

Identificação de híbridos de citros resistentes à mancha-marrom-de-alternária por meio de fAFLP e testes de patogenicidade

Edvan Alves Chagas⁽¹⁾, Jairo Osvaldo Cazetta⁽²⁾, Eliana Gertrudes Macedo Lemos⁽²⁾, Moacir Pasqual⁽³⁾, Antonio de Goes⁽²⁾, Jose Darlan Ramos⁽³⁾, Rafael Pio⁽⁴⁾, Wilson Barbosa⁽⁵⁾, Vander Mendonça⁽⁶⁾ e Luis Alberto Ambrosio⁽⁷⁾

⁽¹⁾Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio das Frutas, Av. Luis Pereira dos Santos, nº 1.500, CEP 13214-820 Jundiá, SP. E-mail: echagas@iac.sp.gov.br ⁽²⁾Universidade Estadual Paulista, Fac. de Ciências Agrárias e Veterinárias, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/nº, CEP 14884-900 Jaboticabal, SP. E-mail: cazetta@fcav.unesp.br, egerle@fcav.unesp.br, agoes@fcav.unesp.br ⁽³⁾Universidade Federal de Lavras, Dep. de Agricultura, Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: pasqual@ufla.br, darlan@ufla.br ⁽⁴⁾Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Rua Pernambuco, nº 1.777, Centro, Caixa Postal 1.008, CEP 85960-000 Marechal Cândido Rondon, PR. E-mail: rafaelpio@hotmail.com ⁽⁵⁾IAC, Centro Experimental Central, Av. Theodoro de Almeida de Camargo, nº 1.500, CEP 13001-970 Campinas, SP. E-mail: wbarbosa@iac.sp.gov.br ⁽⁶⁾Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Rod. BR 110, Km 47, Bairro Pres. Costa e Silva, CEP 59625-900 Mossoró, RN. E-mail: vander@ufersa.edu.br ⁽⁷⁾Centro APTABovino de Leite, Instituto de Zootecnia, Rua Heitor Penteado, nº 56, CEP 13460-000 Nova Odessa, SP. E-mail: ambrosio@iz.sp.gov.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi identificar híbridos, oriundos de hibridações controladas entre 'Folha Murcha' x 'Ponkan' e testá-los quanto à resistência a *Alternaria alternata* f. sp. *citri*. As plântulas foram obtidas via cultura in vitro de embriões. Utilizou-se o marcador molecular fAFLP para identificação dos híbridos e, em seguida, realizou-se o teste de patogenicidade nos híbridos com isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, em condições de laboratório. Os pares de primers *EcoRI* AAG – *MseI* CAG e *EcoRI* ACC – *MseI* CAA foram os mais eficientes na identificação dos híbridos, os quais identificaram 48,5% de híbridos. Os híbridos F64, F108, F111, F113, F131 e F139 são potencialmente resistentes a *Alternaria alternata* f. sp. *citri*.

Termos para indexação: *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, melhoramento genético, biotecnologia vegetal, marcador molecular.

Alternaria brown spot resistant citrus hybrid identification by means of fAFLP and pathogenicity tests

Abstract – The objective of this work was to identify hybrids obtained from controlled crossings between 'Folha Murcha' x 'Ponkan', and to check their resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *citri*. The seedlings were obtained by in vitro embryo culture. The fAFLP marker technique was used to identify the hybrids, then laboratory pathogenicity test of the hybrids was accomplished with *Alternaria alternata* f. sp. *citri* isolates. The pairs of primers *EcoRI* AAG – *MseI* CAG and *EcoRI* ACC – *MseI* CAA were the most efficient for hybrids identification, and distinguished 48.5% of hybrids. Hybrids F64, F108, F111, F113, F131 and F139 showed potential resistance to the *Alternaria alternata* f. sp. *citri*.

Index terms: *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, genetic improvement, plant biotechnology, molecular markers.

Introdução

A mancha-marrom-de-alternária ou mancha-de-alternária das tangerineiras foi constatada pela primeira vez no Brasil em 2001 (Peres et al., 2003). Segundo Informativo do Centro de Citricultura (Centro..., 2003), os sintomas observados em pomares no Brasil são semelhantes aos descritos para “alternaria-brown-spot-of-mandarins” ou “alternaria-brown-spot-of-Minneola-tangelo” em pomares da

África do Sul, Austrália, Espanha, Israel, Turquia e Estados Unidos e Itália (Herrera-Isla, 1992; Vicente et al., 1999; Timmer et al., 2000; Bella et al., 2001; Peres et al., 2003).

Estudos realizados na Clínica de Fitopatologia de Citros do Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira, do Instituto Agronômico, confirmaram o agente causal da mancha-marrom-de-alternária como sendo *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, e os testes de patogenicidade mostraram a

susceptibilidade das tangerineiras e seus híbridos. As laranjeiras-doces 'Pêra', 'Limeira Ácida Tahiti', por sua vez, mostraram-se resistentes à doença (Centro..., 2003). Desta forma, considerou-se a possibilidade da utilização de genótipos dessas variedades como parentais em programas de melhoramento genético visando à obtenção de híbridos resistentes à *Alternaria alternata* f. sp. *citri*.

Em razão das várias doenças que acometem a citricultura, a busca por novas variedades é o objetivo dos inúmeros programas de melhoramento genético em todo o mundo. Muitas alternativas podem ser utilizadas para se chegar à variabilidade genética, entre as quais o melhoramento genético através de hibridações. Entretanto, os métodos de melhoramento clássicos utilizados no desenvolvimento de novas variedades de citros são limitados por problemas tais como apomixia e embriogenia nucelar, altas taxas de heterozigose, incompatibilidade sexual, esterilidade masculina e feminina, além de longo período juvenil (Soost & Cameron, 1975). Soma-se a isto a dificuldade para a distinção precoce de plântulas, resultantes da multiplicação somática dos nucelos, e a dificuldade no resgate do embrião zigótico, bem como a ausência de caracteres morfológicos que possibilitem a sua distinção entre ambos os tipos de embriões.

Desta forma, devem-se usar métodos de seleção precoce de progênes no melhoramento genético de citros, que reduzam o tempo e a mão-de-obra na identificação de híbridos. São exemplos desses métodos de seleção: o cultivo *in vitro* de embriões e a identificação de genótipos por meio de marcadores moleculares fAFLP ("fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism").

O marcador molecular AFLP é uma técnica recente desenvolvida por Zabeau (1993), e é intermediária entre as técnicas de RFLP e PCR (Vos et al., 1995). O marcador AFLP analisa a presença ou ausência de sítios de enzimas de restrição e as seqüências polimórficas adjacentes a esses sítios. De acordo com Vos et al. (1995), o AFLP apresenta as seguintes vantagens: maior número de loci pode ser analisado por experimento; número aproximadamente dez vezes maior de marcas informativas pode ser obtido por análise; a técnica gera mais informações do que outros marcadores dominantes como RAPD; o AFLP gera padrões de bandamento altamente reprodutíveis, devido ao pareamento altamente específico dos primers aos nucleotídeos adaptadores complementares.

O objetivo deste trabalho foi identificar híbridos de citros oriundos de hibridações entre 'Folha Murcha' x 'Ponkan' por meio de marcador molecular fAFLP e testá-los quanto a resistência à mancha-marrom-de-alternária com a utilização de testes de patogenicidade.

Material e Métodos

As plantas foram obtidas a partir de cruzamentos artificiais controlados entre 'Folha Murcha' (*Citrus sinensis*, fonte de resistência) x 'Ponkan' (*Citrus reticulata*, material suscetível), pertencentes à coleção de cítricos do Setor de Fruticultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Foram coletados botões florais das variedades de laranjeiras Folha Murcha (genitor masculino) no estádio balão. Em seguida, as anteras foram extraídas com auxílio de uma pinça e colocadas em placas de Petri, forradas com papel-filtro, e armazenadas em sala de crescimento com aproximadamente 25°C, 70% de umidade relativa do ar, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 32 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por aproximadamente 24 a 48 horas para ocorrer a antese. Posteriormente, com auxílio de uma pinça, as inflorescências da genitora 'Ponkan', que também se encontravam no estádio balão, foram emasculadas e, em seguida, utilizando-se um pincel fino, foram polinizadas. Imediatamente após a polinização, cada flor foi protegida com saco de papel e etiquetada, deixando-se apenas uma flor por ramo, eliminando-se as demais. Aproximadamente 118 dias após a polinização, os frutos foram coletados e armazenados em refrigerador a 5±1°C.

Para resgate e cultivo dos embriões, as sementes foram removidas dos frutos provenientes dos cruzamentos realizados na etapa anterior e tratadas com álcool a 70% por 5 min e, posteriormente, desinfestadas com hipoclorito de sódio (2%) por 20 min. Em seguida foram lavadas três vezes com água destilada e autoclavada. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar e com auxílio de microscópio estereoscópico, bisturi e pinça, realizou-se um corte na região oposta à micrópila para expor os embriões. Estes foram individualizados e inoculados em 15 mL do meio de cultura MT (Murashige & Tucker, 1969) vertidos em tubos de ensaio (25x150 mm). Em seguida, os tubos de ensaio foram colocados em sala de crescimento a 27±1°C, com 70% de umidade relativa do ar, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 32 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Aos 90 dias, as plântulas foram retiradas dos tubos de ensaio,

transplantadas em células de isopor contendo vermiculita e mantidas em casa de vegetação, com temperatura e umidade controladas. Após a aclimatização, as plântulas foram transferidas para sacos de plástico perfurados para produção de mudas (28x18 cm), os quais foram preenchidos com uma mistura de terra e areia na proporção de 3:1. A identificação dos híbridos foi conduzida no Dep. de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista em Jaboticabal, SP.

A extração de DNA genômico dos tecidos vegetais dos genitores e da progênie foi realizada segundo Doyle & Doyle (1991). Folhas frescas (0,1 g) de cada amostra foram maceradas com nitrogênio líquido e homogeneizadas em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL, contendo 750 µL de tampão de extração (2% CTAB, NaCl 5 M, 0,2% de 2-β-mercaptoetanol, 0,5 M EDTA, 100 mM TRIS-HCl-pH 8). Após 60 min de incubação a 65°C, adicionaram-se 450 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e o material foi centrifugado por 15 min a 17.000 g, a 20°C, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo, adicionando-se 400 µL de isopropanol gelado. Na recuperação do DNA, realizou-se nova centrifugação a 17.000 g por 15 min, a 0°C, descartando-se o sobrenadante. Em seguida, o DNA foi “lavado” com uma solução conhecida como “wash buffer” (76% de etanol e 10 mM de acetato de amônio), e logo depois foi centrifugado a 6.000 g a 0°C, por 10 min, para obtenção do pellet. Este foi secado em temperatura ambiente, e, em seguida, acrescentado 100 µL de TE (10 mM TRIS-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) e 2 µL de RNase (10 µg mL⁻¹). Os tubos foram incubados a 37°C por 60 min e acrescidos de 200 µL de água milli-Q, 100 µL de acetato de amônia e 1.000 µL de etanol absoluto, e mantidos por uma hora no freezer. Em seguida, o material foi centrifugado novamente a 12.000 g por 10 min, a 0°C, secado e, posteriormente, ressuscitado em 20 µL de TE (10 mM TRIS-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) e armazenados a -20°C.

A quantificação de DNA das amostras foi realizada com auxílio de biofotômetro. Além da concentração de DNA, observou-se a relação entre as absorbâncias 260 e 280 nm (ácidos nucleicos/proteínas) para verificação da qualidade do DNA. Foi realizada também a verificação da integridade do DNA nas soluções por meio dos testes em gel de agarose 0,8%.

Após a obtenção do material genético dos genitores e da progênie F₁, estes foram avaliados por meio do marcador molecular AFLP, segundo o protocolo AFLP Plant Mapping Protocol (Applied Biosystems, 1997). O

DNA genômico foi digerido utilizando-se 500 ng de DNA (10 µL), acrescido de 1,25 µL de tampão React 1 (500 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM MgCl₂), 5 U de *EcoRI* (0,5 µL) e 1,5 U de *MseI* (0,3 µL). Esta reação foi incubada por 14 horas a 37°C, e, em seguida, as enzimas foram inativadas por 10 min, a 65°C. Quanto à ligação dos adaptadores, retiraram-se 3,67 µL da reação de digestão e acrescentou-se 1 µL de tampão T4 DNA ligase, 0,5 µL T4 DNA ligase, 0,33 µL do adaptador para o corte da *MseI* e 0,33 µL do adaptador para o corte da *EcoRI* (ambos adaptadores previamente anelados a 95°C por 5 min). A ligação ocorreu por duas horas a 20°C e, posteriormente, foi diluída 7,7 vezes em água destilada. Na amplificação pré-seletiva, retiraram-se 2 µL da reação diluída, preparada a partir das reações de digestão e ligação dos adaptadores, acrescentou-se 1 µL da mistura dos primers pré-seletivos AFLP *EcoRI* e *MseI* e 15 µL de AFLP Core mix. As amostras foram colocadas no termociclador PTC-100 da MJ Research, Inc. Inicialmente foram submetidas a 72°C por 2 min, em seguida, 20 ciclos de 94°C, por 20 s, 56°C por 30 s e 72°C por 2 min e, finalmente, permanecendo a 60°C por 30 min.

Após a verificação da reação pré-seletiva em gel de agarose 1%, os produtos amplificados na reação pré-seletiva foram diluídos duas vezes. Na amplificação seletiva, retiraram-se 1,5 µL da reação de amplificação pré-seletiva diluída e acrescentaram-se 7,5 µL do AFLP Core mix, 0,5 µL do primer-AXX da *EcoRI* marcado por fluorescência e 0,5 µL do primer-CXX da *MseI*, sendo ‘XX’ qualquer das combinações de deoxinucleotídeos disponíveis na seqüência dos primers do Kit. Após o preparo das reações, as amostras foram colocadas no termociclador PTC-100 da MJ Research, Inc. Inicialmente foram submetidas à temperatura de 94°C por 2 min, seguido por sucessivos ciclos de 94°C, por 20 s, 66°C por 30 s e 72°C por 2 min. Em cada ciclo, baixava-se um grau na fase de 30 s até atingir 56°C por 30 s. Nesta penúltima etapa, no termociclador, as amostras foram submetidas por 21 vezes ao ciclo de 94°C por 20 s, seguidos de 56°C por 30 s e 72°C por 2 min. Finalmente, foram submetidas ao ciclo de 60°C por 30 min.

Na eletroforese, realizada no sequenciador ABI PRISM 377, preparou-se uma solução contendo 1,5 µL de formamida deionizada, 0,9 µL de blue dextran e 0,3 µL do padrão interno de peso molecular GeneScan-500 ROX (Applied Biosystems) marcado por fluorescência com a coloração vermelha. Adicionou-se à reação seletiva 1,6 µL desta solução e a reação foi desnaturada no termociclador,

a 95°C por 5 min. Foi aplicado 1,5 µL de cada amostra em gel de poliacrilamida a 5% (Longer-Ranger) com 36 cm de comprimento, e a eletroforese foi desenvolvida durante quatro horas, a 2.500 volts, usando TEB 1X (10,8 g TRIS; 5,5 g ácido bórico; 0,83 g de sódio EDTA dihidratado; diluído em 1 L de água).

O padrão interno de peso molecular Gene Scan-500 ROX, usado no fAFLP, possui 15 fragmentos com os seguintes comprimentos em pares de bases (pb): 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 e 500.

A fim de selecionar as melhores combinações de primers, que identificassem loci fAFLPs polimórficos entre os parentais, para posterior utilização na identificação de híbridos F₁ entre os mesmos, foram testados 21 pares de primers *EcoRI*-*MseI* entre 'Ponkan' e 'Folha Murcha' (ACA-CAC, ACA-CAG, ACA-CTT, ACA-CTG, AAG-CAC, AAG-CAA, AAG-CAG, AAG-CTT, AAG-CTG, AGG-CAA, AGG-CAG, AGG-CTT, AGG-CTG, ACC-CAC, ACC-CAA, ACC-CAG, ACC-CTT, ACC-CTG, AGC-CAA, AGC-CAG e AGC-CTT).

Após amplificação, utilizou-se o programa "GeneScan Analysis Software" (Applied Biosystems) para obtenção dos dados provenientes do seqüenciador. Em seguida, construiu-se uma tabela binária, analisando-se a presença e ausência de cada fragmento, codificada por 1 e 0, respectivamente, com o auxílio do "Genotyper DNA Fragment Analysis Software" (Applied Biosystems) para diferenciar os parentais entre si e, posteriormente, a progênie F₁ de plântulas resultantes do cruzamento dirigido entre 'Folha Murcha' e 'Ponkan'. Posteriormente, elaborou-se a matriz de distância com auxílio do programa Paup (Paup 4.0b10). Com a matriz de distância, foi construído o dendrograma, por meio do programa Mega (Kumar et al., 2004), para verificar a certificação dos diferentes grupos (híbridos e nucleares).

Quanto ao teste de patogenicidade da progênie F₁, utilizou-se suspensão de conídios, cujas culturas foram obtidas em meio de batata-dextrose-ágar (BDA), durante sete dias sob temperatura de 26°C e fotoperíodo de 12 horas. O isolado de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* foi obtido a partir de folhas de tangor 'Murcott' com sintomas típicos da doença, cuja patogenicidade foi previamente avaliada mediante inoculação em brotações de tangerineira 'Dancy' (*C. rericulata*). Em tais colônias foram adicionados 10 mL de água esterilizada e, mediante raspagem com lâmina, removeu-se o micélio, conídios e

conidióforos que, posteriormente, foram filtrados em camada dupla de gaze esterilizada. Esta suspensão foi centrifugada duas vezes por 20 min a 12.000 g, descartando-se o sobrenadante. Após a determinação da concentração de propágulos na suspensão, com auxílio de um microscópio e hematocítômetro, a suspensão foi diluída a 1x10⁴ conídios por mL. Uma gota da suspensão conidial foi colocada numa lâmina de microscópio e incubada por 18 horas em câmara úmida, que foi analisada em seguida para confirmação da viabilidade dos conídios.

O teste de patogenicidade nos híbridos foi realizado em folhas jovens, com aproximadamente oito dias de idade após o início da brotação, que foram destacadas das plantas, higienizadas com água destilada e colocadas em placas de Petri forradas com papel-filtro umedecido. Em seguida, com auxílio de um pulverizador manual, do tipo De Vilbs, as folhas foram pulverizadas com suspensão de conídios, cujo isolado também foi obtido a partir de folhas de tangor 'Murcott', com sintomas típicos da doença, cuja patogenicidade foi previamente avaliada mediante inoculação em brotações de tangerineira 'Dancy'. A testemunha foi pulverizada com água destilada e esterilizada. Posteriormente, as amostras foram incubadas em câmara úmida a 27°C.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições, e cada repetição foi constituída por duas folhas. As avaliações foram realizadas aos quatro, sete e dez dias após a inoculação, baseando-se na presença e ausência de sintomas. A severidade foi avaliada de acordo com a menor ou maior suscetibilidade das folhas ao surgimento do sintoma, conforme a seguinte notação: - ausência de sintoma; + surgimento do sintoma; ++ folha parcialmente tomada por lesões e; +++ folha totalmente tomada por lesões. Após as avaliações, as notações foram transformadas na escala 0, 1, 2 e 3, representando as notações -, +, ++ e +++, respectivamente. Em seguida, os dados foram submetidos ao teste estatístico não-paramétrico de Friedman, a 5% de probabilidade, conforme Conagin et al. (2006).

Os parentais foram utilizados como controle negativo e positivo. Após as avaliações, a variedade Folha Murcha não apresentou o sintoma da doença. Ao contrário, a 'Ponkan' apresentou-se altamente suscetível, como era esperado. Em todos os híbridos, também foram utilizadas testemunhas – tratamentos que foram submetidos aos mesmos testes, entretanto não foram inoculados com a suspensão conidial.

Resultados e Discussão

Do conjunto de 21 pares de primers AFLP testados para identificação entre 'Folha Murcha' e 'Ponkan', os pares de primer AAG-CAG, AAG-CAA e AAG-CTT (fluorófilo Joe) apresentaram o maior número de fragmentos amplificados e polimórficos. Estes três pares de primers amplificaram um total de 44, 40 e 39 fragmentos, sendo destes 17, 10 e 8 loci AFLP polimórficos entre os parentais, respectivamente. Entre os primers marcados com fluorescência Ned, destacam-se os pares ACC-CAA, ACC-CTG e AGC-CAA, os quais amplificaram 31, 28 e 25 sendo, entre estes 11, 8 e 7 loci AFLP polimórficos entre os parentais, respectivamente. Considerando-se o baixo número de fragmentos polimórficos entre os parentais 'Ponkan' e 'Folha Murcha', os demais 15 pares de primers não se mostraram eficientes na diferenciação (Tabela 1).

Em razão do número de fragmentos amplificados e de loci AFLP polimorfismo detectados entre os parentais, e da qualidade de visualização na imagem do gel, selecionaram-se os pares de primers AAG-CAG (fluorófilo Joe) e ACC-CAA (fluorófilo Ned) para serem utilizados na diferenciação genética de plântulas provenientes de embriões nucelares e zigóticos, os quais geraram 38,63 e 35,48% de polimorfismo entre os parentais. Os marcadores fAFLP mostraram-se excelentes na diferenciação dos parentais por sua capacidade de gerar grande número de fragmentos polimórficos por par de primer.

Shimada et al. (1998), ao utilizar o marcador AFLP e RAPD na diferenciação de variedades de laranja 'Pêra', verificaram que a técnica AFLP detectou uma quantidade de polimorfismo entre os materiais estudados aproximadamente 20 vezes maior quando comparado com o RAPD. Os autores ainda ressaltaram a superioridade da técnica de fAFLP na reprodutibilidade de fragmentos amplificados e a rapidez de análise devido ao sistema de marcação dos primers com fluorescência. Narváez et al. (2000), ao estudar a eficiência entre as técnicas RAPD e AFLP para identificação genética de clones de *Vitis*, também citam a eficiência da técnica AFLP após observarem alta reprodutibilidade dos fragmentos amplificados e a maior quantidade de loci polimórficos detectada por reação. Resultados semelhantes também foram encontrados por Guo et al. (2004) que, ao estudar várias técnicas para caracterização molecular e identificação de hibridização entre híbridos somáticos intergenéricos de *Citrus*, verificaram que a técnica

AFLP foi mais eficiente e conveniente. Esses autores observaram que todos os pares de primers testados foram capazes de identificar a hibridização entre os híbridos. Grande número de bandas foi gerado, e muitas destas bandas são específicas para os genótipos parentais. Conseqüentemente, informações adicionais a respeito da hibridização foram reveladas.

Com relação aos híbridos identificados, foram analisadas 101 plantas e encontrados, 49 híbridos, ou seja, 48,5%. As 53 restantes são clones nucelares. Verificou-se o agrupamento da progênie F₁ oriunda da hibridização entre 'Folha Murcha' x 'Ponkan' em três grupos distintos (Figura 1). O primeiro representado por híbridos que apresentaram distância genética relativamente significativa (0,15), quando comparado ao segundo grupo, cujos valores situaram-se entre 0,0 e 0,05. Já o terceiro, apresentou máxima similaridade, constituindo-se no grupo de plantas com origem nucelar.

Devido à qualidade da técnica de AFLP, neste trabalho foram encontradas diferenças genéticas

Tabela 1. Pares de primer (*EcoRI-MseI*) testados para identificação entre 'Ponkan' e 'Folha Murcha' com os respectivos totais de fragmentos amplificados e números de fragmentos polimórficos gerados.

Pares de primers ⁽¹⁾	Total de fragmentos amplificados	Número de fragmentos polimórficos
ACA-CAC	28	12
ACA-CAG	38	7
ACA-CTT	49	9
ACA-CTG	40	11
AAG-CAC	24	6
AAG-CAA	40	10
AAG-CAG	44	17
AAG-CTT	39	8
AAG-CTG	33	6
AGG-CAA	26	5
AGG-CAG	22	6
AGG-CTT	20	7
AGG-CTG	20	5
ACC-CAC	22	5
ACC-CAA	31	11
ACC-CAG	22	3
ACC-CTT	18	2
ACC-CTG	28	8
AGC-CAA	25	7
AGC-CAG	14	5
AGC-CTT	9	3

⁽¹⁾Todos os pares de primers com inicial ACA são marcados com fluorófilo Fam; todos os pares de primers com inicial AAG e AGG são marcados com fluorófilo Joe; todos os pares de primers com inicial ACC e AGC são marcados com fluorófilo Ned.

significativamente maiores, quando comparado com outros marcadores moleculares a exemplo do RAPD (Cristofani & Machado, 1998; Oliveira et al., 2000; Cristofani et al., 2001).

A técnica fAFLP proporcionou a identificação mais exata de embriões zigóticos neste trabalho. Esta técnica, por sua eficiência na detecção de polimorfismo proporciona, com frequência, melhores resultados na diferenciação de indivíduos, seja de espécies cítricas ou de outras frutíferas. A proporção de embriões zigóticos e nucelares pode variar com as espécies e variedades de citros (Montenegro, 1958), devido à constituição genética dos parentais, vigor dos híbridos, fatores ambientais, estado fisiológico (Cameron & Frost, 1968) e condições climáticas da época em que as hibridações são realizadas (Mestre et al., 1997). Estes autores observaram variação na porcentagem de plantas zigóticas de Flying Dragon de 23,2%, em 1992, a 8,4%, em 1993. Oliveira et al. (2000), trabalhando com marcador RAPD, encontraram em média 38,98 e 27,92% de embriões zigóticos na

identificação de plantas oriundas do cruzamento entre *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis* quando cultivados no sistema de placas de Petri/tubetes e canteiro, respectivamente. Em 2001, data de realização das hibridações controladas, as condições climáticas foram favoráveis. O regime de chuvas foi bem distribuído durante o ciclo de produção da cultura e, principalmente, no período de crescimento e desenvolvimento dos frutos. Tais condições, provavelmente, contribuíram para a obtenção do maior número de híbridos.

Com relação aos resultados do teste de patogenicidade dos híbridos identificados na etapa anterior, 37 híbridos oriundos do cruzamento 'Ponkan' x 'Folha Murcha' foram avaliados (Tabela 2). Os outros 12 híbridos identificados precocemente, ou seja, ainda no estágio de plântulas, de um total de 49, morreram durante o período de aclimatização.

Quanto aos três períodos de avaliação dos sintomas, o teste de Friedman foi altamente significativo. A maioria dos híbridos submetidos ao teste de patogenicidade apresentou sintoma de suscetibilidade ao isolado de

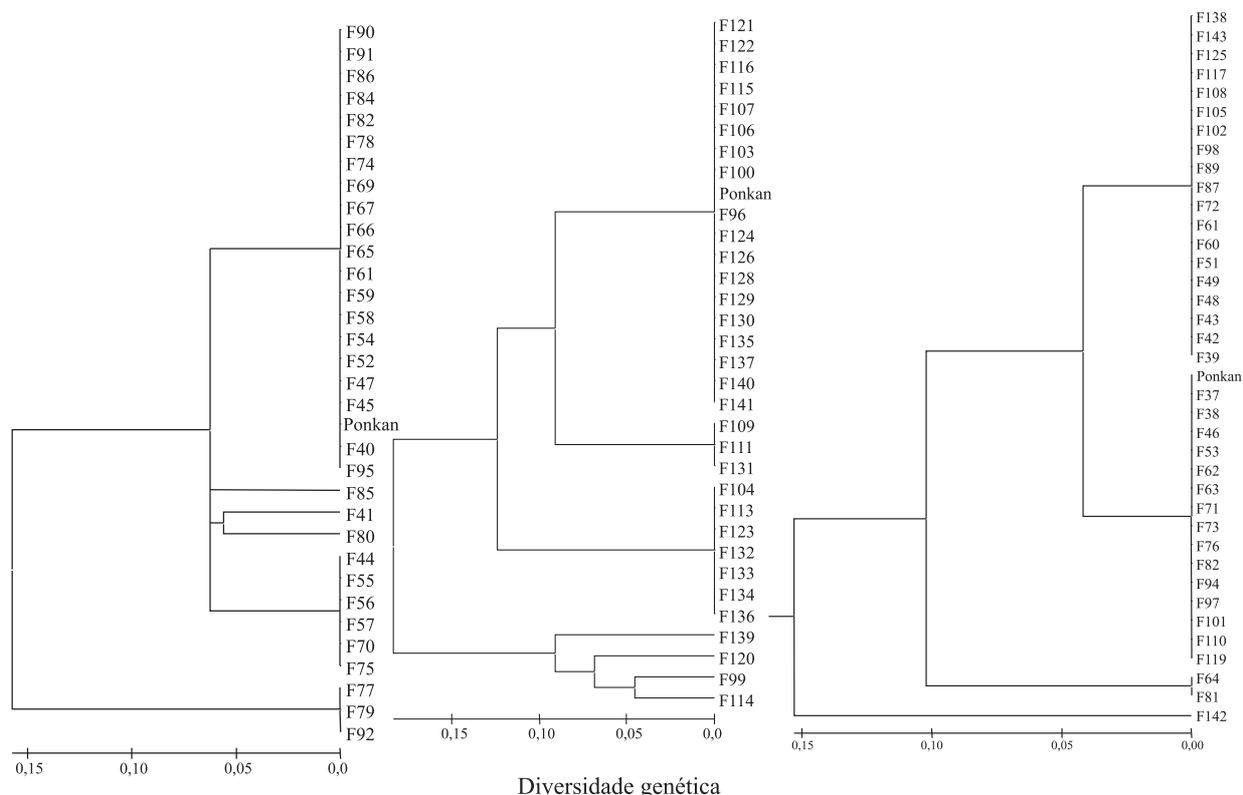


Figura 1. Dendrograma da genitora 'Ponkan' e da progênie F_1 oriunda da hibridação entre 'Ponkan' x 'Folha Murcha', a partir da análise de Parcimônia e da matriz de distância de Pairwise, baseado no padrão de agrupamento de Neighbor-joining.

Alternaria alternata f. sp. *citri* testado. Entretanto, houve variação no grau de resistência e suscetibilidade dos híbridos de acordo com as avaliações realizadas aos quatro, sete e dez dias após a inoculação (Tabela 2).

A maioria dos híbridos apresentou sintomas após quatro dias da inoculação e a lesão aumentou de tamanho, até a folha ficar completamente tomada, o que ocorreu dez dias após a inoculação. Apesar de terem apresentado

sintomas na primeira avaliação nos híbridos F72 e F139, as lesões não evoluíram mantendo-se constantes ao longo do tempo de avaliação. Os híbridos F57, F99 e F123 apresentaram-se altamente suscetíveis ao fungo.

Nos híbridos F109, F113, F132 e F134, o sintoma só foi observado após sete dias da inoculação. Entre estes, destaca-se o F113, que, embora tenha apresentado sintoma, não se desenvolveu até o final do teste. Quanto

Tabela 2. Teste de patogenicidade realizado em híbridos oriundos da progênie F₁ provenientes do cruzamento 'Ponkan' x 'Folha Murcha', que receberam inóculos de isolados de *Alternaria alternata* f. sp. *citri*.

Híbridos	Avaliações (dias após inoculação)					
	4		7		10	
	Mediana	Soma das escalas	Mediana	Soma das escalas	Mediana	Soma das escalas
Testemunha	0	24	0	14	0	6
F39	1,013	91,5	2,974	114	2,987	81,5
F42	1,026	92	2,908	113	3	97
F43	0	24	0	14	2,987	81,5
F44	0	24	2,974	114	2,987	81,5
F48	2,026	133	2,908	113	3	97
F49	1	79,5	2,026	78	3	97
F55	2	127,5	2,026	78	3	97
F56	1	79,5	2,026	78	3	97
F57	2,803	144	3	126,5	2,987	81,5
F60	0,974	78,5	2	74,5	2,987	81,5
F62	1,908	115,5	3	126,5	3	97
F64	0	24	0	14	1	19,5
F70	1	79,5	2,026	79,5	3	97
F72	1,013	91,5	1	38	2	34,5
F75	1	79,5	2,092	88	3	97
F77	1	79,5	2,066	87,5	3	97
F79	1,039	91,5	1,039	47,5	3	97
F80	2	127,5	3	126,5	3	97
F85	1,013	91,5	2	74,5	3	97
F92	1,013	91,5	3	126,5	3	97
F98	1,013	91,5	2	74,5	3	97
F99	3	148	3	126,5	3	97
F104	1,039	91,5	3	126,5	3	81
F105	1,026	91	2	74,5	3	97
F108	0	24	0	14	1	19,5
F109	0	24	2	74,5	3	97
F111	0	24	0	14	1	19,5
F113	0	24	1	38	1,066	23
F117	1,026	91	1	38	3	97
F123	3	148	3	126,5	3	97
F131	0	24	0	14	0	6
F132	0,013	36,5	2,039	87	3	97
F134	0	24	3	126,5	3	97
F138	1,013	91,5	1,895	65	3	97
F139	1,026	91	1	38	1	19,5
F142	1	79,5	2	74,5	3	97
S ⁽¹⁾		130,68		131,05		132,62
GL		37		37		37
P		0,000		0,000		0,000
Grande mediana		0,974		1,895		2,553

⁽¹⁾Estatística de Friedman ajustada.

aos híbridos F64, F108 e F111 somente apresentaram leve sintoma após dez dias, com exceção do F43 no qual, após dez dias, a lesão se mostrava muito desenvolvida.

O F131 foi o único, entre os híbridos testados, que não apresentou sintoma em nenhuma das avaliações, mostrando-se potencialmente resistente, nas condições deste trabalho, ao isolado de *Alternaria alternata* f. sp. *citri* utilizado.

A variação encontrada no grau de resistência e suscetibilidade à *Alternaria alternata* f. sp. *citri* é comum em trabalhos de patogenicidade envolvendo espécies cítricas a este fungo. Vicent et al. (2004), ao avaliar a suscetibilidade de espécies cítricas a *Alternaria alternata* pv. *citri* em laboratório, também encontraram variação na suscetibilidade entre as variedades testadas. Gardner et al. (1986) relataram que essa variação é influenciada pelo teste utilizado. Neste trabalho, o teste utilizado seguiu método consagrado em trabalhos conduzidos para testar a resistência de espécies cítricas a *Alternaria alternata* f. sp. *citri* (Kohmoto et al., 1991; Solel & Kimchi, 1997; Peever et al., 1999, 2002; Vicent et al., 2003).

Outros fatores que contribuem para a variação no grau de resistência e suscetibilidade à mancha-de-alternária das tangerineiras estão relacionados ao tipo de isolado e ao local em que o isolado foi obtido. Entretanto, a confirmação de resistência de variedades de tangerina e híbridos à *Alternaria alternata* foi verificada em trabalhos anteriores. Kohmoto et al. (1991) verificaram reação de resistência, quando variedades de tangerinas 'King' e seus híbridos 'Encore' e 'Kara-Kara' foram submetidos à inoculação de isolados Aac oriundos da Flórida. Esses autores também observaram comportamento igual na variedade Kara-Kara, quando recebeu inoculo com o isolado Aac, oriundo da Austrália, embora autores como Solel & Kimchi (1997) tenham verificado que a tangerina 'King' e seus híbridos 'Wilking' e 'Kara-Kara' foram suscetíveis ao isolado Aac, oriundo de Israel. Recentemente, Vicent et al. (2003) observaram a reação de resistência de híbridos 'Ellendalle' e 'Ortanique' oriundos do cruzamento entre *C. sinensis* x *C. reticulata*, quando foram submetidos à inoculação de três isolados de *Alternaria alternata* pv. *citri*, AF 2999-1, AF 3499-1 e AF 5199-2.

Conclusões

1. Os pares de primers *EcoRI* AAG – *MseI* CAG e *EcoRI* ACC – *MseI* CAA são os mais eficientes para identificação de híbridos da progênie oriunda do cruzamento 'Ponkan' x 'Folha Murcha'.
2. Os híbridos F64, F108, F111, F113, F131 e F139 são potencialmente resistentes à *Alternaria alternata* f. sp. *citri*.

Agradecimentos

Ao CNPq, à Fapemig e à Fapesp, pelo apoio financeiro.

Referências

- APPLIED BIOSYSTEMS. **AFLP Plant Mapping Protocol**. Foster City: Perkin Elmer Corporation, 1997. 45p.
- BELLA, P.; GUARINO, C.; LA ROSA, R.; CATARA, A. Severe infections of *Alternaria* spp. on a mandarin hybrid. **Journal of Plant Pathology**, v.83, p.231, 2001.
- CAMERON, J.W.; FROST, H.B. Genetics breeding and nucellar embryony. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.). **The citrus industry volume II: anatomy, physiology, genetics and reproduction**. Berkeley: University of California Press, 1968. p.325-370.
- CENTRO APTA CITROS SYLVIO MOREIRA. Mancha de alternária das tangerinas. **Informativos do Centro de Citricultura**, n.3, 2003.
- CONAGIN, A.; NAGAI, V.; AMBRÓSIO, L.A. **Princípios de técnica experimental e análise estatística de experimentos**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2006. 1 CD-ROM.
- CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Utilização de marcadores moleculares na identificação de plântulas zigóticas e nucleares em sementeira de limão 'Cravo'. **Laranja**, v.19, p.147-158, 1998.
- CRISTOFANI, M.; NOVELLI, V.; OLIVEIRA, A.C. de; OTAVIANO, A.R.; SOUZA, A.A. de; MACHADO, M.A. Identificação de híbridos de cruzamentos interespecíficos em citros utilizando marcadores RAPD e SSR. **Laranja**, v.22, p.231-341, 2001.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.1, p.13-15, 1991.
- FROST, H.B.; SOOST, R.K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.). **The citrus industry volume II: anatomy, physiology, genetics and reproduction**. Berkeley: University of California Press, 1968. p.290-324.
- GARDNER, J.M.; KONO, Y.; CHANDLER, J.L. Bioassay and host-selectivity of *Alternaria citri* toxins affecting rough lemon and mandarins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.29, p.293-304, 1986.
- GUO, W.W.; CHENG, Y.J.; CHEN, C.L.; FU, C.H.; DENG, X.X. Molecular characterization of several intergeneric somatic hybrids between *Citrus* and its related genera. **Acta Horticulturae**, n.632, p.259-264, 2004.

- HERRERA-ISLA, L. La mancha parda de los cítricos en Cuba. **Levante Agrícola**, v.31, p.49-50, 1992.
- KOHMOTO, K.; AKIMITSU, K.; OTANI, H. Correlation of resistance and susceptibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxins. **Phytopathology**, v.81, p.719-722, 1991.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v.5, p.150-163, 2005.
- MESTRE, P.F.; ASINS, M.J.; PINA, J.A.; CARBONELL, E.A.; NAVARRO, L. Molecular markers flanking citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.458-464, 1997.
- MONTENEGRO, H.W.S. **Curso avançado de citricultura**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-USP, 1958. 241p.
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., Riverside, 1969. **Proceedings**. Riverside: University of California Press, 1969. p.1155-1169.
- NARVÁEZ, C.R.; VALENZUELA, J.B.; MUNOZ, C.S.; HINRICHSEN, P.R. Comparación de RAPD y AFLP como métodos de identificación genética de vid basad en el estudios de fragmentos genómicos anónimos. **Agricultura Técnica**, v.60, p.1-20, 2000.
- OLIVEIRA, R.P. de; NOVELLI, V.M.; MACHADO, M.A. Freqüência de híbridos em cruzamento entre tangerina 'Cravo' e Laranja 'Pêra': análise de marcadores morfológicos e RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.1895-1903, 2000.
- PEEVER, T.L.; ALBANEZ, A.; AKIMITSU K.; TIMMER, W. Worldwide phylogeography of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata*. **Phytopathology**, v.92, p.794-802, 2002.
- PEEVER, T.L.; CANIHOS, Y.; OLSEN, L.; ALBANEZ, A.; LIU, Y.C.; TIMMER, W. Population genetic structure and host specificity of *Alternaria* spp. causing brow 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.
- SHIMADA, T.; YAMAMOTO, T.; HIDEAKI, Y.; MASAMI, Y.; YOSHIDA, M.; HAYASHI, T. Application of AFLP to molecular genetic analysis in Peach. **Journal of Japan Society Horticulturæ Science**, v.68, p.67-69, 1998.
- SOLEL, Z.; KIMCHI, M. Susceptibility and resistance of citrus genotypes to *Alternaria alternata* pv. *citri*. **Journal of Phytopathology**, v.145, p.389-391, 1997.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p.507-540.
- TIMMER, L.W.; SOLEL, Z.; OROZCO SANTOS, M. *Alternaria* brown spot of mandarin. In: TIMMERS, L.W.; GANSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. (Ed.). **Compendium of citrus diseases**. 2nd ed. Minnesota: APS Press, 2000. p.19-20.
- VICENT, A.; ARMENGOL, J.; SALES JUNIOR, R.; ALFARO LASSALA, F.; GARCIA JIMENEZ, J. Notas preliminares sobre una necrosis de la mandarina Fortune en la comunidad valenciana. **Levante Agrícola**, v.349, p.4470-474, 1999.
- VICENT, A.; BADAL, M.J.; ASENSI, N.; SANZ, N.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMENEZ, J. Laboratory evaluation of citrus cultivars susceptibility and influence of fruit size on Fortune mandarin to infection by *Alternaria alternata* pv. *citri*. **European Journal of Plant Pathology**, v.110, p.245-251, 2003.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. van de; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprint. **Nucleic Acid Research**, v.23, p.4407-4414, 1995.
- ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprint. **European Patent Application n. 92402629.7**. (Publication n. 0534858 A1). 1993.

Recebido em 25 de janeiro de 2007 e aprovado em 29 de junho de 2007