

Foto: Adônias Moreira



Variabilidade em Porta-Enxertos de Tangerineira cv. Cleópatra Coletados no Estado do Amazonas

Paula Cristina da Silva Angelo¹
Abelmon da Silva Gesteira²
José Clério Rezende Pereira³

A tangerineira cv. Cleópatra foi utilizada como porta-enxerto, no Estado do Amazonas, devido a características como tolerância moderada à gomose (INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS, 2002), à seca, resistência a outras doenças e indução de boa produtividade nas copas enxertadas (DONADIO et al. apud MORAES et al., 2011). No entanto, nos municípios de Iranduba, Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva, foram observados necrose no ponto de enxertia, folhas amareladas, seca dos ponteiros e frutos secos com casca espessa nas copas enxertadas, além de superbrotamento do porta-enxerto cv. Cleópatra. Estes sintomas foram considerados resultantes da incompatibilidade entre copas e porta-enxertos (MORAES et al., 2011).

O presente trabalho teve como objetivo contribuir para a análise dessas ocorrências, avaliando a homogeneidade genética dos porta-enxertos. Para tal, foi determinado o perfil de identidade molecular (*fingerprinting*) de algumas plantas, identificadas previamente pela morfologia das folhas como

tangerineiras cv. Cleópatra, utilizando marcadores microsatélite. As plantas foram coletadas na mesma área, apresentando os sintomas descritos por Moraes et al. (2011), citados acima.

No mês de junho de 2012, folhas de dez porta-enxertos (supostamente tangerineiras cv. Cleópatra) e de dois pés-francos matrizes (M1 e M2) de porta-enxerto cv. Cleópatra [*Citrus reshni* (Hort. ex Tanaka)] foram coletadas no Município de Iranduba, AM (3° 17'6" S e 60° 11'9" O), em área de produtor, e imediatamente armazenadas em frascos com sílica gel desidratada, dentro de isopor. Na Sede da Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus, AM, foram coletadas folhas de *Poncirus trifoliolata*, limão-cravo (*C. limonia* Engl.), lima ácida Tahiti (*C. latifolia* Tan.), laranja-pera (*C. sinensis* (L.) Osbeck) e de mais uma matriz (M3) de tangerineira cv. Cleópatra. Todo o material foi armazenado a -80 °C até o momento da extração do DNA.

¹Bióloga, D.Sc. em Ciências Biológicas (Genética), pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, paula.angelo@embrapa.br

²Engenheiro agrônomo, D.Sc. em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, abelmon.gesteira@embrapa.br

³Engenheiro agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, jose.rezende-pereira@embrapa.br

O DNA foi extraído no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental utilizando a metodologia do CTAB (DOYLE e DOYLE, 1987), tratado com RNase, precipitado, e enviado à Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, para a genotipagem por microssatélites. Foram analisados 17 *loci* de microssatélites, sendo: SPCC1; SPCC7; SPCC9; SPCC11; TAA1; TAA45; CAC23; CAC15; CAC19; CAC33; CAC39; CAG01; Ci06A05b; mCrCIR01E02; CMS-14; CMS-19 e CMS-20 (CHENG et al., 2005; BARKLEY et al., 2006; FROELICHER et al., 2008; ALEZA et al., 2011). As reações de PCR continham dNTPs 0,2 mM; tampão para a Taq polimerase 1X; MgCl₂ 2,5 mM; Taq DNA polimerase 0,8 U; *primers* R+F 400 nM; DNA 40 ng e água Milli-Q suficiente para alcançar o volume de 15 µL. Foram utilizadas temperaturas de anelamento de 42 °C ou 52 °C, a depender do par de *primers*. A eletroforese foi realizada em agarose 1000 a 3% e, ao fim desse processo, os resultados foram registrados em fotografias digitalizadas. As fotografias dos géis foram analisadas para avaliar

qualitativamente a homogeneidade dos fragmentos amplificados no DNA das amostras de tangerineira cv. Cleópatra. Os padrões de amplificação observados para os demais genótipos serviram como pontos de orientação ao longo da análise dos géis. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com o 50 pb *Ladder*, Ludwig Biotecnologia.

Para nove dos 17 *loci* de microssatélites analisados, as matrizes de porta-enxertos cv. Cleópatra (M1, M2 e M3) apresentaram padrões de genotipagem distintos (Tabela 1). Para estes *loci*, M1 e M2 foram genotipicamente idênticas, e M3, discrepante. Os porta-enxertos testados (plantas 1 a 5, 7, 9 a 11 e 16) apresentaram genótipos coincidentes com um dos dois padrões observados para as matrizes (tipos M1/M2 ou tipos M3) ou, muito mais raramente, e tratando-se principalmente do porta-enxerto nº 16, padrão de bandas amplificadas distinto daquele de qualquer uma das matrizes (Fig. 1).

Tabela 1. Identidade do padrão de bandas para *loci* de microssatélites dos porta-enxertos testados com o padrão de bandas de matrizes – M1, M2 e M3 – de tangerineira cv. Cleópatra coletadas no Amazonas (2012).

Locis	Tipos M1/M2	Tipos M3
SPCC1	2, 5, 7, 9, 10, 11	2, 5, 7, 9, 10, 11
SPCC7	monomórfico	monomórfico
SPCC9	1, 2, 3, 4, 9, 11	5, 7, 10, 16
SPCC11	monomórfico	monomórfico
TAA1	1, 2, 3, 4, 5, 9, 11	1, 2, 3, 4, 5, 9, 11
TAA45	1, 2, 3, 4, 9, 11	5, 10, 16
CAC23	1, 2, 3, 4, 9, 11	5, 7, 10, 16
CAC15	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11
CAC19	1, 2, 3, 4, 7, 9, 11, 16	5, 10
CAC33	1, 2, 3, 4, 7, 9, 11	5, 10
CAC39 P1	1, 2, 3, 4, 7, 9, 11	5, 10
CAG01	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11
Ci06A05b	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11
mCrCIR01E02	1, 2, 3, 4, 7, 9, 11	M3 não amplificou
CMS-14	1, 2, 3, 4, 9, 11, 16	5, 7, 10
CMS-19	1, 2, 3, 4, 9, 11	5, 7, 10
CMS20	monomórfico	monomórfico

Observação: para os *loci* sombreados, as matrizes apresentaram genótipos idênticos e as plantas incluídas no quadro também, embora tenham sido observados padrões de amplificação diferentes para as outras espécies e para o indivíduo 16. *Locis* monomórficos ocorreram quando um só padrão de bandas foi verificado para todos os indivíduos, independente da espécie. M1 e M2 são matrizes coletadas em área de produtor, no Município de Iranduba, AM, e M3 é matriz coletada na Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

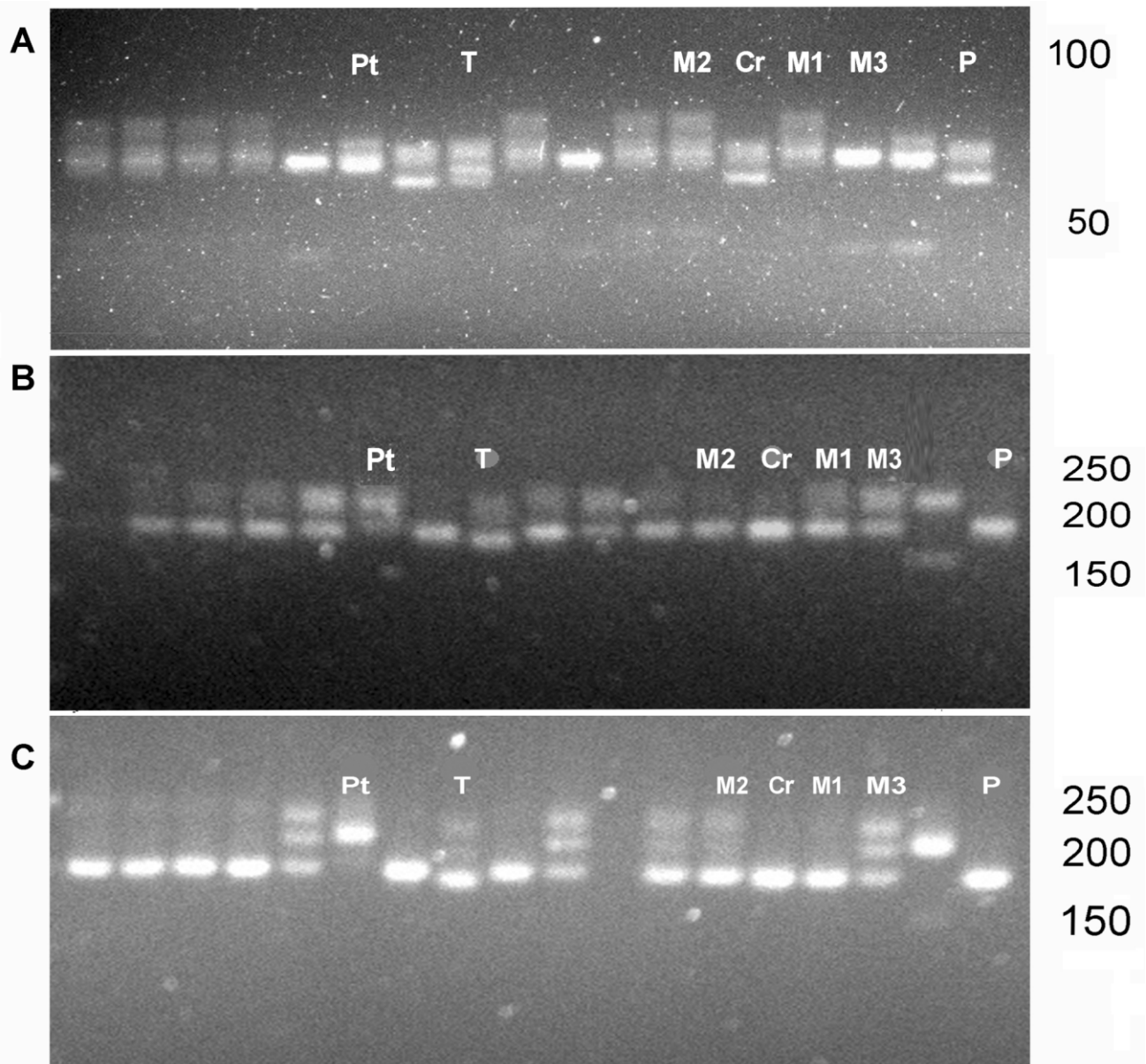


Figura 1. Fragmentos amplificados em DNA de 17 plantas de *Citrus* spp. utilizando *primers* para *loci* de microsatélite submetidos a eletroforese em agarose 1000 a 3%. **A)** *locus* TAA45; **B)** *locus* mCrCIR01E02; e **C)** *locus* CAC33. **Pt** = *Poncirus trifoliolata*; **Cr** = limão-cravo (*Citrus limonia* Engl.); **T** = lima ácida Tahiti (*C. latifolia* Tan.); **P** = laranja-pera (*C. sinensis* (L.) Osbeck). **M1** e **M2** = matrizes de tangerineira cv. Cleópatra (*C. reshni* Hort. ex Tanaka), coletadas em área de produtor; **M3** = matriz de cv. Cleópatra coletada na Embrapa Amazônia Ocidental. Os outros indivíduos incluídos nos géis estavam sob teste e foram utilizados como porta-enxerto cv. Cleópatra. Os números do lado direito da figura indicam estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados.

Para outros cinco *loci* analisados (Tabela 1, linhas sombreadas), o genótipo de todas as matrizes e testandos foi idêntico. Para os últimos três *loci*, todos os indivíduos, incluindo *Poncirus trifoliolata* (indivíduo nº 6), lima ácida Tahiti (indivíduo nº 8), limão-cravo (indivíduo nº 12) e laranja-pera (indivíduo nº 17), apresentaram padrões idênticos de amplificação, apesar de serem de espécies diferentes. Estes últimos *loci* foram incluídos na Tabela 1 como monomórficos.

Todas as plantas descritas neste trabalho como sendo da cultivar Cleópatra apresentaram os caracteres morfológicos externos das folhas preservados. Então, existem duas possibilidades para explicar a variabilidade de padrões de fragmentos amplificados encontrada entre os porta-enxertos testados: houve erro durante a seleção de matrizes de porta-enxertos e as genitoras de progênies apomíticas de porta-enxertos não eram da espécie *C. reshni* (Hort. ex Tanaka), ou as progênies apomíticas originaram-se de matrizes de *C. reshni* (Hort. ex Tanaka) com genótipos diferentes.

Moraes et al. (2011) relataram a ocorrência de sintomas de incompatibilidade enxerto/porta-enxerto em todas as plantas por eles examinadas. Durante a coleta do material vegetal analisado no presente trabalho, também não foram observadas plantas isentas de sintomas como necrose no ponto de enxertia e superbrotamento do porta-enxerto. Por essa razão, é difícil concluir que foram utilizadas mudas de porta-enxertos de espécies diferentes de *C. reshni* (Hort. ex Tanaka), a tangerineira cv. Cleópatra. Se fosse o caso, teria havido mistura de espécies de porta-enxertos e, em consequência, haveria no campo, muito provavelmente, plantas com e sem os sintomas de interação precária entre enxerto e porta-enxerto, como os que foram citados acima, a menos que qualquer porta-enxerto, sendo da espécie *C. reshni* (Hort. ex Tanaka) ou não, provocasse sintomas idênticos durante a interação com todas as espécies de enxertos encontradas nas áreas visitadas. Além disso, não foram observados padrões de fragmentos amplificados comuns às matrizes e a qualquer outro dos genótipos de citros encontrados na mesma área que pudessem contribuir para a identificação de porta-enxertos de outras espécies.

Quanto à ocorrência de genótipos diferentes para *C. reshni*, há várias possibilidades para explicação. A princípio, todas as espécies de *Citrus* seriam apomíticas, com exceção de *C. medica*, *C. grandis* e *C. clementina* (ALEZA et al., 2010 e 2011). A apomixia é frequentemente associada com a poliploidia em angiospermas, fato citado por Nassar et al. (2010), que analisaram essa associação em *Manihot esculenta*. Entre os *Citrus* apomíticos, há ocorrência de poliploidia com frequência de até 5,6% das plantas estabelecidas, a depender da espécie ou do cruzamento (LAPIN apud ALEZA et al., 2010). Estimou-se, em 1968, que até 2,5% das progênies nucelares de uma ampla gama de espécies de *Citrus* crescendo na Califórnia fosse tetraploide (CAMERON e FROST apud ALEZA et al., 2010). Porta-enxertos poliploides tem sido, ultimamente, bastante valorizados porque podem apresentar maior crescimento vegetativo e melhor adaptação a estresses abióticos. Uma raiz maior e mais profunda, com proporção maior de tecido condutor, pode significar maior coleta de água e nutrientes, por exemplo (KULKARNI et al., 2008). Aumento significativo no diâmetro do córtex e da área total da raiz e do córtex e do xilema do caule

foi verificado em *C. limonia*, lima Rangpur (ALLARIO et al., 2011).

Então, é plausível supor que existam poliploides em plantios de citros, e inclusive o vigor da brotação dos porta-enxertos relatado por Moraes et al. (2011) é compatível com características verificadas em poliploides. Admitindo-se que alguma das matrizes de cv. Cleópatra, genitora de progênies apomíticas de porta-enxertos, seja poliploide, já admitir-se-ia a existência de alguma diversidade genética entre os porta-enxertos da mesma espécie e isso poderia contribuir para o desenvolvimento de sintomas fisiológicos observados por Moraes et al. (2011), como o espessamento do córtex do caule, a deposição de calose e as diferenças de diâmetro entre os elementos.

A tetraploidia não provoca obrigatoriamente alterações no padrão de alelos de marcadores moleculares, como aqueles observados na Fig. 1, porque em autotetraploides de origem apomítica os alelos apresentam-se duplicados mas com números de pares de bases preservados. De fato, os tetraploides de várias espécies de *Citrus* encontrados por Aleza et al. (2011) apresentaram o mesmo padrão de bandas de seus genitores e clones apomíticos diploides genotipados para os vários *loci* heterozigóticos que foram analisados. Isto os levou a concluir definitivamente que as plantas que examinaram eram oriundas da poliploidização de células nucelares primordiais e não de clivagem de embriões zigóticos.

Por outro lado, triploides oriundos de cruzamentos entre indivíduos heterozigotos portadores de alelos diferentes poderiam ser detectados por genotipagem e talvez, nesse caso, apresentassem genótipo como aquele verificado para a matriz M3, na Fig. 1C. Há algumas formas de apomixia em que embriões zigóticos são formados e usualmente abortados (GRIMANELLI, 2011), prevalecendo os embriões nucelares mais vigorosos, que preservam o genótipo materno. No entanto, é também possível que os embriões zigóticos sobrevivam, porque híbridos entre espécies apomíticas, até híbridos interespecíficos de tangerina cv. Cleópatra, são utilizados em programas de melhoramento (VERDERO-LUCAS et al., 2000). Uma planta oriunda de um embrião zigótico produzido naturalmente pode ter sido mantida entre as mudas de origem apomítica (nucelares). Sendo triploide,

oriunda da fecundação de um gameta não reduzido (provavelmente o materno), se for selecionada como matriz de futuros porta-enxertos, pode produzir alguns tipos de variantes genéticas, inclusive diploides por reversão da anomalia, durante os ciclos de multiplicação celular que ocorrem para a frutificação, produção de sementes e embriões por apomixia. Tetraploides oriundos de cruzamentos entre indivíduos que apresentem um alelo comum e alelos exclusivos diferentes também podem produzir um padrão de fragmentos como o da matriz M3 (Fig. 1C). A conclusão sobre o grau de ploidia das plantas genotipadas vai depender de experimentos de cariotipagem ou quantificação de DNA nuclear por citometria de fluxo. Os experimentos necessários para cariotipar a matriz 3 de cv. Cleópatra, que está na Embrapa Amazônia Ocidental, já estão em andamento.

Outras possibilidades, muito mais raras, de ocorrência de diversidade genotípica entre plantas matrizes de cv. Cleópatra ou de outras espécies apomíticas podem ser: 1) a ocorrência de mutações em tecidos somáticos da planta que lhes deu origem. Por esta via, plantas apomíticas (plantas oriundas de apomixia) podem diferir de outras plantas apomíticas em uma mesma árvore, quando ocorrem, por exemplo, em frutos diferentes de galhos diferentes; 2) a ocorrência de mutações e alterações cromossômicas no tecido germinativo (em óvulos e/ou sacos embrionários) da planta que lhes deu origem. Por esta via, plantas apomíticas com genótipos diferentes podem ser oriundas até de um mesmo fruto. Esta última possibilidade, principalmente, é frequentemente associada à geração de poliploides oriundos de gametas não reduzidos. Tudo isso pode conduzir ao aparecimento de genótipos (e padrões de bandas de microssatélites) distintos para plantas da mesma espécie.

Então, observou-se que há pelo menos dois genótipos de porta-enxertos sendo utilizados na área do produtor onde foi feita a coleta do material vegetal, em Iranduba, AM, e há matrizes de tangerineira cv. Cleópatra [*C. reshni* (Hort. ex Tanaka)] com genótipos distintos também. Essas diferenças são, muito provavelmente, decorrentes da propagação, por apomixia, de variantes genéticas naturais daquela cultivar, embora raros, detectados pelos padrões de fragmentos amplificados nos *loci* de microssatélites cuja análise

foi aqui relatada. No entanto, uma vez que porta-enxertos de tangerineira cv. Cleópatra com qualquer um dos genótipos observados apresentaram sintomas similares na interação com várias espécies diferentes de enxertos, pode-se concluir que esses sintomas não são consequências diretas da divergência genotípica que foi aqui documentada. É que, se assim fosse, haveria de existir diferenças de compatibilidade a depender da variante genotípica utilizada, o que não foi observado até o momento.

Agradecimentos

Jeferson Chagas da Cruz, Marcelo Roseo de Oliveira, Ricardo Pessoa Rebello e José Orlando Ferreira, na Embrapa Amazônia Ocidental e Raimundo Pereira da Silva, na Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Referências

- ALEZA, P.; JUÁREZ, J.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Polyembryony in non-apomictic citrus genotypes. **Annals of Botany**, v. 103, p. 533-545, 2010.
- ALEZA, P.; FROELICHER, Y.; SCHWARZ, S.; AGUSTÍ, M.; HERNÁNDEZ, M.; JUÁREZ, J.; LURO, F.; MORILLON, R.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. **Annals of Botany**, v. 108, p. 37-50, 2011.
- ALLARIO, T.; BRUMOS, J.; COLMENERO-FLORES, J. M.; TADEO, F.; FROELICHER, Y.; TALON, M.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Large changes in anatomy and physiology between diploid Rangpur lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 2507-2519, 2011.
- BARKLEY, N. A.; ROOSE, M. L.; KRUEGER, R. R.; FEDERICI, C. T. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, p. 1519-1531, 2006.

CHENG, Y.; VICENTE, M. C. D.; MENG, H.; GUO, W.; TAO, N.; DENG, X. A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in *Citrus* and related genera. **Tree Physiology**, v. 25, p. 661-672, 2005.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

FROELICHER, Y.; DAMBIER, D.; BASSENE, J.; COSTANTINO, G.; LOTFY, S.; DIDOUT, C.; BEAUMONT, V.; BROTTIER, P.; RISTERUCCI, A.; LURO, F.; OLLITRAULT, P. Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 119-122, 2008.

GRIMANELLI, D. Epigenetic regulation of reproductive development and the emergence of apomixis in angiosperms. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, p. 1-6, 2011.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS - Centro de Citricultura Sylvio Moreira. Porta-enxerto alternativo. **Informativo do Centro de Citricultura**, n. 82, 2002.

KULKARNI, M.; BORSE, T.; CHAPHALKAR, S. Mining anatomical traits: a novel modelling approach for increased water use efficiency under drought conditions in plants. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 44, p. 11-21, 2008.

MORAES, L. A. C.; MOREIRA, A.; PEREIRA, J. C. R. Incompatibilidade de enxertia de base com tangerineira 'Cleópatra' em citros na Amazônia Central, Estado do Amazonas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 54, p. 1-8, 2011.

NASSAR, N. M. A.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; GOMES, P. F.; HASHIMOTO, D. Y. C. Alterations of reproduction system in a polyploidized cassava interspecific hybrid. **Hereditas**, v. 147, p. 58-61, 2010.

VERDEJO-LUCAS, S.; SORRIBAS, F.; FORNER, J.; ALCAIDE, A. Resistance of hybrid citrus rootstocks to a mediterranean biotype of *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. **HortScience**, v. 35, p. 269-273, 2000.

Comunicado Técnico, 94

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Amazônia Ocidental
Endereço: Rodovia AM 010, Km 29 - Estrada
Manaus/Itacoatiara
Fone: (92) 3303-7800
Fax: (92) 3303-7820
<http://www.cpa.embrapa.br>

1ª edição

1ª impressão (2012): 300 exemplares

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: Celso Paulo de Azevedo
Secretária: Gleise Maria Teles de Oliveira
Membros: André Luiz Atroch, Edsandra Campos Chagas,
Jony Koji Dairiki, José Clério Rezende Pereira, Kátia
Emídio da Silva, Lucinda Carneiro Garcia, Maria Augusta
Abtíbol Brito, Maria Perpétua Beleza Pereira, Rogério
Perin, Ronaldo Ribeiro de Moraes e Sara de Almeida Rios.

Expediente

Revisão de texto: Maria Perpétua Beleza Pereira
Normalização bibliográfica: Maria Augusta Abtíbol Brito de
Sousa
Editoração eletrônica: Gleise Maria Teles de Oliveira