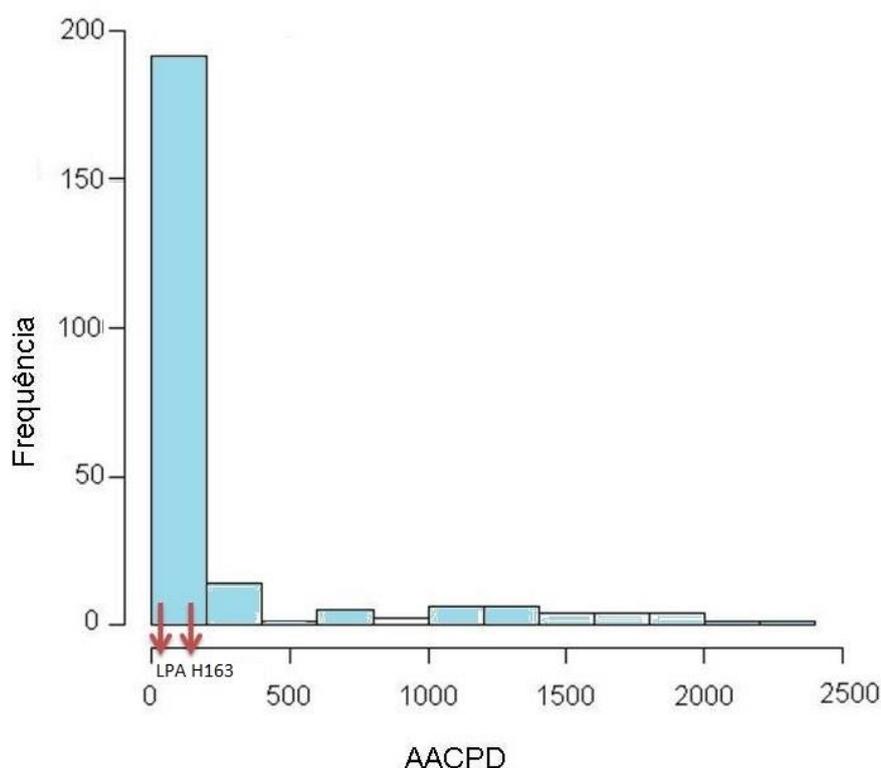


Figura 5. Histograma de frequência de distribuição de médias da AACPD de 235 híbridos e seus genitores.

Os resultados obtidos de severidade de MMA na população em estudo mostram uma segregação mendeliana próxima de 3:1 (165 R:70 S). Essa é a segregação esperada para dois genes independentes e com dominância completa em ambos para o fenótipo suscetibilidade.

As respostas observadas com a inoculação de *A. alternata* foram aquelas esperadas para as variedades de citros, que já foram avaliadas anteriormente, conforme informações descritas por Souza et al. (2009), Azevedo et al. (2010), Pacheco et al. (2012), Cuenca et al. (2013) e Bastianel et al. (2014).

O tangor Murcott e a tangerina Dancy, descrita na literatura como suscetíveis, foram sintomáticos para a MMA, enquanto que a tangerina Fremont foi resistente. Entre os genitores, LPA e o H163 foram assintomáticos, apresentando valores 0 (zero), embora este último eventualmente apresente poucos sintomas em condições de campo (M. Bastianel, informação pessoal).

Já é amplamente descrita na literatura que a toxina do tipo ACT, produzida por *A. alternata*, é específica para uma determinada gama de hospedeiros (KOHMOTO et al., 1991; PEEVER et al., 1999), incluindo variedades de tangerinas e alguns dos seus híbridos. Ainda, tem sido relatado que a suscetibilidade a *A. alternaria* é, provavelmente, de herança simples e dominante (DALKILIC et al., 2005; GULSEN et al., 2010). Assim, alelo 'A' seria dominante para suscetibilidade e 'a' recessivo para a resistência a doença.

Interessantemente, pela análise da progênie em estudo, era esperado para H163, que o mesmo fosse sintomático e suscetível, uma vez que a suscetibilidade foi encontrada na sua descendência quando cruzado com LPA. Por outro lado, por ser uma doença causada por uma toxina específica ao hospedeiro (HST), afetando as tangerinas e não as laranjas doces, ainda se desconhece o genótipo das laranjas doces em relação a *A. alternata*, podendo estas não apresentar o genótipo 'aa', mesmo que apresentem uma relação incompatível planta x fungo. A suscetibilidade esperada do genitor H163 seria herdada do tangor Murcott. Em estudo com populações triplóides com os genitores tangerina Fortune vs tangor Murcott foram avaliados 127 híbridos e nenhum apresentou resistência a *A. alternata* o que confirma a suscetibilidade de tangor Murcott (CUENCA et al., 2013).

Desconhece-se, até o momento, trabalhos envolvendo a avaliação de variedades de laranjas doces para *A. alternata*, sendo que mais estudos devem ser conduzidos para elucidar os mecanismos genéticos envolvidos nas laranjas doces ou em outras variedades que não respondam a especificidade de uma toxina (HST) produzida pelo patógeno. Informações obtidas do mapeamento de QTLs desta progênie vão contribuir para este entendimento.

5.2 Construção do mapa de ligação integrado e mapeamento de QTLs

Após a obtenção dos marcadores DArT_seq e genotipagem por presença e ausência (1/0), pela empresa DArT Pty Ltda, 13.585 marcadores foram disponibilizados. Quanto aos SSRs, 13 marcadores foram genotipados, para cada indivíduo com intuito de construção do mapa de ligação. Com estas 13.598 marcas, a primeira etapa foi a realização do teste de *qui*-quadrado [X^2 ($p \leq 0,05$, $GL=1$)] (STEEL; TORRIE, 1980), com correção de Bonferroni (RICE, 1989).

Os marcadores que apresentaram recombinação nula, ou co-segregação (12.771 DArTs e 5 SSRs), foram retirados das análises, por serem geneticamente redundantes, na população LPA vs H163. A partir dos 814 DArTs e 8 SSRs, procedeu-se uma ordenação preliminar, utilizando o algoritmo RCD (*Rapid chain delineation* – DOERGE, 1996). Desta forma, 729 marcas foram integradas nos grupos de ligação, sendo que 93 marcas não se integraram a nenhum grupo de ligação. Os marcadores exclusivos para cada um dos genitores apresentaram segregação 1:1.

Assim, do total de marcadores utilizados para a construção do mapa integrado, 375 segregaram para o genitor H163, e 157 para o genitor LPA e 196 (23,8%) foram comuns para ambos os genitores. Isto é, estavam em heterozigose nos genitores e, portanto, apresentaram segregação na proporção 3:1 e apenas um marcador apresentou a segregação 1:1:1:1.

Utilizando a função de Kosambi (1944), as distâncias entre os *loci* ligados foram estimadas em centiMorgan (cM), a partir da conversão da frequência de recombinação. Paralelamente, as matrizes gráficas das frações de recombinação e do LOD (*heatmaps*) foram utilizadas para se determinar a ordem final das marcas nos respectivos grupos de ligação. O mapa de ligação integrado resultou em 729 marcas que cobriram nove grupos de ligação (Tabela 2 e Figura 6).

As distâncias entre os marcadores nos grupos de ligação variaram de 0 a 28,7 cM, os comprimentos dos grupos de ligação variaram de 26,5 a 207,5 cM. O comprimento total dos mapas foi de 1.597,1 cM (Tabela 2).

Tabela 2. Número de marcadores e comprimento dos nove grupos de ligação do mapa integrado de LPA vs H163 de acordo com a segregação mendeliana.

Grupos de Ligação	D1*	D2	C	A2	Número de marcadores	Comprimento dos grupos de ligação (cM)
1	19	11	19		50	130,4
2	72	0	3		75	140,0
2b	0	29	14		43	124,5
3	23	16	36		75	140
3b	0	2	10		12	26,5
3c	0	0	2	1	3	32,0
4	0	3	47		50	123,8
5	22	24	15		61	207,5
6	28	2	14		44	86,7
7	4	6	3		13	32,8
7b	15	0	0		15	42,2
7c	63	27	21		110	159,0
8	70	25	11		106	147,5
9	59	12	1		72	204,2
TOTAL	375	157	196	1	729	1.597,1

*D1 (configuração ao x oo) – marcadores informativos para TM x LP 163, D2 (configuração oo x ao) marcadores informativos para o genitor LPA, C os marcadores informativos para ambos genitores com segregação 3:1 (configuração ao x ao) e A2 marcadores informativos (ac x bc).

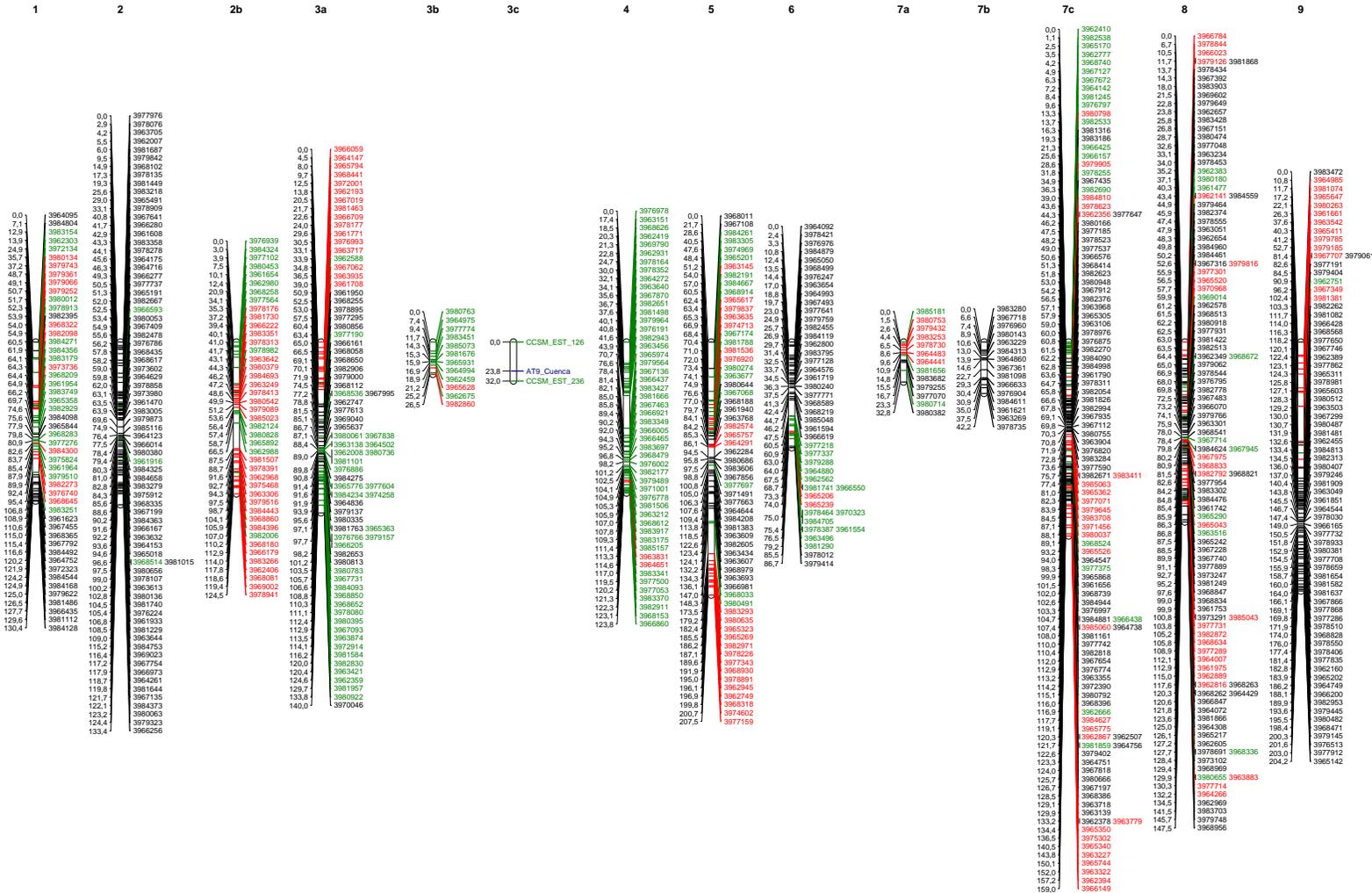


Figura 6. Mapa de ligação gênica integrado de LPA vs H163. Em vermelho marcadores D1 (configuração ao x oo) – marcadores informativos para H163, em verde marcadores D2 (configuração oo x oo) marcadores informativos para o genitor LPA, em verde marcadores C informativos para ambos genitores com segregação 3:1 (configuração ao x ao).

Devido às grandes distâncias entre marcadores, os grupos de ligação 2, 3 e 7 foram subdivididos em subgrupos, e somando-se os subgrupos o GL 2 atingiu um comprimento de 264,5 cM, o GL 3 198,5 cM e o GL 7 234 cM. O maior grupo de ligação foi o GL 2 seguido do GL5 com 207 cM, o GL com maior número de marcadores (110) no sub grupo 7c, seguido do GL 8 (106). Foi adotado para mapeamento *LOD Score* de 8 e a fração de recombinação mínima de 0,3, para que as marcas pertençam ao mesmo GL.

Os mapas integrados representam recursos valiosos, para o mapeamento de QTLs, estudos de sintenia, genômica comparativa, montagem de genoma e clonagem de genes (YAGI et al., 2013). Os mapas genéticos construídos com marcadores codominantes (principalmente SSRs) em citros abrangem cerca de 150 marcadores, enquanto mapas com base em marcadores dominantes, tais como AFLPs, SRAPs ISSRs, RAPDs e incluem um pouco mais de 200 marcadores (OLLITRAULT et al., 2012).

Estes mesmos autores desenvolveram um mapa de referência de densidade média (961 marcadores para 1.084,1 cM) de tangerina Clementina com *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), *Simple Sequence Repeats* (SSR) e marcadores de inserção-deleção (Indel). Os dados de mapeamento confirmaram a hipótese de que a tangerina Clementina surgiu da hibridação entre tangerina do Mediterrâneo (*C. deliciosa*) e a laranja doce. Este mapa genético de referência foi utilizado para a montagem do genoma da tangerina Clementina (OLLITRAULT et al., 2012).

No presente estudo foi utilizada a plataforma DArT_seqTM uma abordagem que combina a genotipagem por sequenciamento com o uso do método de redução da complexidade do genoma (SANSALONI et al., 2011). Desta forma, os marcadores DArT_seqTM fornecem informações sobre sequências e regiões polimórficas com base em um genoma de referência. Este mapa é informativo e serve como base para estudos de localização de QTLs e mapeamento comparativo.

Após a construção do mapa realizou-se o estudo de sintenia para a comparação dos GL do mapa integrado ao genoma sequenciado de *C. sinensis* (Figura 7). O resultado do alinhamento pode ser utilizado, para estimar a eficiência de cobertura genômica, proporcionada pelo mapa. O estudo de sintenia tem sido muito útil para fazer inferências a partir de genomas relacionados sequenciados, essa comparação pode revelar a conservação de agrupamentos gênicos e

sequências regulatórias importantes em determinadas regiões genômicas (VAN STRAALLEN; ROELOFS, 2006).

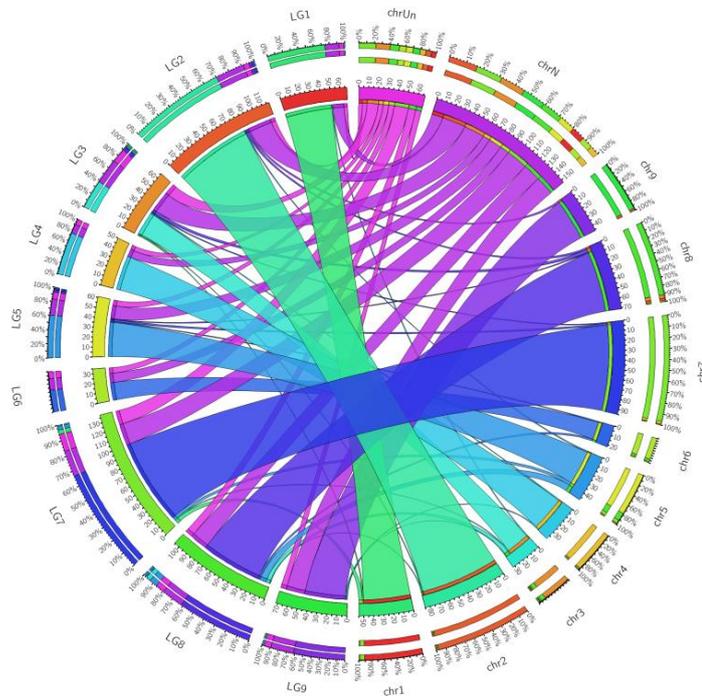


Figura 7. Comparação entre os nove grupos de ligação do mapa integrado de LPA vs H163, com o genoma de *C. sinensis* (*Chr*).

Observou-se valor elevado de herdabilidade de parcelas individuais no sentido amplo (h^2_g) de 0,91 e variabilidade genotípica de 228,25, expressa pelo coeficiente de variação genotípica (CVg_i) (Tabela 3). A estimativa da variância genética entre as médias das progênes foi superior à variância 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 3. Parâmetros genéticos estimados com base em valores de AACPD de 235 híbridos F₁ da progênie do cruzamento laranja Pera de Abril x H163.

Parâmetros Genéticos	AACPD
h^2_g	0,91 ± 0,10
CV _{gi} (%)	228,25
CV _e (%)	70,88
Média Geral	215,86

Legenda: h^2_g herdabilidade de parcelas individuais no sentido amplo, ou seja, dos efeitos genotípicos; CV_{gi} (%): coeficiente de variação genotípica em porcentagem; CV_e (%): coeficiente de variação ambiental em porcentagem; Média: média geral do experimento.

As médias genéticas (valor genotípico predito, $u + g$) foram utilizadas para buscar associação do fenótipo com o genótipo (*Loc*i DArT_seq e SSRs) utilizando-se o programa FullSibQTL (GAZAFFI et al., 2014). De acordo com a análise feita pelo método do Mapeamento por Intervalo Composto (CIM) e o *LOD Score* crítico de 2,6, obtido pelo teste de permutação, foram identificados sete QTLs em sete grupos de ligações diferentes (Tabela 4 e Figura 8). Assim foram encontrados QTLs nos grupos de ligação 2b (98,64 cM), 4 (118,0 cM), 5 (62,43 cM), 6 (81,0 cM), 7c (50,60 cM), 8 (114,94 cM) e 9 (188,05 cM).

De forma geral, os valores de *LOD score* dos QTLs detectados se mantiveram baixos, variaram de 2,74 a 5,62. Os valores de variações fenotípicas (R^2) explicadas pelos QTLs também se mantiveram baixos, variando de 0,17 a 2,83 % e a proporção 1:1 foi a segregação mais presente nos QTLs detectados. Por ser utilizada a abordagem descrita por Gazaffi et al. (2014) outros tipos de segregação, tais como 3:1 e 1:2:1, também foram identificadas.

O QTL mapeado no grupo de ligação 2b a 98,64 cM, explicou 0,77% da variação fenotípica, com padrão de segregação 1:1 e com efeito aditivo significativo para o genitor H163 (q^*). Um QTL foi identificado no grupo de ligação 4 a 118 cM, que responde por 0,17 % da variação fenotípica, com padrão de segregação 3:1 e efeito significativo para ambos genitores. Neste caso, o efeito para H163 está em fase de repulsão.

Um QTL foi identificado no grupo de ligação 5 a 62,43 cM, explicando 0,88 % da variação fenotípica, com padrão de segregação 1:1 e com todos os efeitos genéticos significativos. O QTL identificado no grupo de ligação 6 a 81 cM, responde

por 1,53 % da variação fenotípica, e padrão de segregação 1:1 com efeito aditivo significativo do genitor LPA.

O QTL localizado no grupo de ligação 7c a 50,60 cM, com *LOD Score* de 4,58 e valor de R^2 (1,76%), segregou na proporção 1:1, com efeito significativo de dominância. O QTL detectado no grupo de ligação 8 a 114,94 cM, possui o maior valor de *LOD Score* e R^2 detectados no estudo e ainda é o único que possui segregação 1:2:1.

O QTL detectado no grupo de ligação 9 a 188,05 cM com *LOD Score* de 3,68, apresentou padrão de segregação 1:1 e valor de R^2 de 0,24 %.

Os marcadores SSR utilizados no trabalho de Cuenca et al. (2013) foram empregados no presente trabalho; entretanto, nenhum QTL foi detectado associado a estes marcadores.

Tabela 4. QTLs associados com resistência a *A. alternata*, por análise de mapeamento por intervalo composto na progênie LPA vs H163.

QTL	GL*	cM	Marcadores Flanqueadores	LOD	p*	LOD	q*	LOD	Pq*	LOD	Seg*	R ² (%)
i	2b	98,64	3984443	2,99	-54,09	0,56	77,15	2,17	-42,1	0,36	1:1	0,77
ii	4	118,0	3983341-3977500	3,77	624,95	39,68	-316,84	36,94	Na	Na	3:1	0,17
iii	5	62,43	3965617	2,90	1,37	1,14	-2,13	4,31	-4,96	2,34	1:1	0,88
iv	6	81,0	3981290-3978012	2,74	60,79	1,10	38,97	0,44	-51,26	0,64	1:1	1,53
v	7c	50,60	3966576	4,58	34,72	0,39	24,03	0,18	112,56	4,01	1:1	1,76
vi	8	114,94	3962889	5,62	-25,63	0,24	83,24	2,70	-92,39	3,03	1:2:1	2,83
vii	9	188,05	3966200	3,68	-100,52	3,68	2,66	0,83	-4,40	2,30	1:1	0,24

*GL: grupo de ligação, p: efeito para LPA, q: efeito para H163, pq: interação alélica, Seg. segregação.

No presente trabalho, os marcadores DArT_seq 3984443, 3965617 e 3962889 foram heterozigotos para LPA, os marcadores 3966576 e 3966200 foram heterozigotos para o genitor H163 e os marcadores 3983341-3977500 e 3981290-3978012 estavam presentes em ambos os genitores.

De modo geral, os genitores contribuíram igualmente para a variabilidade da característica. Dos sete QTLs mapeados, somente um QTL teve efeito aditivo apenas para LPA e outro para H163. Além disso, três tiveram o efeito aditivo significativo para ambos os genitores. O efeito de dominância foi detectado em quatro dos QTLs mapeados.

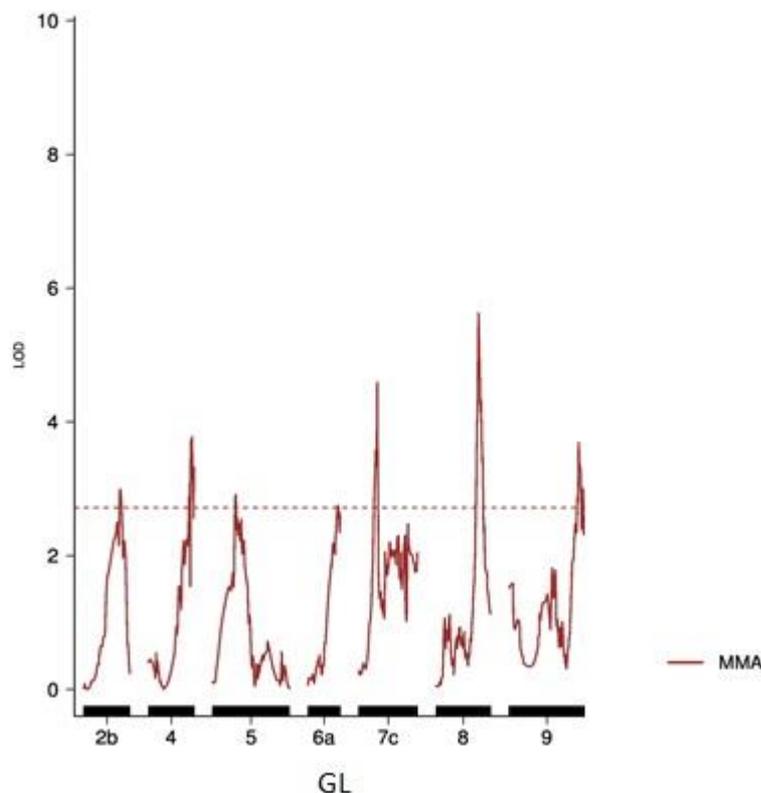


Figura 8 - QTLs associados à resistência *A. alternata*, eixo Y: valor de *LOD Score*; eixo X: grupos de ligação (GL). Linha horizontal: valor de *LOD Score* definido.

5.3 Genes encontrados na região genômica associada à resistência a *A. alternata*

A MMA 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.

Segundo Sweat et al. (2008), as 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. Assim, os patógenos necrotróficos exploram os mecanismos de morte celular do hospedeiro para seu desenvolvimento (OLIVER; SOLOMON, 2010).

Em citros, tem sido relatado que a suscetibilidade MMA, 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.

Na região definida por marcadores flanqueando o *locus* MMA, 33 genes homólogos a genes de resistência a doenças foram encontrados por Cuenca et al. (2013). Estes genes codificam proteínas com um domínio central (NBS). Quinze são homólogos ao *LOV1*, que está 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. Neste trabalho, nas regiões genômicas em que foram localizados os QTLs, foram encontrados genes homólogos a genes de resistência a doenças.

As sequências dos marcadores DArT-seqTM, que flanquearam as regiões genômicas associadas à característica estudada, foram posicionados na atual versão do genoma de referência de *Citrus* (<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/>) e suas coordenadas foram utilizadas para buscar os genes presentes no intervalo (Tabela 5).

Tabela 5 – Grupos de ligação em que foram detectados QTLs, genes encontrados nos intervalos genômicos correspondentes na versão atual do genoma de referência de *Citrus sinensis* e suas funções.

GL	Gene	Função
2b	Cs2g27570.1 (G, PPI)	Putative uncharacterized protein Sb03g004580
4	Cs4g03030.1 (G, PPI)	Putrescine aminotransferase
5	Cs1g07500.1 (G, PPI)	Putative uncharacterized protein (Fragment)
6	Cs9g08770.1 (G, PPI)	Cellulose synthase-like protein G2; Cellulose synthase A catalytic subunit 9 [UDP-forming]; Probable cellulose synthase A catalytic subunit 10 [UDP-forming]; Probable mixed-linked glucan synthase 7; Mixed-linked glucan synthase 2; Putative mixed-linked glucan synthase 1
7c	Cs7g14540.1 (G, PPI)	Probable disease resistance protein At5g63020; Putative disease resistance protein At4g10780; Disease resistance protein RPS5;LRR and NB-ARC domain-containing disease resistance protein
8	Cs1g01460.1 (G, PPI)	Putative uncharacterized protein B1168F12.31
9	Cs9g05180.1 (G, PPI)	Chromosome 4 SCAF14575, whole genome shotgun sequence. (Fragment);NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8-B; NADH-ubiquinone oxidoreductase 20.8 kDa subunit

6. CONCLUSÕES

- A progênie apresentou uma proporção de 3 (165) plantas resistentes para 1 (70) suscetível (3R:1S). Essa é a segregação esperada para dois genes independentes e com dominância completa em ambos para o fenótipo suscetibilidade.
- O mapa integrado de LPA vs H163, com 729 marcas DArT e SSR, em 9 grupos de ligação, corresponde ao número haplóide da espécie, podendo ser considerado um mapa de referência de média densidade e apresenta alto grau de sintonia com os pseudo-cromossomos de *C. sinensis*.
- Foram identificados sete QTLs de pequenos efeitos, explicando até 3% da variação fenotípica da resistência a *A. alternata*, deste o efeito de dominância ocorreu no QTL ii (GL 4), para os alelos de LPA, e nos QTLs, i (GL 2b), vi (GL 8) e vii (GL 9), para os alelos de H163.

7. 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.0-0, 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.

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-JR, J.; BARBOSA, J. C. Progressão e distribuição espacial das principais pragas dos citros. In:

ANDRADE, D.J.; FERREIRA, M. da C.; MARTINELLI, N. M (eds). Aspectos da fitossanidade em citros. Jaboticabal: **Cultura Acadêmica**, p. 31-50, 2014.

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., SHWARDZ, S. F.; COLLETA FILHO, H. D.; LEE, L.L.; MACHADO, M.A.; KOLLER, O. C. Identification of zigotic and nucelar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.21, n.1, p.123-127, 1998.

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.

BASTIANEL, M.; NOVELLI, V.; KUBO, K.; KITAJIMA, E. W.; BASSANEZI, R.; MACHADO, M. A.; FREITAS-ASTÚA, J. Citrus Leprosis: centennial of na unusual mite-virus pathosystem. **Plant Disease**, Saint Paul, v.94, n.3, p. 284-292, 2010.

BASTIANEL, M.; OLIVEIRA, A. C.; CRISTOFANI, M.; GUERREIRO-FILHO, O.; FREITAS-ASTÚA, J.; RODRIGUES, V.; ASTÚA-MONGE, G.; MACHADO, M. A. Inheritance and heritability of resistance to citrus leprosis. **Phytopathology**, Lancaster, v.96, p.1092-1096, 2006.

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, n.1, p.23-31, 2014.

- BERGAMIN, A.F. Curvas de progresso da doença. In: Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3ª ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**, v.1, 602-625, 1995.
- BITANCOURT, A.A. Estudos sobre a leprose dos citros. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.22, p.161-203, 1955.
- BOUVET, J.M; MAKOUANZI, G.; CROS, D.; VIGNERON, P.H. Modeling additive and non-additive effects in a hybrid population using genome-wide genotyping: prediction accuracy implications. **Heredity**, v. 116, n. 2, p. 146-157, 2016.
- CAI, Q. G. C. L.; GUY, C. L.; MOORE, G. A. Extension of the linkage map in *Citrus* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, n. 5, p. 606-614, 1994.
- 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.
- CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, v. 61, n. 2, p. 89-100, 2002.
- CHEN, C.; BOWMAN, K.D.; CHOI, Y.A.; DANG, P.M.; RAO, M.N.; HUANG, S.; SONEJI, J.R.; COLLUM, G.M.; GMITTER, J.F.G. EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2008.
- CHUNG, K.R. Stress response and pathogenicity of the necrotrophic fungal pathogen *Alternaria alternata*. **Scientifica**, v. 2012, 2012.
- CHUTIMANITSAKUN, Y. Construction and application for QTL analysis of a Restriction Site Associated DNA (RAD) linkage map in barley. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 4, 2011.

- COLETTA-FILHO, H. D.; TAKITA, M.; TARGON, M.; CARLOS, E.; MACHADO, M. A. bactéria *Candidatus Liberibacter* em plantas com huanglongbing (ex-greening) no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 25, n. 2, p. 367-374, 2004.
- COLTURATO, A. B. ; PAULOSI, T.; VENÂNCIO, W. S.; FURTADO, E. L., Efficiency and cost of chemical control of alternaria brown spot. **Summa Phytopathologica**, 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-YALY, M.; GOIS, I.; DE RESENDE, M. D. V.; BASTIANEL, M.; NOVELLI, V. M.; MACHADO, M. A. Aplicação da seleção genômica em citros. Piracicaba-SP. 2015.
- 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**, v. 8, n. 10, p. e76755, 2013.
- DALKILIC, Z.; TIMMER, L. W.; GMITTER, F. G. Linkage of an Alternaria disease resistance gene in mandarin hybrids with RAPD fragments. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 130, n. 2, p. 191-195, 2005.
- DANELLI, A. L.; FIALLOS, F. R. G.; TONIN, R. B.; FORCELINI, C. A. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja em função do tratamento químico de sementes e foliar no campo. **Revista Ciencia y Tecnología**, v. 4, n. 2, p. 29-37, 2011.
- DENG, Z.; HUANG, S.; XIAO, S.Y.; GMITTER, F.G. Development and characterization of SCAR markers linked to the citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata*. **Genome**, v. 40, n. 5, p. 697-704, 1997.

- DENG, Z.; HUANG, S.; LING, P.; YU, C.; TAO, Q.; CHEN, C.; WENDELL, M. K.; ZHANG, H. B.; GMMITTER Jr., F. G. Fine genetic mapping and BAC contig development for the citrus tristeza virus resistance gene locus in *Poncirus trifoliata* (Raf.). **Molecular Genetic Genomics**, n. 265, p. 739-747, 2001.
- DOERGE, R.W. Constructing genetic maps by rapid chain delineation. **Journal of Quantitative Trait Loci**, v.2, p.121-132, 1996.
- DOMINGUES, E. T.; TULMANN NETO, A.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Viabilidade de pólen em clones de laranja Pera e outras variedades assemelhadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, p.85-89, 2000.
- DURHAM, R. E. LIOU, P.C.; GMITTER, F.G.; MOORE, G.A. Linkage of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in Citrus. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 84, n. 1-2, p. 39-48, 1992.
- EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WEMDELL, J.F. Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. Numbers, genomic distribution and types of gene action. **Genetics**, v. 116, p. 113-125, 1987.
- 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.
- FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. FAOSTAT. < <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E> > Acesso em: jul. 2016.
- GARCIA, M. R.; ASINS, M. J.; CARBONELL, E. A. QTL analysis of yield and seed number in Citrus. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, n. 3, p. 487-493, 2000.
- GAZAFFI, R.; MARGARIDO, G. R.; PASTINA, M. M.; MOLLINARI, M.; GARCIA, A. A. F. A model for quantitative trait loci mapping, linkage phase, and segregation

pattern estimation for a full-sib progeny. **Tree Genetics & Genomes**, v. 10, n. 4, p. 791-801, 2014.

GMITTER Jr., F. G.; XIAO, S. Y.; HUANG, S.; HU, X. L.; GARNSEY, S. M.; DENG, Z. A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, p. 688-695, 1996.

GONZAGA, D. L.; ROCHA, G. F.; FERREIRA, L. A.; LATADO, R. R. Caracterização de acessos de laranja doce com relação ao número de sementes por frutos, número de embriões e taxa de poliembrionia do BAG-Citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19, 2006, Cabo Frio. Frutas do Brasil. **Saúde para o mundo**. Viçosa: JARD Editora, 2006.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v. 137, n. 4, p. 1121-1137, 1994.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; CARROLL, S. B.; DOEBLEY, J. **Introdução a genética**: In tradução Vanzellotti, I. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 591- 626. 2015.

GUERRA, M.S. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. **Heredity**, v.71, p.234-241, 1993.

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.

DE NEGRI, J.D. Clorose variegada dos Citros: uma nova anomalia afetando pomares em S.Paulo e Minas Gerais . Comunicado Técnico nº 82. Extensão Rural , Coord. Ass. Téc. Integral (CATI) , Campinas, 6p, 1990.

- 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.
- 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.
- JANSEN, R.C.; STAM, P. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. **Genetics**, v. 136, p. 1447-1455, 1994.
- JARRELL, D. C.; ROOSE, M. L.; TRAUGH, S. N.; KUPPER, R. S. A genetic map of citrus based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 84, n. 1-2, p. 49-56, 1992.
- KILIAN, A.; WENZL P.; HUTTNER E.; CARLING J.; XIA L.; BLOIS H.; CAIG V.; HELLER- USZYNSKA, K.; JACCOUD, D.; HOPPER C., ASCHENBRENNER-KILIAN, M.; EVERS, M.; PENG, K.; CAYLA, C.; HOK, P.; USZYNSKI, G. Diversity arrays technology: a generic genome profiling technology on open platforms. **Methods Molecular Biology**, v. 888, p. 67–89, 2012.
- KOHMOTO, K.; OTANI, H. Host recognition by toxigenic plant pathogens. **Experientia**, v. 47, n. 8, p. 755-764, 1991.
- KOSAMBI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. **Annals of Eugenics**, v. 12, n. 1, p. 172-175, 1944.
- LIN, C.H.; YANG, S.L.; CHUNG, K.R. The YAP1 Homolog-Mediated Oxidative Stress Tolerance is Crucial for Pathogenicity of Necrotrophic Fungus *Alternaria alternata* in Citrus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.22, n.8, p.942-952, 2009

- LURO, F.; BOVÉ, J.M.; OLLITRAULT, P. DNA Amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in Citrus. **Horticultural Science**, Alexandria, v.30, n.5, p.1063-1067, 1995.
- MACHADO M. A.; COLETTA-FILHO, H. D.; TARGON, M. L. N.; POMPEU JUNIOR, J. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v.92, p.321-326, 1996.
- MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M. do; OLIVEIRA, A.C. **Genética, melhoramento e biotecnologia de citros**. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. Citros. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, p. 243-246, 2005.
- MARGARIDO G. R. A.; MOLLINARI M.; GARCIA A. A. F. **OneMap tutorial**: software for constructing genetic maps in experimental crosses: full-sib, RILs, F2 and backcrosses. Available: <http://cran.r-project.org/web/packages/onemap/onemap.pdf>. Accessed 27 Sept 2011
- MARGARIDO, G. R. A.; SOUZA, A. P.; GARCIA, A. A. F. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. **Hereditas**, Lund, v.144, p.78-79, 2007.
- MARTELLI, I. B. Manejo da mancha marrom de alternária em citros: poda de limpeza e correlação com a lagarta minadora, Dissertação (Mestrado em Tecnologia da Produção Agrícola) Instituto agronômico de Campinas, Campinas, SP. p.41, 2011.
- MASUNAKA, A.; OHTANI, K.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W.; TSUGE, T.; YAMAMOTO, M.; YAMAMOTO, H.; AKIMITSU, K. An isolate of *Alternaria alternata* that is pathogenic to both tangerines and rough lemon and produces two host-selective toxins, ACT-and ACR-toxins. **Phytopathology**, v. 95, n. 3, p. 241-247, 2005.
- MELLO, S. C.; RIBEIRO, Z. M.; SOUSA, G. R.; TIGANO, M. S.; NACHTIGAL, G. F.; FONTES, E. M. G. Padrões isoenzimáticos e morfologia de isolados de

Alternaria spp. patogênicos a *Senna obtusifolia*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 667-669, 2001.

MENEGON, A. P.; FORCELINI, C. A.; FERNANDES, J. Lesion expansion by barley leaf spots and its interaction with fungicidal sprays. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 134-138, 2005.

MIGUEL, T. V. Reação de genótipos de batata a diferentes isolados de *Alternaria* spp. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, p. 54, 2012.

MIYAMOTO, Y.; MASUNAKA, A.; TSUGE, T.; YAMAMOTO, M.; OHTANI, K.; FUKUMOTO, T.; GOMI, K.; PEEVER, T.L.; AKIMITSU, K. Functional analysis of a multi-copy host-selective ACT-toxin biosynthesis gene in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata* using RNA silencing. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, p. 1591–1599, 2008.

MORINIGO, K. P. G.; FLUMIGNAM, D. L.; de SOUZA-GALLO, A.; SOUZA, M. D.; de FRANÇA-GUIMARÃES, N.; PADOVAN, M.P. Efeito de Leguminosas Herbáceas Perenes Consorciadas com a Cultura da Bananeira na Dinâmica da Umidade do Solo em um Latossolo Vermelho Distrófico Típico em Mato Grosso do Sul. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 4, 2015.

MURRAY, H. C.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v.8, p.4321-4325, 1980.

NOVELLI, V. M.; CRISTOFANI, M.; SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A. development and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, n.1, p.90-96, 2006.

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.

OLIVEIRA, R. P. de **Biotecnologia em citros**, Embrapa Clima Temperado. Documentos, 160, p. 36, 2006.

OLIVEIRA, R. P. DE; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Genetic linkage maps of 'Pera' sweet orange and 'Cravo' mandarin with RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v. 39, n.2, p. 159-165, 2004.

OLIVER, R.P.; SOLOMON, P.S. New developments in pathogenicity and virulence of necrotrophs. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, p. 415–419, 2010.

OLLITRAULT, F.; TEROL, J.; MARTIN, A. A.; PINA, J. A.; NAVARRO, L.; TALON, M.; OLLITRAULT, P. Development of InDel markers from *Citrus clementina* (Rutaceae) BAC-end sequences and interspecific transferability in Citrus. **American Journal of Botany**, v. 99, p.268–273, 2012a.

OLLITRAULT, P.; TEROL, J.; CHEN, C.; FEDERICI, C. T.; LOTFY, S.; HIPPOLYTE, I.; OLLITRAULT, F.; BÉRARD, A.; CHAUVEAU, A.; CUENCA, J.; COSTANTINO, G.; KACAR, Y.; MU, L.; GARCIA-LOR, A.; FROELICHER, Y.; ALEZA, P.; BOLAND, A.; BILLOT, C.; NAVARRO, L.; LURO, F.; ROOSE, M. L.; GMITTER, F. G.; TALON, M.; BRUNEL, D. A reference genetic map of *C. clementina* hort. ex Tan.; citrus evolution inferences from comparative mapping. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 593, 2012b.

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.

PALMIERI, D. A.; NOVELLI, V. M.; BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALY, M.; ASTÚA-MONGE, G.; CARLOS, E. F.; OLIVEIRA, A. C.; MACHADO, M. A. Frequency and distribution of microsatellites from ESTs of citrus. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.30, p.1009-1018, 2007.

PASQUAL, M.; ALVES, G. P.; DUTRA, L. F.; FINOTTI, D. R.; CHAGAS, E. A. In vitro culture of Poncã mandarin immature embryos: MS medium and sucrose concentrations. **Ceres**, v. 49, n. 282, 2015.

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.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.; FIGUEIREDO, J. D.; STUCHI, E. S.; CARDOSO, S. D. B.; MATTOS JUNIOR, D. D. Variedades copas. **Citros**, v. 1, p. 37-60, 2005.

PRATES, H. S. Mancha de alternaria nas tangerinas. **Revista Coopercitrus**, Campinas, n. 205, p. 12-14, 2004.

POMPEU JR, J. Porta-enxertos para citros potencialmente ananizantes. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, n. 1, p. 147-155, 2001.

RAGA, V. BERNET, G.P.; CARBONELL, E. A.; ASINS, M. J. Segregation and linkage analyses in two complex populations derived from the citrus rootstock Cleopatra mandarin. Inheritance of seed reproductive traits. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, n. 5, p. 1061-1071, 2012.

- 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.
- RESENDE, M.D.V.; SILVA, F.F. Estatística Matemática, Biométrica e Computacional: Modelos Mistos e Generalizados (REML/BLUP), Inferência Bayesiana, Regressão Aleatória, Seleção Genômica, QTL-GWAS, Estatística Espacial e Temporal, Competição, Sobrevivência. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa/Departamento de Estatística. 2014.
- RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, p. 223-225, 1989.
- MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: ROSSETI, V.; MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. (eds). Doenças dos citros causadas por algas, bactérias, fungos e vírus. Campinas: Fundação Cargill, 1993. V.2, p. 55-84.
- RODRIGUES, J. I. S.; MIRANDA, F. D, FERREIRA, A.; BORGES, L. L.; FERREIRA, M. F. S.; GOOD-GOD, P. I. V.; PIOVESAN, N. D.; BARROS, E. G.; CRUZ, C. D.; MOREIRA, M. A. Mapeamento de QTL para conteúdos de proteína e óleo em soja. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.45, n.5, p.472-480, maio 2010.
- ROSSETTI, V. Identificação de cancro cítrico. **Biológico**, v. 47, n. 5, p. 145-153, 1981.
- SANSALONI, C.; PETROLI, C.; JACCOUD, D.; CARLING, J.; DETERING, F.; GRATTAPAGLIA, D.; KILIAN, A. Diversity Arrays Technology (DArT) and next-generation sequencing combined: genome-wide, high throughput, highly informative genotyping for molecular breeding of Eucalyptus. **BMC Proceedings**, v.5, n.1, p.54, 2011.
- SANTOS, C. Q. D. J.; GIRARDI, E. A.; VIEIRA, E. L.; LEDO, C. A. D. S.; SOARES FILHO, W. D. S. Optimum sample size of fruits and seeds for polyembryony

determination in citrus. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 1, p. 172-178, 2015.

SCHUSTER, I.; CRUZ, C. D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa: UFV, 2004, p. 279- 304.

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.23-38, 2006.

SIVIERO, A.; CRISTOFANI, M.; BOAVA, L.P.; MACHADO, M.A. Mapeamento de QTLs associados à produção de frutos e semente em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.741-743, 2002.

SOLEL, Z.; KIMCHI, M. Histopathology of infection of minneola tangelo by *Alternaria alternata* pv. *citri* and the effect of host and environmental factors on lesion development. **Journal of Phytopathology**, v. 146, n. 11-12, p. 557-561, 1998.

SOUZA, L. B. Mapeamento genético de híbridos intraespecíficos de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], obtidos por cruzamentos controlados. 2010.66 p. Dissertação de Mestrado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP, Piracicaba, SP.

SOUZA, L. M.; GAZAFFI, R.; MANTELLO, C.C.; SILVA, C.C.; GARCIA, D.; GUEN, G.L.; CARDOSO, S.E.A.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA, A.P.. QTL Mapping of Growth-Related Traits in a Full-Sib Family of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*) Evaluated in a Sub-Tropical Climate. **Plos One**, v. 8, n. 4, 2013.

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.

STELL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. A biometrical approach. 2. ed. New York: McGraw-Hill Book Co., 1980.

STUART, R. M.; BASTIANEL, M. ; BONATTO, J.M.C. ; LABATE, C. A. ; MACHADO, M.A. Leaf proteome analysis of plant-pathogen interaction. In: Annual Meetings of the American Society of Plant Biologists and the Phycological Society of America, 2009, Honolulu. **Plant Biology**, 2009.

STUART, R. M.; KUBO, K.S. ; BOAVA, L. P. ; BASTIANEL, M. ; MACHADO, M.A. . Jasmonic acid and Ethylene signaling pathways are involved in citrus defenses against *A. alternata*. In: OzBio 2010 - The molecules of life: from discovery to biotechnology, 2010, Melbourne. OzBio Combined Conference. Melbourne, p. 243-243, 2010.

STUART, R. M.; BASTIANEL, M. ; AZEVEDO, F. A. ; MACHADO, M.A. *Alternaria* brown spot. **Laranja**, v. 30, 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.

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 mandarins. In: TIMMER, L.H.; GARNSEY, S.M. GRAHAM, J.H. (Eds). 2.ed.

Minnesota: APS Press ST Paul, 2000. v.1, p.19-2000. Compendium of Citrus Diseases.

TOLEDO, E. R.; LEANDRO, R. A.; de SOUZA JUNIOR, C. L.; de SOUZA, A. P. Mapeamento de QTLs: uma abordagem bayesiana. **Revista Brasileira Biomedicina**, v. 26, n. 2, p. 107-114, 2008.

THOMMA, B.P.H.J. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. **Molecular plant pathology**, v.4, n. 4, p. 225-236, 2003.

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, 2013.

VAN STRAALLEN, N. M.; ROELOFS, D. An **introduction to ecological genomics**. Oxford University Press, 2006.

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, n. 1, p. 1-6, 2009.

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** 10:186-198, 2010.

WU, R.; MA, C. X.; PAINTER, I.; ZENG, Z. B. Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species. **Theoretical Population Biology**, San Diego, v.61, p.349-363, 2002.

WU, G. A., PROCHNIK, S., JEMKINS, J., SALSE, J., HELLSTEN, U., MURAT, F., PERRIER, X., RUIZ, M., SCALABRIN, S., TEROL, J., TAKITA, M.A., LABADIE, K., POULAIN, J., JABBARI, K., CATTONARO, F., DEL FABBRO, C., PINOSIO,

S., ZUCCOLO, A., CHAPMAN, J., GRIMWOOD, J., TADEO, F. R., ESTORNELL, L. H., MUÑOZ-SANOZ, J. V., IBANEZ, V., HERRERO-ORTEGA, A., ALEZA, P., PÉREZ-PÉREZ J., RAMÓN, D., BRUNEL, D., LURO, F., CHEN, C., FARMERIE, W. G., DESANY, B., KODIRA, C., MOHIUDDIN, M., HARKINS, T., FREDRIKSON, K., BURNS, P., LOMSADZE, A., BORODOVSKY, M., REFORGIATO, G., FREITAS-ASTÚA, J., QUETIER, F., NAVARRO, L., ROOSE, M., WINCKER, P., SCHMUTZ, J., MORGANTE, M., MACHADO, M. A., TALON, M., JAILLON, O., OLLITRAULT, P., GMITTER, F., ROKHSAR, D. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. **Nature Biotechnology**, Nature Biotechnology, v.32, p.656–662, 2014.

XU, Q.; CHEN, L.-L.; RUAN, X.; CHEN, D.; ZHU, A.; CHEN, C.; BERTRAND, D.; JIAO, W.-B.; HAO, B.-H.; LYON, M. P.; CHEN, J.; GAO, S.; XING, F.; LAN, H.; CHANG, J.-W.; GE, X.; LEI, Y.; HU, Q.; MIAO, Y.; WANG, L.; XIAO, S.; BISWAS, M. K.; ZENG, W.; GUO, F.; CAO, H.; YANG, X.; XU, X.-W.; CHENG, Y.-J.; XU, J.; LIU, J.-H.; LUO, O. J; TANG, Z.; GUO, W.-W.; KUANG, H.; ZHANG, H.-Y.; ROOSE, M. L.; NAGARAJAN, N.; DENG, X.-X.; RUAN, Y. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). **Nature Genetics**, v. 45, n. 1, p. 59-66, 2013.

YAGI, M.; YAMAMOTO, T.; ISOBE, S.; HIRAKAWA, H.; TABATA, S.; TANASE, K.; YAMAGUCHI, H.; ONOZAKI, T. Construction of a reference genetic linkage map for carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). **BMC Genomics**, v. 14, p.734, 2013.

ZENG, Z.B. Precision Mapping of Quantitative Trait Loci. **Genetics**, v. 136, p. 1457-1468, 1994.

ZOU, J.; RAMAN, H.; GUO, S.; HU, D.; WEI, Z.; LUO, Z.; LONG, Y.; SHI, W.; FU, Z.; DU, D.; MENG, J. Constructing a dense genetic linkage map and mapping QTL for the traits of flower development in *Brassica carinata*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 127, n.7, p.1593-1605, 2014.

ZOU, J.; HU, D.; LIU, P.; RAMAN, H.; LIU, Z.; LIU, X.; PARKIN, I.A.P.; CHALHOUB, B.; MENG, J. Co-linearity and divergence of the A subgenome of *Brassica juncea* compared with other *Brassica* species carrying different A subgenomes. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 1, 2015.