

Avaliação *in vitro* de genótipos de citros a *Phytophthora parasitica*

Amauri Siviero¹, Francineide A. Santos², Mariângela Cristofani², Edson L. Furtado¹ & Marcos A. Machado²

¹Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Cx. Postal 237, CEP 18603-970, Botucatu, SP, e-mail: asiviero@hotmail.com; ²Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica de Citros 'Sylvio Moreira', Instituto Agrônômico de Campinas, Cx. Postal 04, CEP 13490-970, Cordeirópolis, SP

(Aceito para publicação em 02/07/2002)

Autor para correspondência: Amauri Siviero

SIVIERO, A., SANTOS, F.A., CRISTOFANI, M., FURTADO, E.L. & MACHADO, M.A. Avaliação *in vitro* de genótipos de citros a *Phytophthora parasitica*. Fitopatologia Brasileira 29:300-302. 2004.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a reação de porta-enxertos de citros (*Citrus* spp.) a *Phytophthora parasitica*. As plântulas foram cultivadas em meio MS por 40 dias sendo, submetidas a fotoperíodo de 18 h, à temperatura de 25 °C. A inoculação foi realizada através da inserção de agulha infestada com micélio de *P. parasitica*. A avaliação foi realizada aos 15 dias após a inoculação, medindo-se o comprimento das lesões em

centímetros. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 15 repetições. Os resultados estão de acordo com as reações de campo dos genótipos e podem ser de grande utilidade em trabalhos envolvendo resistência varietal e seleção precoce de plantas.

Palavras-chave adicionais: citros, resistência a doenças, seleção precoce.

ABSTRACT

Evaluation *in vitro* of citrus rootstocks to *Phytophthora parasitica*

The objective of this work was to evaluate the effect on citrus (*Citrus* spp.) rootstocks to *Phytophthora parasitica* by *in vitro* inoculation. Seedlings were cultivated in MS media for 40 days, under 18 h of light

of photoperiod and at 25 °C. Inoculation was performed by injecting an infested needle into seedling collars. Evaluation was made by the length of lesions in centimeters. The experimental design was random with 15 replicates of each genotype. Results indicate good correlation between *in vitro* and orchard reactions genotypes to *P. parasitica*.

Entre as principais doenças provocadas por *Phytophthora parasitica* Dastur [sin. *Phytophthora nicotianae* Breda de Hann var. *parasitica* (Dastur) Waterhouse] na cultura de citros (*Citrus* spp.) no Brasil, se destaca a gomose de *Phytophthora*. A identificação e a seleção de genótipos resistentes a gomose é uma etapa importante no programa de melhoramento de citros. A literatura é escassa em trabalhos envolvendo a seleção *in vitro* de genótipos no patossistema citros-*Phytophthora*. Vardi *et al.* (1986) usaram filtrados de *P. citrophthora* em calos de quatro genótipos de citros, visando a seleção *in vitro* de genótipos para a resistência à doença, no entanto, não obtiveram sucesso nos experimentos. Crino *et al.* (1996) testaram *in vitro* toxinas de patógenos, enzimas purificadas e filtrados de patógenos de plantas em diversos patossistemas. No caso de *P. nicotianae* – tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), o uso de filtrado do patógeno foi eficiente na seleção de genótipos resistentes/suscetíveis. No patossistema *Phoma tracheiphila* (Petri) Kanchaveli & Gikashvili – limão [*Citrus limon* (L.) Burn. f.], a toxina do patógeno foi capaz de discriminar genótipos resistentes de suscetíveis.

A reação da resistência dos genótipos *in vitro* deve

apresentar o mesmo comportamento em relação ao patógeno em campo. Trabalhos em condições axênicas demonstram que genótipos de porta-enxertos para citros podem ser avaliados, *in vitro*, inoculando-se plântulas de híbridos de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (Bowman, 1996). A idade da planta e a luz são fatores que afetam a expressão da resistência dos genótipos em experimentos conduzidos *in vitro* no patossistema citros – *P. parasitica* (Bowman & Graham, 1996). Siviero *et al.* (2001) avaliaram a resistência de quatro porta-enxertos de citros à *P. parasitica* por meio de inoculações *in vitro*, medindo a porcentagem de plantas sadias. Os resultados das inoculações em laboratório concordaram com as reações de campo (Figura 1).

Este ensaio teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a reação de porta-enxertos para citros a *P. parasitica* visando a seleção precoce de genótipos a gomose.

As sementes dos genótipos 'Siciliano' (*Citrus limon*), 'Rugoso da África' (*C. jambhiri* Lush.), 'Volkameriano' (*C. volkameriana* Ten. & Pasq.), 'Sun Chu Sha Kat' (*Citrus* sp.), 'Azeda' (*C. aurantium* L.), 'Sunki' (*C. Sunki* Hort ex. Tan.), 'Cravo' [*C. limonia* (L.) Osbeck], 'Caipira' (*C. sinensis* Osbeck), Citrumelo 'Swingle' [*P. trifoliata* (L.) Raf. vs. *C. paradisi* Macf.),

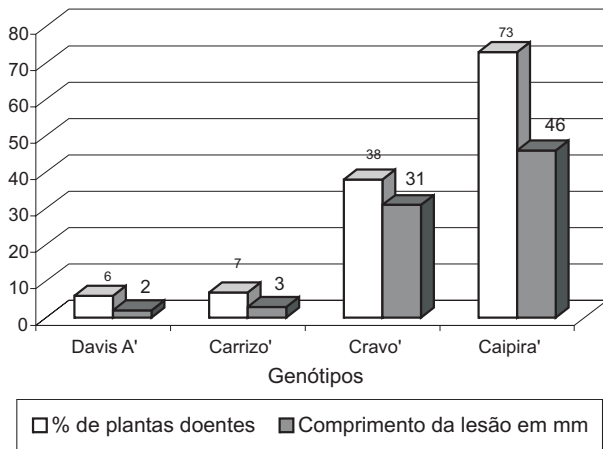


FIG 1 - Incidência de plantas doentes e comprimento de lesões causadas *P. parasitica* em quatro porta-enxertos de citros via inoculação *in vitro*.

tangerina 'Cleópatra' (*C. reshni* Hort ex.. Tan.) e citrange 'Carrizo' (*C. sinensis* vs. *P. trifoliata*) foram lavadas em água corrente e desinfestadas superficialmente em álcool 70%, por 5 min, e em solução a 25% de hipoclorito de sódio. Após secagem foram colocadas assepticamente em meio de cultura específico para germinação e crescimento em condições ambientais.

As plântulas foram cultivadas em tubos de ensaio com capacidade de 20,0 ml contendo 3,0 ml de meio de cultura MT (Murashigie & Tucker, 1969), suplementado com 0,1 mg/l de Benzilamiloipurina (BAP) e 1 mg/l de ácido indol butírico (AIB) para uniformizar o enraizamento. As plântulas permaneceram em câmara de crescimento por um período de 40 dias. Nos dez primeiros dias foram mantidas a 27 °C na ausência de luz, para estimular o estiolamento e, logo após, foram submetidas a fotoperíodo de 18 h, na mesma temperatura.

O método de inoculação consiste em realizar pequenos ferimentos com o auxílio de agulha infestada com micélio do patógeno na região do colo das plântulas. O micélio do patógeno foi retirado de colônias de *P. parasitica* com sete dias de idade. A agulha foi infestada através do contato com a cultura do patógeno em placa de Petri. Em seguida, foram realizados pequenos ferimentos na região do colo das plântulas permitindo-se o contato do patógeno com o interior da plântula. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Para cada genótipo foram inoculadas 17 plantas (repetições) sendo 15 plantas úteis e duas testemunhas feridas com agulha estéril, perfazendo um total de 68 plantas inoculadas. A avaliação foi realizada aos dez dias após a inoculação do patógeno medindo-se o comprimento das lesões em cm. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 1.

O método permite avaliar um grande número de genótipos em pequeno espaço físico e de tempo. Entre as desvantagens do método está a exigência de laboratório e mão-de-obra especializada, envolvendo custos, e o fato de que o genótipo a ser selecionado deve ser obtido de sementes, o que leva à seleção tardia de material, nem sempre desejável em

programas de melhoramento de citros. O fator custo é relativo quando comparado ao custo dos tratos culturais dispensados na formação de mudas e condução das plantas no campo. As inoculações em mudas e em plantas adultas de citros, no campo, são realizadas geralmente após quatro anos. Utilizando o método de inoculação em condições axênicas, a partir das sementes das plantas, num prazo de 40 dias, conseguiu-se obter resposta de reação de resistência dos genótipos ao patógeno. A técnica pode ser de grande utilidade em trabalhos envolvendo seleção de resistência varietal de genótipos ao patógeno.

O método de inoculação *in vitro* distinguiu genótipos de porta-enxerto para citros quanto à resistência a *P. parasitica* e pode ser utilizado na seleção precoce na fase de plântulas. Os resultados da reação de resistência/suscetibilidade dos genótipos em campo citados na literatura (Feichtenberger, 2001) estão em concordância com as reações encontradas nas inoculações *in vitro*.

TABELA 1 - Resistência de genótipos de citros (*Citrus* spp.) a gomose de *Phytophthora* via inoculação *in vitro*

Genótipo	Média das Notas*
'Siciliano' (<i>Citrus limon</i>)	2,262* A
'Rugoso da África' (<i>C. jambhiri</i>)	2,241 AB
'Volkameriano' (<i>C. volkameriana</i>)	2,068 ABC
'Sun Chu Sha Kat' (<i>Citrus</i> sp.)	1,977 ABCD
'Azeda' (<i>C. aurantium</i>)	1,73 ABCDE
'Sunki' (<i>C. Sunki</i>)	1,713 ABCDE
'Cravo' (<i>C. limonia</i>)	1,711 ABCDE
'Caipira' (<i>C. sinensis</i>)	1,515 ABCDE
Citrumelo 'Swingle' (<i>P. trifoliata</i> vs. <i>C. paradisi</i>)	1,43 BCDEF
tangerina 'Cleópatra' (<i>C. reshni</i>)	1,402 CDEF
citrange 'Carrizo' (<i>C. sinensis</i> vs. <i>P. trifoliata</i>)	1,229 DEF
<i>Poncirus trifoliata</i> 'Rubidoux'	1,171 DEF
<i>Poncirus trifoliata</i> 'Davis-A'	0,934 EF
citrange 'Troyer' (<i>C. sinensis</i> vs. <i>P. trifoliata</i>)	0,755 F

*Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (CV = 44,58; Média = 1,537; D.M.S. = 0,832). Valores transformados em raiz de x + 0,5.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOWMAN, K.D. Screening *Trifoliata* hybrids citrus rootstocks for resistance to *Phytophthora nicotianae* by *in vitro* inoculation. HortScience 31:591. 1996.
- BOWMAN, K.D. & GRAHAM, J.H. *In vitro* evaluation of citrus rootstocks for resistance to *Phytophthora nicotianae*. www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/00007/23/0000072353.html. 1996.
- CRINO, P., CRISTINZIO, G., GENTILE, A., HAEGI, A., RUGINI,

E. & SORESSI, G.P. Culture filtrates and toxins in the selection of disease resistant plants. *Petria* 6:197-217. 1996.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: Luz, E.D.M.N. *et al.* (Ed.). Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. São Paulo. Livraria Rural Editora, 2001. pp.283-342.

MURASHIGUE, T. & TUCKER, W. F. Growth factor requirements of citrus tissue culture. In: Proceedings, International Citrus

Symposium, Riverside, USA, V.3, 1969, pp.1155-1166.

SIVIERO, A., SANTOS, F.A., FURTADO, E.L. & MACHADO, M.A. Avaliação *in vitro* de porta-enxertos de citros a *Phytophthora parasitica*. *Fitopatologia Brasileira* 26:425.2001. (Resumo).

VARDI, A., EPSTEIN, E. & BREIMAN, A. Is the *Phytophthora citrophthora* culture filtrate a reliable tool for *in vitro* selection of resistant *Citrus* variants?. *Theoretical Applied Genetics*, 72:569-574. 1986.