

DETECÇÃO DE POLIMORFISMO EM PORTA-ENXERTOS PARA CITROS¹

RENATA APARECIDA DE ANDRADE², ANTONIO BALDO GERALDO MARTINS³,
ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS⁴, FRANCISCO JOACI DE FREITAS LUZ⁵, MARCO TÚLIO HABIB SILVA⁶

RESUMO – Objetivando a verificação da existência de plântulas originadas de embrião zigótico em viveiros comerciais de mudas cítricas, realizou-se o presente trabalho, utilizando a técnica de AFLP e quatro espécies de porta-enxertos para citros. Verificou-se uma base genética estreita entre as espécies testadas, além de grande variabilidade entre os materiais, independentemente do viveiro em que foram coletados, o que permite concluir que a seleção visual, comumente realizada nos viveiros, é ineficiente.

Termos para indexação: AFLP; *Citrus limonia*; *Citrus reshni*; *Citrus sunki*; *Citrus paradise x Poncirus trifoliata*.

DETECTION OF POLIMORPHISM IN ROOTSTOCKS FOR CITRUS

ABSTRACT – The purpose of this work was to verify the existence of seedlings originated from the zygotic embryo, in commercial nurseries of citric seedlings. I was used the AFLP technique and four species of citrus rootstocks. It was observed a narrow genetic base among the tested species and also a great variability among the materials, independent of the nursery that they were collected. These results showed that the visual selection, commonly done in the nurseries, is inefficient.

Index terms: AFLP; *Citrus limonia*; *Citrus reshni*; *Citrus sunki*; *Citrus paradise x Poncirus trifoliata*.

INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira representa importante segmento econômico na pauta de produtos agrícolas, não apenas por seu expressivo valor de produção, mas também por sua importância na geração de empregos diretos e indiretos.

Os citros podem ser propagados por sementes, alporquia, estaquia e enxertia, sendo este último o mais utilizado por apresentar algumas vantagens em relação à propagação por sementes, entre as quais uniformidade das mudas, precocidade no início de produção e aumento na produtividade. A propagação dos citros por enxertia é um método misto, que envolve a propagação sexuada do porta-enxerto e assexuada da copa. A interação enxerto/porta-enxerto, embora provoque pequenas alterações no clone, atende às necessidades da cultura, dando à planta vigor, adaptação, resistência e ganhos comerciais. Os pomares comerciais de citros são, portanto, formados por mudas obtidas por enxertia, porém isso tornou os cultivos vulneráveis a enfermidades típicas de plantas enxertadas, como exocorte, xiloporose e declínio dos citros (Castro & Kersten, 1996).

As sementes constituem a forma de reprodução sexuada mais comum entre as plantas, em que os embriões zigóticos são resultantes da fusão de gametas masculinos e femininos. Entretanto, ocorre em algumas espécies uma forma de reprodução assexuada, onde um ou mais embriões são formados, sem redução

do número cromossômico e sem fertilização, caracterizando o fenômeno da apomixia (Nijs & Van Dijk, 1994).

O processo apomítico assemelha-se, em alguns aspectos, a vários eventos da reprodução sexual. Os embriões apomíticos apresentam constituição genética idêntica à planta-mãe, e sua formação ocorre diretamente de células localizadas na estrutura gametofítica ou nas proximidades desta estrutura. O padrão morfológico de formação dos embriões em espécies apomíticas é freqüentemente indistinguível do seu relativo sexual (Nogler, 1984).

O desenvolvimento dos embriões nucelares é morfológicamente similar, senão idêntico, ao desenvolvimento do embrião sexual em *Citrus*. A semente de *Citrus*, cujo óvulo foi fertilizado, poderá ser poliembriônica, contendo embriões em diferentes estádios de maturação, como decorrência de diferentes períodos de iniciação da embriogênese ou, ainda, por competição pelos nutrientes disponíveis. Independentemente da fertilização ou não do óvulo, ocorre um provável sinal do ovário, estimulando o desenvolvimento de embriões nucelares. Por outro lado, o embrião nucelar depende da reprodução sexual para que seja produzido endosperma, que é importante para seu crescimento e desenvolvimento (Koltunow, 1993).

Os primeiros relatos sobre poliembrião foram feitos por Strasburger, em 1878 (Moreira et al., 1947). É caracterizada pela presença de dois ou mais embriões na mesma semente, dos quais,

¹(Trabalho 110-06). Recebido em 01-08-2006. Aceito para publicação em 27-04-2007. Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

² Eng. Agr., Dra. em Agronomia – Pós-doutoranda - UNESP – FCAV – Depto de Tecnologia. Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n. Cep: 14884-900. Jaboticabal-SP. Tel: (16)32092675. e-mail: reandrad@fcav.unesp.br. Bolsista FAPESP.

³ Eng. Agr., Prof. Dr., Departamento de Produção Vegetal. FCAV/UNESP. e-mail: baldo@fcav.unesp.br

⁴ Bióloga, Profa. Titular, Departamento de Tecnologia. FCAV/UNESP. e-mail: egerle@fcav.unesp.br

⁵ Eng. Agr., Msc, Aluno de Pós-Graduação em Agronomia – UNESP – FCAV - Departamento de Produção Vegetal. FCAV/UNESP. e-mail: joaciluz@fcav.unesp.br

⁶ Eng. Agr. – FCAV/UNESP. e-mail: tuliohabib@bol.com.br

na maioria das vezes, apenas um é de origem sexual, sendo os demais de natureza agâmica, provenientes do desenvolvimento de células do nucelo (Gurgel, 1952). A grande maioria das variedades cítricas produz sementes poliembriônicas devido ao forte potencial embriogênico do tecido nucelar do ovário circundante ao saco embrionário, que normalmente origina de um a múltiplos embriões adventícios ao redor do embrião sexual, ao que se denomina embriões adventícia (Koltunow, 1993). O desenvolvimento desses embriões ocorre concomitantemente ao dos embriões sexuais na extremidade micropilar do nucelo, projetando-se para dentro do saco embrionário (Maheshwari & Ranga-Swamy, 1958).

A seleção de plantas pelo viveirista é feita pelo seu vigor, descartando aquelas com menor desenvolvimento vegetativo, considerando-as, possivelmente, resultantes da germinação do embrião zigótico, o que proporciona um elevado índice de mudas com características idênticas às da planta-matriz, justificando a obtenção de porta-enxertos de citros por meio de sementes (Koller, 1994). No entanto, Cristofani & Machado (1998) verificaram, através de caracterização molecular de porta-enxertos de limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck), a ocorrência de germinação de embriões zigóticos, bem como sua posterior seleção. Segundo Schäfer et al. (2004), o fato de os viveiristas costumeiramente formarem suas plantas-matrizes a partir de mudas propagadas por sementes, aumenta a probabilidade de se detectar variabilidade genética.

De acordo com Cervera et al. (1996), as técnicas de marcadores moleculares têm facilitado e potencializado a análise genética de plantas e vêm tornando-se uma ferramenta extremamente útil no melhoramento genético de várias espécies. Os marcadores moleculares têm sido utilizados com o objetivo de avaliar relações genéticas entre cultivares, espécies e híbridos intra e interespecíficos, além de serem usados na construção de mapas genéticos (Ferreira & Gratapaglia, 1998). Dentre os marcadores moleculares de DNA mais usados atualmente, pode-se destacar o polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e minissatélites (VNTR) (Karp et al., 1996).

Diversos trabalhos de identificação de similaridade entre materiais têm sido realizados com as técnicas de marcadores moleculares. Utilizando fAFLP, Scarano et al. (2003) verificaram alta porcentagem de embriões zigóticos (28,57%) na identificação de híbridos entre cruzamentos de *Citrus limon* L. Burm.

Mais do que em outras áreas do desenvolvimento, a pesquisa citrícola não pode deixar de ter continuidade, pois o que determinará o futuro da citricultura é a produtividade e a qualidade dos produtos gerados, fatores que somente poderão ser potencializados com a contribuição da pesquisa. Diante disso, realizou-se o presente trabalho, que teve por objetivo a verificação da existência de plântulas originadas de embrião zigótico, após a realização da seleção visual e "rouging", em viveiros comerciais de mudas cítricas, através de fAFLP (técnica de AFLP, com marcação por fluorescência), para quatro espécies de porta-enxertos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção do material

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Produção Vegetal e no Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e de Plantas do Departamento de Tecnologia, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Câmpus de Jaboticabal-SP, utilizando quatro espécies de porta-enxertos para citros: Limão Cravo (*Citrus limonia*), Tangerina Sunki (*Citrus sunki*), Tangerina Cleópatra (*Citrus reshni*) e Citrumelo Swingle (*Citrus paradise x Poncirus trifoliata*), obtidos junto a viveiros comerciais do Estado de São Paulo, localizados nas cidades de Sales de Oliveira, Bebedouro e Matão. Os porta-enxertos foram coletados aleatoriamente e em número variável, dependendo da disponibilidade de material em cada viveiro. A seleção foi realizada após o "rouging" (seleção visual onde se deixa apenas uma plântula por tubete, considerando a mais vigorosa e com características da espécie como de origem nucelar) pelos viveiristas. Para a realização do experimento, os viveiros foram denominados, de maneira aleatória, como 1, 2 e 3. Para cada espécie, coletaram-se amostras de planta-matriz, no Banco Ativo de Germoplasma da FCAV – Unesp – Jaboticabal-SP, sendo utilizadas como parâmetro, para efeito de comparação com os materiais.

2. Preparo do material e extração de DNA

A etapa de preparação do material para extração de DNA consistiu em seleção das folhas (jovens, sem manchas ou perfurações), as quais foram lavadas em água corrente e retiradas as nervuras, secas e maceradas em nitrogênio líquido, sendo armazenadas em recipientes hermeticamente fechados e acondicionadas em freezer. A extração de DNA genômico dos tecidos vegetais foi realizada segundo Ferreira & Gratapaglia (1998), e a quantificação, efetuada em Biofotômetro, com leitura de absorbância medida em 260 e 280 nm, sendo a verificação da pureza do DNA realizada segundo critérios de qualidade descritos por Sambrook et al. (1989).

3. Testes de "primers"

Os testes de combinação de "primers" foram realizados utilizando-se amostras aleatórias dos materiais, bem como das plantas-matrizes, objetivando identificar a combinação de pares de "primers" com o melhor padrão de bandas, maior número de bandas polimórficas e bom padrão de qualidade de imagem do gel. Os "primers" testados foram: ACC – CAA (Ned – fluorescência amarela); AAG – CAG (Joe – fluorescência verde) e ACC – CAC (Ned), sendo este último o escolhido para a realização das análises em todos os materiais.

4. Análise dos resultados

Após a obtenção do material genético, foi realizada análise visando à detecção de polimorfismo nos materiais utilizados, por fAFLP, segundo o protocolo AFLP (1997), seguindo as etapas: digestão do DNA; ligação dos adaptadores; amplificação pré-

seletiva; amplificação seletiva, e eletroforese no seqüenciador ABI PRISM 377 DNA Sequencer, utilizando padrão interno de peso molecular Gene Scan-500 ROX, com 15 fragmentos, nos comprimentos em pares de bases (pb): 50; 75; 100; 139; 150; 160; 200; 250; 300; 340; 350; 400; 450; 490 e 500.

Após a amplificação, os dados foram obtidos através do programa “GeneScan Analysis Software” (Applied Biosystems®) e construída uma tabela binária, analisando ausência e presença de banda, codificada por 0 e 1, respectivamente, com o auxílio do “Genotyper DNA Fragment Analysis Software” (Applied Biosystems®), comparando os materiais com suas respectivas plantas-matrizes. Os dendrogramas foram obtidos utilizando-se do programa “Paup” (Paup 4.0b10), através do método de agrupamento UPGMA e da opção de distância Jukes-Cantor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A construção do dendrograma, visando à comparação entre as matrizes (Figura 1), permite observar que a distância genética existente entre as diferentes espécies de porta-enxertos é baixa, ou seja, evidenciam uma base genética estreita. Isto torna os resultados obtidos neste experimento ainda mais significativos, constatando grande variabilidade entre os materiais, refletindo em desuniformidade das mudas e, conseqüentemente, dos pomares. Tal fato pode explicar diferentes respostas verificadas em condições de campo em um pomar onde foi utilizada uma mesma combinação de porta-enxerto e enxerto. A variabilidade é fato importante quando se objetiva seleção de materiais visando a programas de melhoramento; no entanto, em pomares comerciais, é desejável uniformidade, garantia da qualidade e características do material que se está utilizando.

Observando-se os dendrogramas obtidos para os porta-enxertos estudados, é possível verificar uma grande variabilidade tanto dos materiais entre si, como de cada material quando comparado à planta-matriz. Tais resultados foram observados, independentemente do viveiro onde foram coletadas as plântulas, o que permite inferir-se que esse “erro” na seleção visual e a presença de zigóticos entre as plântulas, após o “rouging”, ocorrem de maneira generalizada. Relato semelhante foi realizado por Fang & Roose (1997), os quais abordaram a dificuldade de distinção, baseada apenas em características morfológicas, entre cultivares de citros, bem como de porta-enxertos, particularmente em condições de viveiro. A identificação de cultivares de citros utilizando uma pequena amostra de folhas ou tecidos vegetativos, poderia auxiliar nessa identificação, garantindo a qualidade das mudas produzidas. Federici et al. (1998), estudando a relação entre 88 acessos, representando 45 espécies de citros, através de análises de RFLP e RAPD, observaram que muitos acessos estão provavelmente relacionados a espécies erradas, o que vem a acordar com dados obtidos no presente trabalho e evidenciando a ocorrência da variabilidade.

No dendrograma obtido para tangerina Cleópatra (Figura 2),

é possível verificar que, embora os materiais estejam dentro de um mesmo “grande grupo”, há subdivisões, de acordo com as distâncias genéticas, observando-se então a grande diversidade entre os materiais, chegando a atingir 12%, aproximadamente. Foram encontrados materiais idênticos entre si – acessos 1 - 8 e 5 - 6. Vale salientar que os materiais de tangerina Cleópatra utilizados no experimento foram coletados em apenas um viveiro.

O dendrograma do Citrumelo Swingle (Figura 3) permite observar a divisão dos materiais em vários grupos menores, porém predominando dois grandes grupos. Há materiais idênticos, inclusive de viveiros distintos (acessos 16, 17 e 14; 13 e 21; 4, 6, 7, 8 e 9; 12 e 26; 11, 18, 22 e 28; 19, 20 e 25), mas há grande quantidade de materiais diferentes entre si e da planta-matriz, atingindo-se uma diversidade de aproximadamente 18%.

Pelo dendrograma obtido para o limão Cravo (Figura 4), observa-se uma grande divisão dos materiais em subgrupos, porém não se verificou a presença de nenhum material no mesmo grupo formado pela matriz, mostrando uma grande variabilidade entre os materiais. Para este porta-enxerto, que é o mais utilizado na citricultura, observaram-se as maiores taxas de dissimilaridade, podendo chegar a aproximadamente 22%. Da mesma maneira que o observado para Citrumelo Swingle, houve materiais idênticos, embora coletados em diferentes viveiros (3, 12 e 1; 14 e 17; 8 e 16) e distinção entre materiais de um mesmo viveiro.

O dendrograma da tangerina Sunki (Figura 5) permite verificar, como relatado para os porta-enxertos anteriores, materiais idênticos, oriundos de viveiros diferentes (10 e 11; 6 e 7; 4, 16 e 19), porém grande variabilidade de maneira geral, entre os materiais, inclusive de um mesmo viveiro e quando comparados à planta-matriz. Neste caso, verificou-se também a presença de um grande grupo de materiais, porém subdividido em vários grupos menores, e a dissimilaridade observada foi de aproximadamente 17%.

A diversidade entre materiais pertencentes a uma mesma espécie foi também relatada por Coletta Filho et al. (2000), os quais, utilizando RAPD para avaliar a variabilidade entre 19 acessos de tangerinas pertencentes ao grupo das Poncã, verificaram que, dos 112 produtos de amplificação selecionados, 32 foram polimórficos, embora este polimorfismo estivesse restrito a 5 acessos. Nos 14 acessos restantes, não pôde ser detectada qualquer variabilidade genética, sugerindo que estes podem ser resultado de propagação clonal da tangerina Poncã, porém adquirindo diferentes nomes regionais ao longo do tempo ou, então, por outro lado, a técnica RAPD utilizada pode não ter detectado qualquer mutação ocorrida. Alta taxa de dissimilaridade foi ainda observada por Bastianel et al. (1998), utilizando RAPD para distinguir plântulas nucelares e zigóticas resultantes do cruzamento entre as tangerineiras ‘Montenegrina’ (*Citrus deliciosa* Tenore) e ‘King’ (*C. nobilis* Loureiro), identificando 54 plantas de origem sexual de um total de 202 indivíduos, sendo que a análise de agrupamento com os parentais e a progênie separou os indivíduos em grupos distintos com uma dissimilaridade genética máxima de 20%.

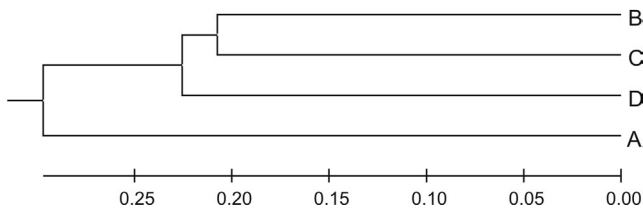


FIGURA 1 - Dendrograma para comparação de distância genética entre matrizes de porta-enxertos para citros – UPGMA (A = tangerina Cleópatra – *Citrus reshni*; B = limão Cravo – *Citrus limonia*; C = Citrumelo Swingle – *Citrus paradise* x *Poncirus trifoliata*; D = tangerina Sunki – *Citrus sunki*).

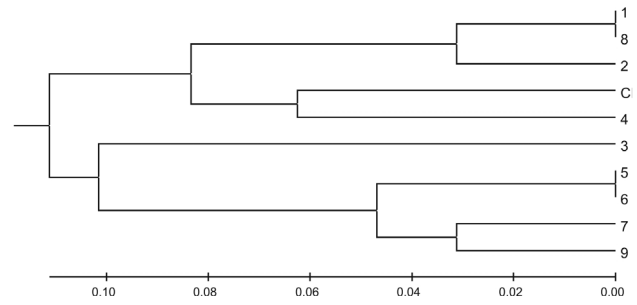


FIGURA 2 - Dendrograma de distância genética obtido para tangerina Cleópatra – UPGMA. (CL – matriz; 1 a 9 – materiais coletados no viveiro 1). Materiais nucleares: 1 e 8; 5 e 6.

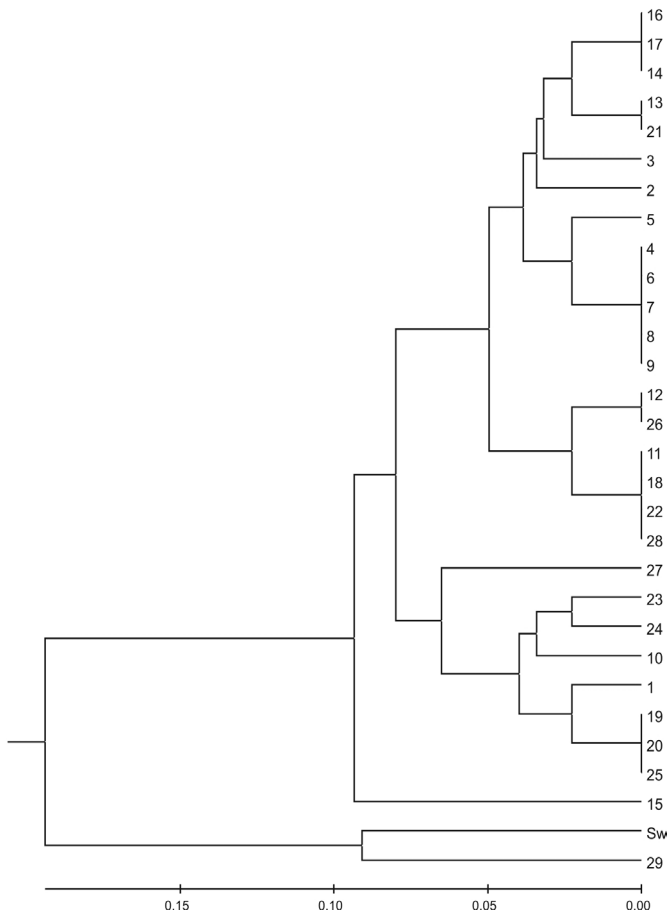


FIGURA 3 - Dendrograma de distância genética obtido para Citrumelo Swingle – UPGMA. (SW – matriz; 1 a 9 – materiais coletados no viveiro 1; 10 a 19 – viveiro 2; 20 a 29 – viveiro 3). Materiais nucleares: 16, 17 e 14; 13 e 21; 4, 6, 7, 8 e 9; 12 e 26; 11, 18, 22 e 28; 19, 20 e 25.

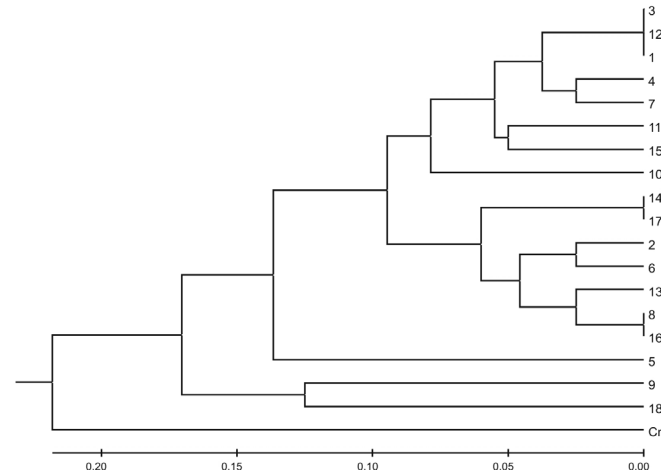


FIGURA 4 - Dendrograma de distância genética obtido para limão Cravo – UPGMA. (Cr – matriz; 1 a 9 – material coletado no viveiro 1; 10 a 18 – viveiro 2). Materiais nucleares: 3, 12 e 1; 14 e 17; 8 e 16.

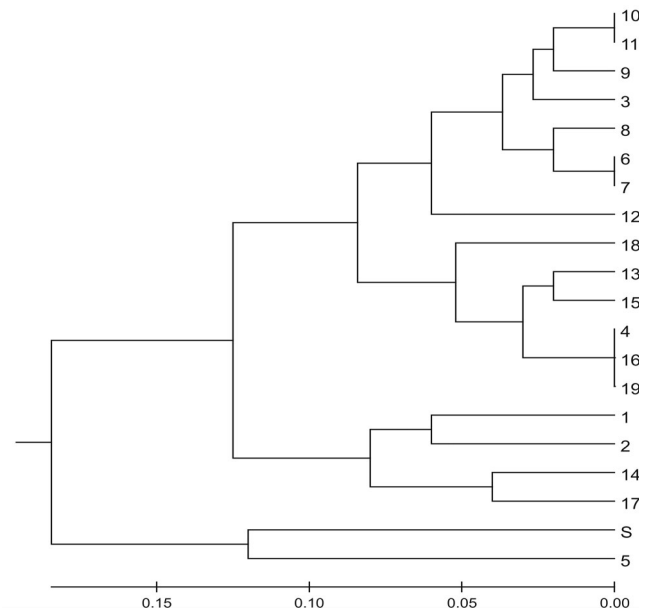


FIGURA 5 - Dendrograma de distância genética obtido para tangerina Sunki – UPGMA. (S – matriz; 1 a 10 – materiais coletados no viveiro 2; 11 a 19 – viveiro 3). Materiais nucleares: 10 e 11; 6 e 7; 4, 16 e 19.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados aqui obtidos, pode-se concluir que a seleção visual realizada em alguns viveiros comerciais de produção de mudas cítricas, quanto à eliminação de plântulas zigóticas, mantendo-se apenas “seedlings” nucelares, é ineficiente, uma vez que, do total de 79 plantas avaliadas, apenas 42 mostraram-se nucelares, ou seja, 47%.

REFERÊNCIAS

- APPLIED BIOSYSTEMS-PE. **AFLP plant mapping protocol**. 1997. 45p.
- BASTIANEL, M.; SCHWARZ, S.F.; COLETTA FILHO, H.D.; LIN, L.L.; MACHADO, M.A.; KOLLER, O.C. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.21, n.1, março 1998.
- CASTRO, A.M.; KERSTEN, E. Influência do anelamento e estiolamento de ramos na propagação da laranjeira Valência (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) através de estacas. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.53, n.2/3, p.199-203, 1996.
- CERVERA, M.T.; GUSMÃO, J.; STEENACKERS, M.; VANGYSEL, A.; VANMONTAGU, M.; BOERJAN, W. Application of AFLP™-based molecular markers to breeding of *Populus* spp. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.20, n.1, p.47-52, 1996.
- COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; TARGON, M.L.P.N.; POMPEU JR, J. The use of random amplified polymorphic DNA to evaluate the genetic variability of Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) accessions. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.1, p.169-172, 2000.
- CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Utilização de marcadores moleculares na identificação de plântulas zigóticas e nucelares em sementeiras de limão ‘Cravo’. **Laranja**, Cordeirópolis, v.19, n.1, p.159-66, 1998.
- FANG, D.Q.; ROOSE, M.L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.95, p.408-417, 1997.
- FEDERICI, C.T.; FANG, D.Q.; SCORA, R.W.; ROOSE, M.L. Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.96, p. 812-822, 1998.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 1998. 220p.
- GURGEL, J.T.A. Poliembrião e embriogenia adventícia em *Citrus*, *Mangifera* e *Eugenia*. **Dusenya**, Curitiba, v.6, p.443-450, 1952.
- KARP, A.; SEBERG, BUIATTI, M. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. **Annals of Botany**, London, v.78, n.2, p.143-149, 1996.
- KOLLER, O.C. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. Porto Alegre: Rigel, 1994. 446p.
- KOLTUNOW, A.M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **Plant Cell**, Rockville, v.5, p.1245-1467, 1993.
- MAHESHWARI, P.; RANGA-SWAMY, N.S. Polyembryony and *in vitro* culture of embryos of *Citrus* and *Mangifera*. **The Indian Journal of Horticulture**, Bangalore, v.15, p.175-282, 1958.
- MOREIRA, S.; GURGEL, J.T.A.; ARRUDA, L.F. Poliembrião em *Citrus*. **Bragantia**, Campinas, v.7, n.3, p.69-106, 1947.
- NIJS, A.P.M.; VAN DIJK, G.E. Apomixis. In: HAYWARD, M.O.; BOSEMARK, N.O.; ROMAGOSA, I. (Ed.). **Plant breeding: principles and prospect**. London: Chapman and Hall, 1994. p.229-245.
- NOGLER, G.A. Gametophytic apomixes. In: JOHRI, B.M. **Embryology of angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p.475-518.
- SAMBROOK, L.; FRITCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- SCARANO, M.T.; TUSA, N.; ABATE, L.; LUCRETTI, L.N.; FERRANTE, S. Flow cytometry, SSR and modified AFLP markers for the identification of zygotic plantlets in backcrosses between “Femminelo” lemon cybrids (2n and 4n) and diploid clone of “Femminelo” lemon (*Citrus limon* L. Burm. F.) tolerant to mal secco disease. **Plant Science**, Limerick, v.164, p.1009-1017, 2003.
- SHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A.L.C. Diversidade genética em porta-enxertos cítricos baseada em marcadores moleculares RAPD. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1437-42, 2004.