

AVALIAÇÃO DE HÍBRIDOS DE TANGERINA CRAVO VS LARANJA PÊRA PARA RESISTÊNCIA A CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS

THUANNY A. **BORGES**¹; MARIÂNGELA C. **YALY**²; JOSÉ A. **DIOGO**³;
EVANDRO H. **SCHINOR**⁴; MARCOS A. **MACHADO**⁵

Nº 11132

RESUMO

O histórico da citricultura brasileira é marcado por uma sucessão de pragas e doenças causadas por diferentes agentes etiológicos. Uma das estratégias utilizadas para superar os problemas relacionados a doenças, em especial nas variedades de porta-enxertos, tem sido a substituição da variedade suscetível por outra mais tolerante ou resistente. Tal estratégia tem possibilitado a manutenção da citricultura em diferentes regiões do mundo, e não é diferente no Brasil. Dentre as várias doenças, destaca-se a clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, quando coloniza os vasos do xilema, afetando o transporte de água e nutrientes do sistema radicular para a copa. Afeta igualmente todas as variedades de laranjas doces e é transmitida por cigarrinhas, por borbulhas e mudas infectadas. As tangerinas são consideradas resistentes. O presente trabalho teve como objetivo principal a avaliação de 76 híbridos do cruzamento entre tangerina Cravo (*Citrus reticulata*) vs laranja Pêra (*C. sinensis*) visando a seleção de plantas resistentes a clorose variegada dos citros (CVC). Dentre as 43 plantas em que foi possível realizar a análise estatística da avaliação dos sintomas, 24 híbridos podem ser considerados suscetíveis e 19 como tolerantes ou resistentes.

ABSTRACT

The history of the Brazilian citrus industry is marked by a succession of pests and diseases caused by different etiological agents. One of the strategies used to overcome problems related to diseases, especially in varieties of rootstock, has been the replacement of the susceptible variety with a more tolerant or resistant. This strategy has enabled the maintenance of the citrus industry in different regions of the world, and is no different in Brazil. Among the various diseases, there is the citrus

¹Bolsista CNPq: Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, CCA/UFSCar, Araras-SP, thuannyborges@hotmail.com

²Orientadora, Pesquisadora, Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis-SP

³Colaborador: Graduando em Biologia, Unicamp, Campinas-SP

⁴Colaborador: Pós-Doutorando, Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis-SP

⁵Colaborador: Pesquisador, Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis-SP

variegated chlorosis (CVC), caused by the bacterium *Xylella fastidiosa*, while colonizing the xylem vessels, affecting the transport of water and nutrients from root to scion. It affects all varieties of sweet oranges and is transmitted by leafhoppers, by infected buds and infected seedlings. Mandarines are considered resistant to CVC. This work had as main objective the assessment of 76 hybrids from crosses between Cravo mandarin (*Citrus. reticulata*) vs. Pêra sweet orange (*C. sinensis*) in order to select plants resistant to citrus variegated chlorosis (CVC). Among the 43 plants which it was possible to perform the statistical analysis of symptom assessment, 24 hybrids can be considered as susceptible and 19 resistant or tolerant.

INTRODUÇÃO

Os citros são plantas perenes, de longo ciclo vegetativo, o que torna o melhoramento genético tradicional um processo longo e trabalhoso. Além desta, existem outras características botânicas e genéticas do grupo que dificultam os programas de melhoramento genético via hibridação e seleção recorrente, tais como: alta heterozigosidade; poliembrionia nucelar adventícia e juvenildade. Por outro lado, a grande facilidade com que indivíduos de diferentes espécies e/ou gêneros se inter cruzam e a ampla diversidade genética apresentada pelos citros, amplia as perspectivas de melhoramento genético via cruzamentos dirigidos (COLETTA-FILHO et al., 2007).

O histórico da citricultura brasileira é marcado por uma sucessão de pragas e doenças causadas por diferentes agentes etiológicos. Uma das estratégias utilizadas para superar os problemas relacionados a doenças, em especial nas variedades de porta-enxertos, tem sido a substituição da variedade suscetível por outra mais tolerante ou resistente. Tal estratégia tem possibilitado a manutenção da citricultura em diferentes regiões do mundo, e não é diferente no Brasil (CAMPOS et al., 2011).

Dentre as várias doenças, destaca-se a clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, quando coloniza os vasos do xilema, afetando o transporte de água e nutrientes do sistema radicular para a copa. Afeta igualmente todas as variedades de laranjas doces e é transmitida por cigarrinhas, por borbulhas e mudas infectadas. As tangerinas são consideradas resistentes (NUNES, 1999).

Os principais sintomas da CVC decorrentes da colonização da *X. fastidiosa* em plantas de laranja doce podem assim ser descritos: *i.* inicialmente há o aparecimento de manchas cloróticas na parte dorsal das folhas correspondendo a pontos marrons

com aspecto de goma na superfície ventral; *ii.* posteriormente, as plantas severamente atacadas apresentam um aspecto de debilidade geral com ramos envassourados, uma superbrotação das gemas e folhas murchas nas horas quentes do dia, mesmo em condições de umidade; *iii.* finalmente, há uma redução drástica no tamanho dos frutos, tornando a planta economicamente inviável. Estes sintomas sugerem haver um entupimento no xilema ocasionando principalmente o bloqueio do transporte de água e nutrientes, resultado, provavelmente, de uma eficiente capacidade de aderência e multiplicação da *X. fastidiosa* nestes vasos condutores (MCELTRONE et al., 2001; MACHADO et al., 2001; MEDINA, 2002).

Tendo em vista a importância de se obter variabilidade como forma de superar problemas, uma das metas do programa de melhoramento do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC tem sido a obtenção de híbridos de porta-enxertos e copas, que visam ampliar o conhecimento sobre a herança da resistência ou suscetibilidade assim como o número de variedades utilizadas na citricultura (MACHADO et al., 2005).

O presente trabalho teve como objetivo principal a avaliação de 76 híbridos do cruzamento entre tangerina Cravo (*C. reticulata*) vs laranja Pêra (*C. sinensis*) visando a seleção de plantas resistentes à clorose variegada dos citros (CVC).

MATERIAL E MÉTODOS

Os genitores e híbridos fazem parte do banco de germoplasma do Centro APTA Citros 'Sylvio Moreira'/IAC, Cordeirópolis, SP. O experimento foi conduzido em condições de campo no Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios da Alta Mogiana, vinculado à Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), em Colina, SP. Os blocos experimentais estão constituídos de 76 plantas [74 híbridos e dois genitores do cruzamento entre tangerina Cravo (*C. reticulata*) vs laranja Pêra (*C. sinensis* Osbeck) com quatro repetições. As plantas apresentavam um ano de idade quando foram inoculadas com *Xylella fastidiosa* através da metodologia de enxertia de borbolhões (segmentos de ramos com duas a três gemas axilares) de uma planta sabidamente infectada por *X. fastidiosa* e sintomática, em casa de vegetação. Após seis meses da inoculação, realizou-se o plantio dos híbridos em campo. O plantio foi realizado em dezembro de 2007.

A detecção molecular de *X. fastidiosa* foi realizada mediante extração do DNA de amostras da nervura central das folhas e reações de amplificação. Para a extração do DNA foram utilizados 150 mg de tecidos das nervuras e pecíolos, os quais foram

triturados no aparelho Tissue Lyser e para a extração foi utilizado o protocolo de Irei et al. (2006). As análises de PCR para o diagnóstico de CVC foram realizadas com os “primers” CVC-1 e 272-2 int. (interno) específicos para *X. fastidiosa* de citros (POOLER & HARTUNG, 1995). Essas análises de PCR foram iniciadas 36 meses após a inoculação. A eletroforese dos produtos amplificados foi realizada em gel de agarose 1,5%. As reações foram visualizadas em gel de agarose 1,5%.

Para a avaliação dos sintomas foi utilizada uma escala de notas composta de seis níveis (0, 1, 2, 3, 4, 5) tendo como base uma escala diagramática (AMORIM et al., 1993). A partir de cada híbrido, foram coletadas seis folhas que receberam notas relativas aos sintomas.

Para as análises estatísticas, os dados de severidade dos sintomas de CVC foram transformados em raiz quadrada e utilizou-se o teste paramétrico Scott Knott (SCOTT & KNOTT, 1974), que separa as médias mediante comparações entre grupos de dados, calculados por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foram avaliados através de análise sintomática e por análise molecular (Figura 1 e Tabela 1) a resistência de híbridos de tangerina Cravo x laranja Pêra à clorose variegada dos citros (CVC) em condições de campo.

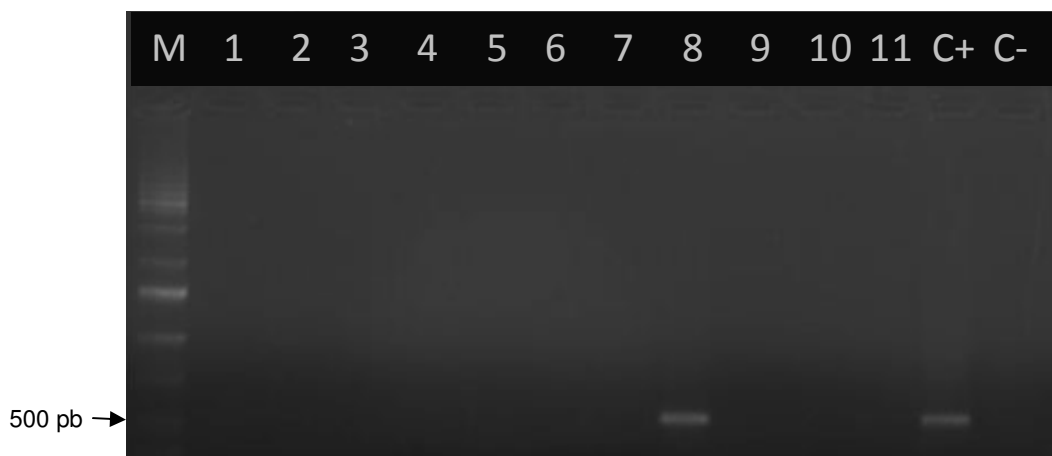


FIGURA 1. Diagnóstico para *Xylella fastidiosa* por PCR. Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5%. M = marcador de peso molecular (Ladder de 1Kb), C+ = controle positivo, C- = água. As banda evidenciam quais amostras (8 e C+) estão infectadas pela bactéria.

De acordo com a tabela 1, podem ser visualizadas plantas resistentes, como os genótipos 31, 56, 70 e 78 já que não apresentaram bactéria tampouco sintomas. A tabela também mostra a presença de plantas tolerantes, ou seja, apesar de apresentarem a bactéria não são plantas sintomáticas. Essas plantas são os genótipos: 53, 60, 68, 72, 74, 81, 89, 94, 95, 96, 101 e 103. Como exemplo de híbridos suscetíveis podem ser citados os genótipos 33, 37, 50 e 88, por apresentarem tanto a presença da bactéria como de sintomas. Dentre as 43 plantas em que foi possível realizar a análise estatística da avaliação dos sintomas, 24 híbridos podem ser considerados suscetíveis e 19 como tolerantes ou resistentes. Resultado semelhante foi obtido por Coletta Filho et al. (2007) em ensaios realizados com inoculação mecânica e em casa de vegetação em híbridos de tangor Murcott e laranja Pêra. Os autores, estudando uma amostra de 20 híbridos, obtiveram três classes de resposta para a doença: plantas suscetíveis (detecção da bactéria e sintomas reconhecidos); plantas tolerantes (detecção da bactéria, mas sem a expressão de sintomas) e plantas resistentes (sem bactéria e sem sintomas).

TABELA 1. Avaliação molecular e sintomática de híbridos de tangerina Cravo x laranja Pêra

Genótipo	Diagnóstico				Sintoma	Genótipo	Diagnóstico				Sintoma
1	0	-	0	0	*	60	-	+	-	-	0 a
3	+	+	+	-	1.77 b	61	-	-	-	+	1.12 b
5	-	+	+	-	3.00 c	62	+	+	0	0	*
6	+	-	-	-	1.22 b	63	0	-	0	0	*
7	-	-	0	0	*	64	0	-	-	0	*
8	-	0	-	0	*	65	0	0	0	0	*
9	-	-	-	+	0 a	66	-	-	-	-	1.39 b
10	-	-	-	-	0 a	68	+	-	+	+	0 a
11	-	0	0	0	*	69	+	0	0	0	*
12	-	-	0	0	*	70	-	-	-	-	0 a
13	-	+	-	0	*	71	-	+	+	+	1.92 b
14	-	+	+	+	1.25 b	72	-	-	+	-	0 a
15	-	0	0	+	*	74	-	-	-	+	0 a
19	-	-	0	0	*	75	+	+	-	+	0.54 a
21	-	+	+	-	1.34 b	76	-	0	0	+	*
23	+	-	+	0	*	78	-	-	-	-	0 a
25	-	0	+	0	*	79	+	+	-	+	1.25 b
26	-	-	0	0	*	80	0	0	0	0	*
30	-	+	-	+	0.96 b	81	-	+	-	-	0 a
31	-	-	-	-	0 a	82	+	0	-	-	*
33	-	+	-	+	4.12 c	84	-	0	0	0	*
34	-	-	-	0	*	85	0	+	-	0	*
35	+	-	-	-	1.46 b	87	+	-	0	0	*
36	-	+	-	-	1.44 b	88	-	+	+	+	1.54 b
37	+	+	+	+	3.04 c	89	+	+	+	-	0 a
42	0	+	0	0	*	90	+	+	-	-	2.94 c
45	-	-	0	0	*	91	-	-	+	-	0.50 a
46	-	-	-	+	0 a	93	-	+	-	+	0.61 a
47	-	0	+	0	*	94	+	-	+	-	0 a
49	-	-	+	-	2.72 c	95	-	-	-	+	0 a
50	+	-	-	+	2.05 c	96	-	-	-	+	0 a
51	-	0	0	0	*	97	-	+	0	+	*
52	-	-	+	-	1.12 b	98	-	-	+	+	3.61 c
53	-	+	-	+	0 a	99	-	0	+	-	*
54	-	+	+	0	*	101	+	+	+	-	0 a
55	0	-	-	0	*	103	-	+	+	-	0 a
56	-	-	-	-	0 a	173	+	0	0	0	*
58	+	-	-	-	2.22 c	358	+	0	0	0	*

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott Knott a 5%.

0 = planta morta

+ = diagnóstico positivo para CVC

- = diagnóstico negativo para CVC

* = indica que não foi realizada análise estatística para esse genótipo devido à ausência das quatro repetições por motivo de morte da planta.

CONCLUSÃO

Podemos concluir que dezenove híbridos de tangerina Cravo e laranja Pêra foram selecionados como resistentes/tolerantes e podem ser incluídos no programa de melhoramento para resistência à clorose variegada dos citros (CVC).

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão de bolsa de IC e ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM L, et al. Clorose variegada dos citros: uma escala diagramática para a avaliação da severidade da doença. **Fitopatologia Brasileira** 18:174-180, 1993.
- CAMPOS, Thomas et al. **Avaliação de híbridos de Limão cravo vs *Poncirus trifoliata* para resistência à gomose de *phytophthora***. Disponível em: <<http://www.cnpm.embrapa.br/5ciic/4ciic/Artigos/RE10138.pdf>>. Acesso em: 05 jul. 2011.
- COLETTA-FILHO HD, et al. Analysis of resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pera sweet orange x Murcott tangor. **Plant Pathology** 56: 661-668, 2007
- FERREIRA DF. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium** 6: 36-41, 2008.
- IREI MS, Gast T, Gottwald T. Comparison of visual assessment and polymerase chain reaction assay testing to estimate the incidence of the huanglongbing pathogen in commercial Florida citrus. **Proc. Fla. State Hortic. Soc.** 42:17-21, 2006.
- MACHADO MA, et al. Genética, Melhoramento e Biotecnologia de citros. In: Citros. Mattos Junior D, De Negri JD, Pio RM, Pompeu Junior J (ed). pp 223-264, 2005
- MACHADO MA, et al. O projeto genoma da *Xylella fastidiosa*. In: Luz, W.C. (ed) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 9, p. 63-77, 2001.
- MCELTRONE AJ, et al. Effects of water stress on symptomatology and growth of *Parthenocissus quinquefolia* infected by *Xylella fastidiosa*. **Plant. Dis.** 85: 1160-1164, 2001.
- MEDINA CL. **Fotossíntese, relações hídricas e alterações bioquímicas em laranja 'Pêra' com CVC e submetida à deficiência hídrica**. Campinas, SP:



(s.n.), 2002. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de biologia. 147p., 2002.

NUNES W M C. **Epidemiologia da clorose variegada dos citros (CVC) avaliada por sintoma e diagnóstico serológico e molecular de *Xylella fastidiosa***. 1999. 144f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1999.

SCOTT AJ & KNOTT M. Acluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics** 30(2): 507-512. 1974.