

## Reação de híbridos de citros à clorose variegada

Lilian Massaro Simonetti<sup>1</sup>\*, Mariângela Cristofani-Yaly<sup>1</sup>,  
Evandro Henrique Schinor<sup>1</sup> & Marcos Antonio Machado<sup>1</sup>

### RESUMO

A clorose variegada dos citros (CVC) é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, que é limitada ao xilema e transmitida por meio de borbulhas e por insetos vetores das famílias Cercopidae ou Cicadellidae que se alimentam nos vasos do xilema das plantas. A obtenção de híbridos de citros requer a escolha de genitores com características favoráveis ao melhoramento genético e resistentes a doenças como a CVC. Desta forma, cruzamentos entre laranjeiras doces suscetíveis ao patógeno com variedades resistentes à CVC podem resultar em materiais genéticos promissores. O objetivo do presente trabalho foi avaliar 35 híbridos do cruzamento de tangerineira Cravo (*Citrus reticulata* Blanco) vs. laranjeira Valência [*C. sinensis* (L.) Osbeck] e mexeriqueira do Rio (*C. deliciosa* Ten.) vs laranjeira Pêra (*C. sinensis*) para resistência à clorose variegada dos citros. As avaliações da severidade da CVC foram realizadas através de uma escala diagramática de sintomas e a incidência através da detecção de *X. fastidiosa* via reação em cadeia da polimerase (PCR). Na avaliação por PCR, 62,85% dos híbridos apresentaram resultados negativos, sendo considerados resistentes ao patógeno. As plantas que apresentaram resultado positivo no teste de PCR desenvolveram sintomas em porcentagens variáveis. Os genótipos que não multiplicaram *X. fastidiosa* e aqueles com baixa severidade são promissores em programas de melhoramento genético de citros visando resistência à CVC.

**Termos de indexação:** cruzamentos controlados, CVC, escala diagramática, PCR, *Xylella fastidiosa*.

### SUMMARY

#### Response of citrus hybrids to citrus variegated chlorosis

The citrus variegated chlorosis (CVC) is caused by the bacterium *Xylella fastidiosa*, which is limited to the xylem and transmitted through infected buds or insect vectors of the families Cercopidae or Cicadellidae, which feed in the xylem vessels of plants. Obtaining citrus hybrid requires the choice of parents with favorable characteristics for breeding; once a selected hybrid is resistant to CVC, it must bear fruits of commercial interest as well. Thus, crosses between sweet oranges and resistant varieties may result in promising genetic materials. The aim of this study was to evaluate 35 hybrids from crossings between Cravo mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) x Valencia sweet orange [*C. sinensis* (L.) Osbeck] and the Mediterranean mandarin do Rio (*C. deliciosa* Ten.) x Pêra sweet orange (*C. sinensis*) for resistance to citrus variegated

<sup>1</sup> Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC. Rodovia Anhanguera, km 158, 13490-000, Cordeirópolis-SP

\* Autor para correspondência - E-mail: lilian@centrodecitricultura.br

chlorosis. The evaluations for CVC resistance were conducted by using a diagrammatic scale of symptoms and by detecting *X. fastidiosa* by PCR (polymerase chain reaction). When analyzed by PCR, 62.85% of the hybrids showed negative results. All plants that tested positive for PCR developed symptoms in varying percentages which were assessed through diagrammatic scale evaluations.

**Index terms:** Controlled pollinations, CVC, diagrammatic scale, PCR, *Xylella fastidiosa*.

## INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como o maior produtor mundial de citros e principal exportador de suco de laranja concentrado e congelado há mais de 15 anos (FNP, 2010).

A clorose variegada dos citros (CVC) é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, responsável por outras doenças nas culturas da uva, ameixa e pêssago (Purcell & Hopkins, 1996). O patógeno foi identificado inicialmente no norte do estado de São Paulo (Rossetti & De Negri, 1990) e disseminou-se rapidamente por todas as regiões citrícolas brasileiras, causando sérios prejuízos.

A doença pode ser detectada por observações de sintomas e por métodos de diagnóstico sorológicos e moleculares. Os testes moleculares implicam em maior sensibilidade e precisão detectando cerca de  $10^2$  e  $10^3$  bactérias mL<sup>-1</sup>, sendo, portanto, mais sensíveis que os sorológicos (Minsavage et al., 1994).

Os sintomas da CVC são mais evidentes durante o período seco do ano e surgem primeiramente na parte superior e mediana da copa como amarelecimento de forma variegada, que se inicia por pequenos pontos na face superior das folhas, evoluindo para amarelecimento completo. Na face inferior correspondente, aparecem pequenas pontuações de cor marrom claro, passando para a cor marrom escuro, podendo chegar a manchas necróticas, geralmente nas folhas maduras (Kimati et al., 2005).

O caráter sistêmico da colonização da *X. fastidiosa*, torna extremamente difícil o seu controle. As medidas químicas e fitossanitárias visam à redução temporária do potencial de inóculo, podendo, assim, baixar as taxas de progresso epidemiológico da doença. A obtenção de plantas resistentes à *X. fastidiosa* é preconizada como alternativa mais viável de controle da CVC (Laranjeira, 2002).

Dentro do gênero *Citrus* são encontradas espécies resistentes e suscetíveis à *X. fastidiosa*. As variedades de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] são as mais suscetíveis (Laranjeira et al., 1998; Souza et al., 2000), enquanto que vários genótipos de tangerineiras (*C. reticulata* Blanco), limeiras ácidas [*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle], limoeiros verdadeiros [*C. limon* (L.) Burm. f.], pomeleiros (*C. paradisi* Macfad.) e tangores (*C. sinensis* x *C. reticulata*) são resistentes ou tolerantes à bactéria causadora da CVC (Jaimes et al., 2002; Laranjeira et al., 1998; Oliveira, 2003).

Mourão Filho et al. (1997) relataram que não há uma variedade comercial de laranja doce resistente ou tolerante à CVC. No entanto, Laranjeira (2002) mostrou que, em condições de campo, as variedades de tangerineiras Ponkan (*C. reticulata*), Cravo (*C. reticulata*) e mexeriqueira do Rio (*C. deliciosa* Ten.) não apresentaram sintomas e amostras PCR-positivas para *X. fastidiosa*.

A obtenção de híbridos de citros requer escolha de genitores com características favoráveis ao melhoramento genético, como resistência a pragas e doenças e apresentar frutos de interesse comercial (Mourão Filho et al., 1997). Assim, novos genótipos de citros que combinem qualidade da fruta e resistência à *X. fastidiosa* podem ser amplamente aceitos por parte do produtor rural, além de ser uma medida de controle acessível economicamente a todos os citricultores e benéfica ao meio ambiente, reduzindo o uso de inseticidas (Oliveira, 2003).

Com base na suscetibilidade entre as variedades de laranjeiras doce e na resistência ou tolerância entre as tangerineiras e mexeriqueiras, um programa de melhoramento genético para resistência à CVC foi iniciado em 1997 pelo Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, em Cordeirópolis, SP, visando à obtenção de híbridos pelos cruzamentos de tangerineira e mexeri-

queira com laranjeiras doces. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resistência de 35 híbridos de tangerineira Cravo vs laranjeira Valência (*C. sinensis*) e mexeriqueira do Rio vs laranjeira Pêra (*C. sinensis*) à clorose variegada dos citros.

## MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação da resistência a CVC foi realizada em 35 híbridos e em seus genitores, sendo; 16 de tangerineira Cravo vs. laranjeira Valência (TC x LV) e 19 de mexeriqueira do Rio vs. laranjeira Pêra (MR x LP).

O experimento foi estabelecido em casa de vegetação no Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, em Cordeirópolis, SP, em delineamento inteiramente casualizado com nove repetições e uma planta por parcela, totalizando 351 plantas.

As plantas foram multiplicadas via enxertia em limoeiro Cravo (*C. limonia* Osbeck) e as borbulhas foram obtidas de plantas comprovadamente livres de *X. fastidiosa*. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em sacolas plásticas de 4,0 L contendo substrato Plantmax + Nitrato de Cálcio (3.600 g) e Ferro (0,150g), na primeira adubação, e Sulfato de potássio (0,279g), nitrato de potássio (2.000g), MAP (0,540g), Sulfato de magnésio (0,900g), nitrato de amônio (0,970g), sulfato de zinco (0,040g), sulfato de cobre e sulfato de manganês (0,040g) na segunda adubação e irrigadas diariamente através de sistema de irrigação por gotejamento.

A inoculação das plantas com *X. fastidiosa* foi realizada via enxertia com a utilização de borbulhões de laranjeira Pêra (ramos com duas gemas axilares) infectados com a bactéria.

A análise para detecção molecular de *X. fastidiosa*, nas plantas em avaliação, foi realizada mediante extração do DNA de amostras da nervura central das folhas e reações de amplificação, após 12 meses de inoculação. Aproximadamente 150 mg de nervuras e pecíolos foram trituradas em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino que foi depositado em microtubo sendo que em seguida foram adicionados 700  $\mu$ L de tampão de extração (1% CTAB; 100mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,7 M NaCl; 2% mercaptoetanol). As amostras foram levadas ao “vortex” e incubadas por 30 min a 60°C. Após resfriamento foi adicionado o volume de 700

$\mu$ L de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) ao extrato que foi agitado por 1 min e centrifugado por 8 min a 13.000 x g.

O sobrenadante resultante foi transferido para outro microtubo e adicionado a ele 45  $\mu$ L de CTAB 10% e 450  $\mu$ L de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Agitou-se, novamente, cerca de 80 vezes e centrifugou-se por 8 minutos a 13.000 x g. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e adicionado a este 450  $\mu$ L de tampão de precipitação (1% CTAB; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10mM EDTA). A mistura foi então agitada gentilmente por 1 min e deixada para precipitar por cerca de 30 min à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas durante 8 min a 13.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimentado (“pellet”) resultante dissolvido em 400  $\mu$ L de TE alto sal (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 M NaCl). Posteriormente, o DNA foi precipitado com 800  $\mu$ L de etanol absoluto gelado a -20°C durante uma noite. Dando continuidade à extração, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 13.000 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas primeiramente com etanol 70% e, em seguida, com etanol 100%, sendo os sobrenadantes descartados e os “pellets” deixados para secar em estufa durante 20 min a 50 °C. Finalizando a extração, os “pellets” foram dissolvidos em 80  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O milli-Q contendo 10  $\mu$ g/ $\mu$ L de RNase para eliminação completa de RNA nas amostras.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico de CVC foram preparadas em um volume final de 25  $\mu$ L, constituída de: 14,4  $\mu$ L de água milli-Q autoclavada, 10% de tampão 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8), MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTP (0,08 mM), 20 ng dos “primers” CVC-1e 272-2-int (Pooler & Hartung, 1995), 3  $\mu$ L de DNA total (50 ng) e 1,5 unidades de Taq DNA polimerase. O termociclador foi programado para desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 45 s e 72°C por 45 s, seguido de um ciclo final de extensão de 10 min a 72°C.

As reações foram então visualizadas em gel de agarose 1% preparado com tampão TAE (0,04M Tris-acetato, 1 mM de EDTA) e corado com brometo de etídio (0,5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). As amostras foram aplicadas no gel juntamente com os controles positivo e negativo, além do marcador de peso molecular, ladder de 1Kb.

A corrida foi realizada em tampão TAE 1X por aproximadamente uma hora e as fotos foram realizadas em aparelho de foto documentação sobre luz ultravioleta.

A quantificação da severidade da CVC foi realizada utilizando-se cinco folhas sintomáticas de cada planta inoculada. Na avaliação da severidade da doença foi utilizada uma escala diagramática composta de seis níveis: 3, 6, 15, 25, 35 e 56% de área com clorose conforme Amorim et al. (1993). A avaliação da incidência foi realizada determinando-se a porcentagem de plantas com sintoma em relação ao número total de plantas. 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 DISCUSSÕES

Nas avaliações de híbridos de tangerineira e mexeriqueira vs laranjeiras doce, cerca de 63% dos indivíduos apresentaram resultados negativos e 37% apresentaram resultados positivos após a realização da PCR específica para diagnosticar a presença de *X. fastidiosa* (Figura 1).

Plantas com baixas porcentagens de sintomas foram encontradas tanto em híbridos do cruzamento de tangerineira Cravo vs laranjeira Valência (TC x LV) quanto em híbridos do cruzamento entre mexeriqueira do Rio vs laranjeira Pêra (MR x LP). Os resultados da

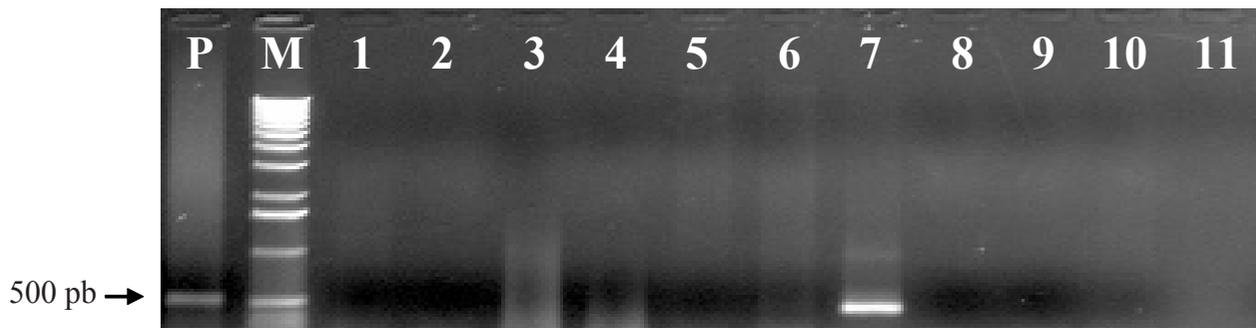
avaliação dos sintomas através da escala diagramática mostraram que os valores das médias de severidade dos sintomas variaram de 5,27% para o híbrido MR x LP 472 a 35,93% para TC x LV 132 (Figura 2) (Tabela 1).

A incidência de plantas com sintomas de CVC, nas repetições de cada híbrido, variou de 22,2% a 100%, com uma média de 64,5% de plantas infectadas, determinadas por PCR, realizada 12 meses após a inoculação, mostrando que a eficiência do método de inoculação empregado no experimento depende da variedade utilizada (Tabela 1).

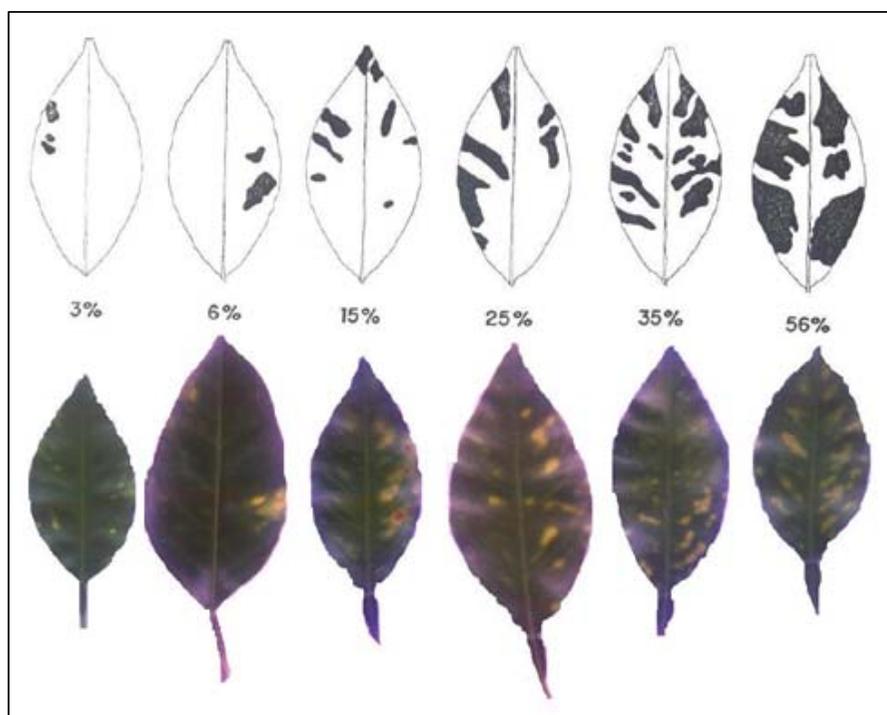
No presente estudo, o tempo decorrido da inoculação ao aparecimento dos sintomas foi em torno de 12 meses. Silva et al. (2004) avaliando tangerineiras, tangores e tangelos em relação à CVC encontraram os primeiros sintomas da doença 23 meses após a inoculação para os híbridos tangor Dweet IVIA-C-165 e Clemelin IVIA 355 e 29 meses para a tangerineira Cami (*C. reticulata* Blanco) utilizando encostia como método de transmissão.

Souza et al. (2000) avaliando alguns genótipos em relação à CVC em condições de casa de vegetação, verificaram que a variedade de tangerineira Cami apresentou sintomas dez meses após a inoculação e foi positiva aos testes de PCR e ELISA.

Coletta-Filho et al. (2007), analisando a resistência à *X. fastidiosa* em uma população de 20 híbridos de tangor Murcott vs laranjeira Pêra (TM x LP), observaram diferenças na expressão da doença, como também constatado para os híbridos TC x LV e MR x LP, observando o aparecimento de sintomas foliares da CVC aos 90, 120 e 180 dias após a inoculação com suspensão bacteriana.



**Figura 1.** Padrão eletroforético das reações de amplificação de região gênica específica para confirmação da presença de *Xylella fastidiosa* em híbridos dos cruzamentos TC x LV e MR x LP. P = controle positivo, a banda de aproximadamente 500 pb evidencia quais amostras estão infectadas; M = Marcador 1kb DNA Ladder (Invitrogen); Amostras de 1 a 6 e de 8 a 10 = negativas para CVC; Amostra 7 = positiva para CVC; Amostra 11 = controle negativo.



**Figura 2.** Comparação dos sintomas foliares observados nos híbridos de mexeriqueira do Rio (*Citrus deliciosa* Ten.) vs laranja Pêra [*C. sinensis* (L) Osbeck] e de tangerineira Cravo (*C. reticulata* Blanco) vs laranja Valência (*C. sinensis*) (abaixo), com a escala diagramática (acima) (Amorim et al., 1993), 12 meses após a inoculação.

**Tabela 1.** Severidade e incidência de CVC em híbridos positivos para PCR

Variedade	Severidade (%)	Incidência (%)
MR x LP 472	5,27 a	22,22
TC x LV 198	10,07 a	33,33
TC x LV 178	13,20 a	28,57
MR x LP 34	13,53 a	66,66
TC x LV 15	14,60 a	85,71
MR x LP 299	15,13 a	44,44
MR x LP 355	17,07 a	85,71
TC x LV 23	19,13 b	100,00
Laranja Valência	20,33 b	85,00
MR x LP 433	20,46 b	50,00
MR x LP 7	27,33 b	87,00
MR x LP 38	27,67 b	77,77
TC x LV 33	29,67 b	88,88
Laranja Pêra	30,67 b	87,00
TC x LV 132	35,93 b	100,00
CV (%)	30,28	

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott (5%).

Os mesmos autores observaram que em cinco dos híbridos os sintomas não foram observados até 210 dias após a inoculação, porém, detectaram a presença da bactéria por PCR, qPCR e plaqueamento em meio PW, sendo classificados como tolerantes; da mesma forma, não foram observados sintomas de CVC em quatro híbridos TM x LP e no genitor tangor Murcott, assim como células bacterianas não foram recuperadas a partir dessas plantas. Esses híbridos foram considerados resistentes à *X. fastidiosa*.

Assim, diferentes reações dos híbridos em relação à *X. fastidiosa* obtidas neste trabalho colaboram com a hipótese da existência de variação genética para resistência em diversas combinações de híbridos de citros à CVC como indicada por Coletta-Filho et al. (2007).

No presente trabalho foram pré-selecionados 22 híbridos de citros que não apresentaram sintomas de CVC e foram PCR negativos para *X. fastidiosa*, sendo dez de tangerineira Cravo vs laranja Valência e 12 de mexeriqueira do Rio vs laranja Pêra, que podem ser classificados como resistentes à bactéria causadora da clorose variegada dos citros. Entretanto, tornam-se necessários estudos de comportamento em campo e a caracterização agrônômica desses híbridos, principalmente no que se diz respeito às características físico-químicas e curvas de maturação dos frutos, resistência a outras doenças como mancha marrom de alternária, mancha preta e leprose dos citros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amorim L, Bergamin Filho A, Palazzo DA, Bassanezi RB, Godoy CV & Torres GAM (1993) Clorose variegada dos citros: uma escala diagramática para a avaliação da severidade da doença. *Fitopatologia Brasileira* 18:174-180.
- Coletta-Filho HD, Pereira EO, Souza AA, Takita MA, Cristofani-Yaly M & Machado MA (2007) Analysis of resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pêra sweet orange x Murcott tangor. *Plant Pathology* 56: 661-668.
- Ferreira DF (2008) SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium* 6: 36-41.
- FNP Consultoria e Comércio Agrícola 2010: anuário estatístico da agricultura brasileira 520p.
- Jaimes EPG, Souza PS & Wickert E (2002) Resistance evaluation to *Xylella fastidiosa* of tangerine germplasm and hybrids introduced from Italy and Corsica. *Revista Brasileira Fruticultura* 24: 579-582.
- Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A & Carmargo LEA (2005) Manual de Fitopatologia Vol 2, Quarta edição, São Paulo-SP, Editora Agronômica Ceres Ltda, p.250-251.
- Laranja FF (2002) Pesquisa: Resistência à CVC. *Cultivar HF* 14:34-37.
- Laranja FF, Pompeu Junior J, Harakava R, Figueiredo JO, Carvalho AS & Coletta-Filho HD (1998) Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condição de campo. *Fitopatologia Brasileira* 23: 147-154.
- Minsavage GV, Thompson CM, Hopkins DL, Leite RMVBC & Stall RE (1994) Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84:456-461.
- Mourão Filho FAA, Coutinho A, Donadio LC, Mendes BMJ & LI W (1997) Melhoramento dos citros para resistência à CVC. In: Donadio LC & Moreira CS (Org.). *Clorose Variegada dos Citros*. 1 ed. Bebedouro: Fundecitrus p.54-74.
- Oliveira AC (2003) Clorose Variegada dos Citros: quantificação molecular do agente causal, avaliação de trocas gasosas de plantas infectadas e mapeamento de locos de resistência quantitativa de citros a *Xylella fastidiosa* Wells et al. (1987) com fAFLPs. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 287p.
- Pooler MR & Hartung JS (1995) Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Current Microbiology* 31: 377-381.
- Purcell A & Hopkins DL (1996) Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 34:131-151.
- Rossetti V & De Negri JD (1990) Clorose variegada dos citros - revisão. *Laranja*, 11(1): 1-14.

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

Silva SR, De Oliveira JC, Stuchi ES, Donadio LC, De Souza OS & González-Jaimes EL (2004) Avaliação de tangerinas, tangores e tangelos em relação à clorose variegada dos citros. *Revista Brasileira de Fruticultura* 26(1): 57-60.

Souza PS, Donadio LC & Gonzalez-Jaimes EP (2000) Avaliação de alguns genótipos de citros em relação à Clorose Variegada dos Citros (CVC). *Revista Brasileira de Fruticultura* 22(2): 148-152.

---

*Recebido: 08/04/2011 – Aceito: 10/10/2011*  
*(CRT 038 -11)*