



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

**ESTUDOS GENÉTICOS EM UMA POPULAÇÃO DE RETROCRUZAMENTO DE CITROS:
SELEÇÃO DE PLANTAS TRIPLÓIDES E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA À MANCHA MARROM
DE ALTERNÁRIA**

Meire E. L. **Sommer**^{1,2a}; Kelly Ap. **Fernandes**^{1,2d}; Marinês **Bastianel**^{3c};

Valdenice M. **Novelli**^{1b}

¹ Centro de Citricultura Sylvio Moreira - IAC, ² Centro Universitário Hermínio Ometto -
Uniararas

Nº 13126

RESUMO - As laranjas doces são as variedades mais produzidas na citricultura brasileira. As tangerinas e seus híbridos apresentam maior importância no mercado de frutas frescas, cujos mercados, interno e externo, são exigentes em frutos que apresentem boas qualidades físico-químicas, boa coloração, fáceis de descascar e com poucas ou desprovidos de sementes. Algumas características agrônômicas desejadas para este grupo de citros são: resistência à mancha marrom de alternaria (MMA), principal doença das tangerinas e produção de frutos sem sementes. A seleção de plantas triplóides se constitui numa importante estratégia para o desenvolvimento de novas variedades comerciais de citros sem sementes nos programas de melhoramento genético para frutos de mesa. Assim, neste estudo foi proposto avaliar uma população de citros, quanto ao nível de ploidia das plantas e resposta à MMA, e selecionar plantas triplóides e/ou resistentes à doença para avaliação no campo.

Palavras-chaves: melhoramento de citros, *Alternaria alternata*, citricultura.

^a Bolsista CNPq: Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas, UNIARARAS, Araras, SP, meiresommer@yahoo.com.br, ^b Orientadora: Valdenice M. Novelli, ^c Co-orientador: Marinês Bastianel, ^d colaborador.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

ABSTRACT- Sweet oranges are the main varieties produced in Brazilian citriculture. Mandarins and their hybrids have higher importance in the of internal and external fruit fresh market, that demand excellent physical and chemical quality, great color, easy to peel and seedless or with few seed. Some agronomic characteristics desired for this citrus group are: resistance to *Alternaria* brown spot (ABS), the main disease of mandarins, and production of seedless fruit. The selection of triploid plants is an important strategy for the development of new commercial seedless citrus varieties in breeding programs for fresh fruit. Thus, this study was designed to evaluate a population of citrus on the ploidy level and plant response to ABS, and select triploid plants and / for further field disease resistance evaluation.

Key-words: Citrus breeding, *Alternaria alternata*, citriculture.

1 INTRODUÇÃO

Poucas variedades de citros têm sido produzidas por métodos tradicionais de melhoramento genético. As limitações devem-se principalmente às características biológicas da cultura, como a poliembrionia, heterozigozidade, longo período de juvenilidade e a ausência de marcadores morfológicos para fazer a seleção de híbridos, necessitando de um longo período de avaliações (MACHADO et al., 2005).

Os representantes dos citros são em sua maioria diplóides, sendo $2n=18$ o número de cromossomos, podendo ser observada a ocorrência espontânea de indivíduos triplóides e tetraplóides (CAMERON; FROST, 1968; IWAMASA; NITO, 1988). Plantas triploides são desejadas, pois produzem frutos sem sementes, uma das características mais importantes para laranjas e tangerinas comercializadas no mercado de fruta fresca. Estudos citogenéticos têm mostrado que durante a meiose de híbridos triplóides de citros, formam-se associações cromossômicas trivalentes, bivalentes e univalentes (CAMERON; FROST, 1968), o que resulta na produção de gametas estéreis. Híbridos triplóides têm sido obtidos de cruzamentos entre parentais diplóides ($2n$), ou entre um parental diplóide ($2n$) x tetraplóide ($4n$) (MACHADO et al., 2005).

A poliploidia de plantas pode ser determinada por diversos métodos. Entre elas podem ser a contagem cromossômica, citometria de fluxo e a avaliação de parâmetros morfológicos ou anatômicos. A metodologia de citometria de fluxo é um método indireto, mas rápido e preciso, para se avaliar ploidia de qualquer planta ou populações vegetais (AKINERDEM, 1991) e permite a



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

avaliação de um grande número de plantas e análise dos diferentes tipos de camadas de tecidos e células. Esta técnica correlaciona a quantidade de DNA diretamente com números de ploidia.

O objetivo do presente estudo foi identificar a frequência de obtenção natural de plantas triplóides em uma população de plantas híbridas de citros, obtidas a partir do cruzamento controlado de um híbrido de tangor Murcott x laranja Pêra (TM x LP 163) com laranja Pêra de Abril, através da técnica de citometria de fluxo. Como as laranjas doces são resistentes à mancha marrom de alternaria (MMA), todas as plantas foram também avaliadas quanto à resposta à doença. As plantas triplóides e/ou resistentes à doença serão multiplicadas e estabelecidas em campo para avaliação futura de características agronômicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Foram avaliadas 533 plantas obtidas do cruzamento TM x LP IAC 163 x Pêra-de-abril IAC mantidas em casa de vegetação, juntamente com seus parentais, utilizados como controle plantas diplóides. Plantas autotetraplóides de laranja Pêra-de-abril (clones 148-2-4n e 148-5-4n) (LATADO et al., 2007) e Buckeye Navel (clone 20-14-4n) foram usadas como controle tetraplóide, todas obtidas em experimentos com uso de colchicina em tratamento *in vitro*. Plantas de tangerina Dancy, altamente suscetível à MMA, e tangerina Fremont, resistente, foram também utilizadas como controle no experimento de resposta à doença.

2.2 Avaliação do nível de ploidia

A ploidia das plantas híbridas e das plantas-controle foi avaliada por meio da técnica de citometria de fluxo em amostras de folhas jovens, mas completamente expandidas, coletadas da parte superior de cada planta. O equipamento utilizado nas análises foi o citômetro de fluxo PAS II-III (Partec GmbH., Alemanha), equipado com lâmpada HBO 100 W e filtros kg1, BG 38 e CG 435. As suspensões nucleares foram isoladas com uso de lâmina de aço afiada (bisturi) e coradas com o tampão do Kit CyStain UV precise T-DAPI (Partec GmbH.), que usa o 4-6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) como fluorocromo, seguindo-se as recomendações do fabricante.

De cada amostra de folha com tamanho aproximado de 0,25 cm² foram avaliados no mínimo 2.000 núcleos intactos, com uso do software CyView (Partec GmbH.) e a seguinte calibração: Gain = 597 e Low Level (LL) = 0,64, que resultaram em histogramas. As amostras cujos



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

coeficientes de variação se situaram acima de 5% foram descartadas. A ploidia das plantas híbridas foi determinada em comparação com amostras de folhas das plantas-controle diplóides e das tetraplóides. Todas as análises foram conduzidas na forma de três repetições por planta.

2.3 Inoculação de *Alternaria alternata*

A inoculação de *Alternaria alternata* foi realizada em laboratório (*in vitro*) seguindo a metodologia descrita por Peever et al. (1999) e adaptada por Azevedo et. al. (2010), a partir de lesões obtidas em plantas de tangor Murcott em campo. Uma suspensão de 10^4 conídios/mL foi borrifada em folhas jovens de todos os híbridos. Folhas de tangerina Dancy, altamente suscetível, e tangerina Fremont, resistente, foram também inoculadas para controle do experimento. Foram utilizadas três folhas por planta, que foram acondicionadas em placa de Petri, com papel filtro e algodão umedecido; borrifando-se cerca de 2 mL de solução de inóculo/placa, na face abaxial das folhas e as mesmas foram mantidas em BOD (27 °C; fotoperíodo 12h). As avaliações da doença foram iniciadas 12 horas após inoculação por quatro dias, através da observação da presença de sintomas típicos da doença e, posteriormente, em determinações da área lesionada (% da folha tomada pela doença), conforme descrito por Martelli (2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De todas as 533 plantas avaliadas, 34 foram identificadas como triploides, totalizando 6,4% da população. Foram consideradas plantas triploides as que tiveram valor de mediana entre 50 e 59 aproximadamente. Estas plantas serão levadas a campo para avaliação de seus frutos, visto que plantas triploides apresentam frutos sem sementes e, sendo assim, estes frutos são melhores aceitos no comércio de frutos de mesa.

Dentre as 533 plantas disponíveis para avaliação, até o momento 180 (33,8%) plantas foram avaliadas quanto à resposta a mancha marrom de alternaria (MMA). As demais estão em avaliação, pois não apresentavam folhas jovens por ocasião das inoculações. Isto se deve ao fato de que, até o momento, a população foi mantida em estufa com uma única planta de cada híbrido, obtida de pé-franco. Cópias destas estão em processo de estabelecimento em porta-enxerto de limão Cravo.

No primeiro dia de avaliação, foram observados sintomas em apenas três dos híbridos avaliados e na planta controle positivo (tangerina Dancy). Após 72 horas da inoculação com o fungo, 29 híbridos (16,12%) foram suscetíveis à MMA, cuja porcentagem de área foliar sintomática



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

variou de 0,3 à 15%, sendo mais tolerantes à doença que a tangerina Dancy, que apresentou na média 31% de área foliar sintomática. A distribuição das médias observadas após 72 horas da inoculação é apresentada na Figura 1. A maior parte dos híbridos apresentou baixo nível de sintomas, entre 0 e 5,2 % de área foliar lesionada.

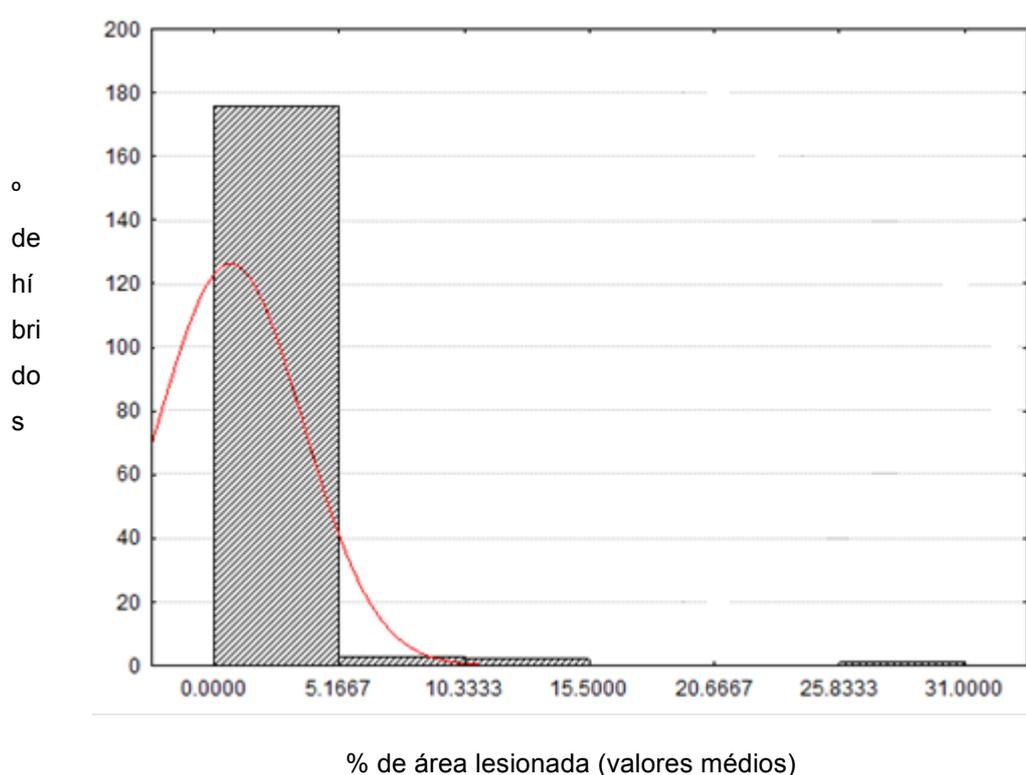


Figura 1. Histograma de distribuição das médias de área foliar (%) com sintomas de mancha marrom de alternaria (MMA), apresentada pelos controles (tangerinas Dancy e Fremont) e 180 híbridos, segundo avaliação realizada pela escala diagramática desenvolvida por Martelli (2011), 72 horas após a inoculação com o fungo.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que, a técnica de citometria é bastante sensível, eficiente e útil no melhoramento de citros para a checagem de ploidia, tendo sido identificados 34 híbridos triplóides neste estudo. Foi possível identificar, dentre todos os híbridos avaliados, 150 plantas assintomáticas e, possivelmente, resistentes à mancha marrom de alternária (MMA) e 29% dos híbridos se mostraram suscetíveis. Estas plantas serão multiplicadas, desafiadas em estudos de campo e caracterizadas agronomicamente.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica e auxílio financeiro (projeto INCT Citros Processo CNPq nº 573848/08-4, FAPESP 08/57909-2). Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira – IAC, pela oportunidade de estágio.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**, Jaboticabal, v.32, p.1-10, 2010.
- Akinerdem, F. Determination of the ploidy level of pure and mixed plant populations of sugar beets (*Beta vulgaris* L.) by flow cytometry. **Plant Breeding**. v.107, p. 333–337, 1991.
- Cameron, J.W.; Frost, H.B. Genetics, breeding and nucellar embryony. In Reuther, W.; Batchelor, L.D.; Webber, H.J. (eds). **The Citrus industry**. Berkeley: University of California Press, v.2, p.325-370, 1968.
- Iwamasa, M.; Nito, N. Citogenetics and the evolution of modern cultivated *Citrus*. **Proceedings of the International Society of Citricultures**, v.1, p.265-275, 1988.
- Latado, R.R.; Cristofani-Yaly, M.; Carvalho, C.R. de; Machado, M.A. Plantas autotetraplóides de citros sob tratamento *in vitro* com colchicina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1429-1435, 2007.
- Machado, MA.; Cristofani, M.; Amaral, A.M.; Oliveira, A.C. **Genética, melhoramento e biotecnologia de citros**. In: Citros. Mattos Jr., D; DE Negri, J.D.; Pio, R.M; Pompeu Jr., J (Eds). Campinas: Instituto Agrônomo e Fundag, 2005. p. 223-264.
- Martelli, I.B. **Manejo de mancha marrom de alternária em citros: poda de limpeza e correlação com lagarta minadora**. Campinas – SP, 2011. 41p. Dissertação (Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical- Instituto Agrônomo de Campinas, IAC).
- 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.