

**MAPAS DE LIGAÇÃO DE *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. E  
*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux E LOCALIZAÇÃO  
DO GENE DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA TRISTEZA**

MARIÂNGELA CRISTOFANI  
Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto

Tese apresentada a Escola Superior de  
Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do título de  
Doutor em Agronomia, área de concentração:  
Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Janeiro/1997

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP**

Cristofani, Mariângela

Mapas de ligação de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux e localização do gene de resistência ao vírus da tristeza / Mariângela Cristofani. - - Piracicaba, 1997.

140 p. : il.

Tese (doutorado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.

Bibliografia.

1. Fruta cítrica 2. Marcador molecular 3. Porta-enxerto 4. Variedade resistente  
5. Vírus da tristeza (doença) I.Título.

CDD 634.3  
631.522

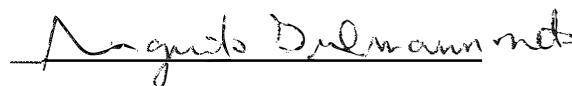
**MAPAS DE LIGAÇÃO DE *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. E  
*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux E LOCALIZAÇÃO  
DO GENE DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS DA TRISTEZA**

MARIÂNGELA CRISTOFANI

Aprovada em: 31/03/97

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto	CENA/USP
Prof <sup>a</sup> Dr <sup>a</sup> Aline A.P. Kleiner	ESALQ/USP
Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho	ESALQ/USP
Prof. Dr. Dário Grattapaglia	CENARGEN/EMBRAPA
Prof. Dr. Marcos Antônio Machado	CCSM/IAC



Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto

Orientador

Aos meus pais, irmãos e amigos,

Ofereço.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Augusto Tulmann Neto, pela amizade e orientação.

Ao Dr. Marcos Antônio Machado, pela amizade, orientação e por ter possibilitado as condições para realização deste trabalho.

Ao Dr. Dário Grattapaglia, pela amizade e orientação na construção dos mapas de ligação.

A Maria Luísa Penteado Natividade Targon pela amizade e generosidade em transmitir seu vasto conhecimento em biologia molecular.

Ao Dr. Gerd W. Müller pela amizade e valiosas sugestões a este trabalho.

Aos amigos Carlos Ivan Aguilar Vildoso, Helvécio Della Coletta Filho e Dr. Sérgio Alves Carvalho pelas valiosas sugestões a este trabalho.

Ao pessoal do laboratório de biotecnologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, Francineide, Dona Francisca, Wanderley, Paiola, Aritana, Luciano, Kleber, Eliane, Denise, Cilson, Rubens, Giovana, Andréia, Edson, William e Júlia, Elaine, Valderez, Alessandra, Anderson, Manuel e José Carlos pela agradável convivência.

Ao pessoal do escritório do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, Nildéia, Nadji, Keli e Elizete pela amizade e valiosa ajuda durante a realização desse trabalho.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, ao Departamento de Genética da ESALQ/USP; a CAPES pela concessão da bolsa de estudos; ao PADCT pelo financiamento do presente trabalho, a Fundação IAC e ao Fundecitrus.

## SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas .....	viii
Lista de Figuras .....	ix
Resumo .....	xiii
Summary .....	xv
Lista de Abreviaturas .....	xvii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	6
2.1. Genética e melhoramento de citros .....	6
2.2. Marcadores moleculares .....	19
2.3. A construção de mapas de ligação em espécies perenes .....	22
2.3.1. Mapeamento de características qualitativas .....	26
2.3.2. BSA (“Bulked Segregant Analysis”) .....	28
2.4. Vírus da tristeza dos citros .....	32
2.4.1. Tristeza dos citros .....	32
2.4.2. Detecção do vírus da tristeza dos citros .....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	36
3.1. Material vegetal .....	36
3.2. Geração de populações segregantes .....	38
3.3. Polinização .....	39
3.4. Germinação de sementes .....	40
3.5. Extração do DNA genômico .....	40
3.6. Quantificação e qualificação do DNA .....	41
3.7. Reações de amplificação .....	42

	Página
3.8. Visualização dos fragmentos amplificados .....	43
3.9. Análise dos dados moleculares ..	43
3.9.1. Análise para identificação de plântulas zigóticas e nucelares	43
3.9.2. Análise dos dados para construção dos mapas de ligação...	44
3.10. Avaliação da resistência ao CTV .....	46
3.10.1. Procedimento para “Western Blot” .....	46
3.10.1.1. Coleta do material vegetal .....	47
3.10.1.2. Procedimento para extração de proteínas .....	47
3.10.1.3. Preparo do gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) .....	47
3.10.1.4. Preparo das amostras para eletroforese.....	49
3.10.1.5. Corrida eletroforética .....	49
3.10.1.6. “Western blot “ .....	50
3.11. DIBA - “Dot immunobinding assay” .....	51
3.12. BSA - “Bulked Segregant Analysis” .....	51
3.13. Análise da presença ou ausência de marcadores RAPD ligados ao gene de resistência ao CTV em diferentes cultivares e hí- bridos de <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. ....	52
3.14. Micropropagação e enraizamento de estacas das plantas obtidas no cruzamento entre <i>Citrus sunki</i> Hort. ex. Tan. e <i>Poncirus</i> <i>trifoliata</i> (L.) Raf. cv. Rubidoux.....	52
3.14.1. Micropropagação .....	53
3.14.2. Enraizamento de estacas <i>in vivo</i> .....	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
4.1. Obtenção da população de mapeamento e identificação de plântulas nucelares e zigóticas .....	55
4.2. Multiplicação das plantas da progênie do cruzamento entre <i>Citrus</i> <i>sunki</i> Hort. ex. Tan. e <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. cv. Rubidoux .....	62

	Página
4.2.1. Micropropagação .....	62
4.2.2. Enraizamento de estacas .....	63
4.3. Mapas de ligação .....	65
4.3.1. Seleção de “primers” .....	65
4.3.2. Análise de ligação .....	72
4.3.3. Construção dos mapas de ligação .....	79
4.4. Mapeamento de QTL para resistência ao CTV .....	87
4.5. “Bulked segregant analysis” para o gene de resistência ao CTV.....	95
4.6. Análise de ligação e mapeamento do gene de resistência ao CTV .	102
4.7. Marcadores ligados ao gene de resistência ao CTV em cultiva- res e híbridos de <i>Poncirus trifoliata</i> e híbridos .....	103
5. CONCLUSÕES .....	112
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	116
APÊNDICE .....	137

## LISTA DE TABELAS

Tabela n°		Página
01	Plantas utilizadas em cruzamentos controlados para obtenção das progênes F1 .....	38
02	Resultados de cruzamentos controlados .....	55
03	Número médio de plantas micropropagadas e porcentagem de estacas enraizadas obtidas em plantas híbridas do cruzamento entre <i>Citrus sunki</i> Hort. ex. Tan. e <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. ....	64
04	“Primers” selecionados e número de marcadores polimórficos de uma população F1 de <i>Citrus sunki</i> Hort. ex. Tan. x <i>Poncirus trifoliata</i> cv. (L.) Raf. Rubidoux .....	71
05	Segregação de marcadores RAPD em uma progênie F1 e teste de homogeneidade para a segregação esperada 1:1 .....	75
06	Número de marcadores RAPD e o comprimento em Centimorgans (cM) de cada grupo de ligação do mapa de <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. cv. Rubidoux .....	79
07	Número de marcadores RAPD e o comprimento em Centimorgans (cM) de cada grupo de ligação do mapa de <i>Citrus sunki</i> Hort. ex. Tan.....	80
08	Avaliação para resistência ao CTV, 90 dias após a inoculação na progênie F1 utilizando “Western blot” .....	90
09	Co-segregação de 10 marcadores RAPD e resistência ao CTV na população de mapeamento .....	95
10	Marcadores ligados ao gene de resistência ao CTV em diferentes cultivares e híbridos de <i>Poncirus trifoliata</i> .....	103

## LISTA DE FIGURAS

Figura n°		Página
01	Amplificação do DNA de laranja ‘Caipira’ ( <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck) (1), limão ‘Cravo’ ( <i>Citrus limonia</i> Osbeck) (2) e plantas híbridas da progênie F1 (3 a 10) detectadas como “primer” OPE16 .....	61
02	Triagem de “primers” para a configuração “pseudo-testcross”. O “primer” OPN15 foi utilizado para reação de PCR com o DNA genômico dos parentais <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. cv. Rubidoux (1) e <i>Citrus sunki</i> Hort. ex. Tan. (2) e uma amostra de 6 indivíduos da progênie F1. Marcadores polimórficos estão indicados. M = Marcador de peso molecular .....	69
03	Similaridade genética, com base em 253 marcadores, entre os indivíduos resultantes do cruzamento de tangerina ‘Sunki’ ( <i>Citrus sunki</i> Hort. ex. Tan.) e <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. cv. Rubidoux (coeficiente Dice) .....	70
04	Amplificação dos DNAs de <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. cv. Rubidoux (P1), <i>Citrus sunki</i> Hort. ex. Tan. (P2) e plantas da progênie F1 (todas as outras colunas). O DNA foi amplificado com os “primers” 5’- CGCGGCCA - 3’(A), OPA10 (B), OPM05 (C) e OPH04 (D). As setas indicam os marcadores polimórficos. M = marcador de peso molecular (1-Kb Ladder) .	78

- 05 Mapa genético de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux. As relações de ligação de 60 marcadores RAPD e o gene de resistência a tristeza dos citros (Ctv) foram estabelecidas com um critério de LOD=4,0 e um  $\theta$  máximo = 0,30. Os marcadores RAPD estão indicados pelo código do “primer” da Operon, tamanho do fragmento e fase de ligação (+ ou -). Os locos mostrando distorção significativa da taxa de segregação esperada (1:1) estão indicados com um asterisco. Os números à esquerda dos mapas indicam as distâncias em centimorgans (cM) ..... 84
- 06 Mapa genético de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan.. As relações de ligação de 63 marcadores RAPD foram estabelecidas com um critério de LOD=4,0 e um  $\theta$  máximo = 0,30. Os marcadores RAPD estão indicados pelo código do “primer” da Operon, tamanho do fragmento e fase de ligação (+ ou -). Os locos mostrando distorção significativa da taxa de segregação esperada (1:1) estão indicados com um asterisco. Os números à esquerda dos mapas indicam as distâncias em centimorgans (cM) ..... 85
- 07 Amplificação do DNA de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux (coluna 2), *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. (coluna 3) e plantas da progênie F1 com o “primer” OPQ14. As setas indicam dois marcadores (OPQ14\_600/570) provenientes de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e ligados em repulsão ..... 86

	Página
08	Enxertia de borbulhas de híbridos de <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. cv. Rubidoux e <i>Citrus sunki</i> Hort. ex. Tan. (A) e borbulhas de laranja doce cv. ‘Barão B’ contaminadas com isolado severo de CTV (B) em porta-enxerto limão ‘Cravo’ ( <i>Citrus limonia</i> Osbeck) ..... 92
09	Análise de “Western blot” utilizando proteína extraída da nervura principal de folhas de uma progênie F1 do cruzamento de <i>Citrus sunki</i> e <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. cv. Rubidoux. Colunas 1 e 2 controles positivos (laranjas ‘Pera IAC’ e ‘Pera Rio’, respectivamente), colunas 3 e 4 controles negativos (limão ‘Galego’ e laranja ‘Pera IAC’ microenxertada, respectivamente), 5 tangerina ‘Sunki’ e 6 ‘Rubidoux’. As outras colunas representam amostras de plantas da progênie F1. Três colunas (isto é, 7,8,9; 10,11,12; 13,14,15 e 16, 17, 18) representam as amostras de três repetições de cada uma das plantas híbridas. A análise foi realizada utilizando o anticorpo policlonal BR-1006 (diluição 1:10.000) ..... 93
10	Análise “DIBA” utilizando proteína extraída de nervura principal de folhas de uma progênie F1 do cruzamento de <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. cv. Rubidoux e <i>Citrus sunki</i> Hort. ex. Tan. (a) Controle positivo (laranja ‘Pera IAC’) e (b) amostra da progênie positiva para CTV. A análise foi realizada utilizando o anticorpo policlonal BR-1006 (diluição 1: 10.000).. 94
11	Amplificação do DNA de <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. cv. Rubidoux (P1), <i>Citrus sunki</i> Hort. ex. Tan. (P2) e plantas da progênie F1, B1 (“Bulk” de plantas que multiplicaram o vírus da tristeza) e B2 (“Bulk” de plantas que não multiplicaram o vírus da tristeza). As setas a e b indicam bandas polimórficas que estão segregando na população. A seta b indica um marcador (OPE07_820) que está presente no “Bulk” B2 e ausente no “Bulk” B1 ..... 99



	Página
12	Amplificação de DNA de <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf cv. Rubidoux (a), <i>Citrus sunki</i> Hort. ex. Tan. (b), “bulk” (+) (c) e “bulk” (-) (d). As setas indicam os marcadores associados ao gene de resistência ao vírus da tristeza dos citros. A seta 1 indica o marcador OPN08_2750, a seta 3 indica o marcador OPAV12_470 e a seta 4 indica o marcador OPAV11_1430 ligado em repulsão ao gene de resistência a tristeza dos citros. M = marcador de peso molecular (1-Kb Ladder) ..... 100
13	Padrões de amplificação de fragmentos de DNA de <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf cv. Rubidoux (1), <i>Citrus sunki</i> Hort. ex. Tan. (2), “bulk” (+) (3) e “bulk” (-) (4). A seta indica o marcador OPE16_510 ligado em repulsão ao gene de resistência a CTV. M = marcador de peso molecular (1- Kb Ladder) ..... 101
14	Padrões de amplificação do DNA de cultivares e híbridos de <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. (1) marcador OPA04_480, (2) marcador OPN08_2750 e (3) marcador OPAV12_470. (a) ‘Flying Dragon’, (b) ‘Carrizo’, (c) ‘Rusk’, (d) ‘Kryder’, (e) ‘Cleopatra’ x ‘Rubidoux’, (f) ‘Sunki’ x ‘English Large’ e (g) ‘Davis a’. M = marcador de peso molecular (1-Kb Ladder) ..... 109
15	Padrões de amplificação do DNA de cultivares e híbridos de <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. (1) marcador OPAV11_1430, (2) marcador OPE16_510 e (3) marcador OPAT07_400. (a) ‘Flying Dragon’, (b) ‘Carrizo’, (c) ‘Rusk’, (d) ‘Kryder’, (e) ‘Cleopatra’ x ‘Rubidoux’, (f) ‘Sunki’ x ‘English Large’ e (g) ‘Davis a’. M = marcador de peso molecular (1-Kb Ladder) ..... 110
16	Padrões de amplificação do DNA de cultivares e híbridos de <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. com o “primer” OPW18. (a) ‘Rubidoux’, (b) ‘Kryder 15-3’, (c) ‘Davis A’, (d) ‘Fying Dragon’, (e) citrange ‘Carrizo’, (f) citrange ‘Rusk’ e (g) citrandarin ‘Cleopatra’ x ‘Rubidoux’. A seta indica o marcador OPW18_450. M = marcador de peso molecular. .... 111

**MAPAS DE LIGAÇÃO DE *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.  
cv. Rubidoux E LOCALIZAÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA A TRISTEZA**

Autora: Mariângela Cristofani

Orientador: Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto

**RESUMO**

Mapas de ligação foram construídos para indivíduos de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv Rubidoux explorando a estratégia de mapeamento “pseudo-testcross” com marcadores RAPD. A partir de cruzamentos controlados realizados em 1993 foram obtidos 314 indivíduos F1. Dois conjuntos de dados foram obtidos, um para cada progenitor. As análises de ligação foram realizadas utilizando o programa MAPMAKER para Macintosh versão 2.0 a um LOD > 4,0 e uma frequência máxima de recombinação ( $\theta$ ) = 0,30. Um total de 208 “primers” decâmeros de sequência arbitrária foram utilizados para selecionar aqueles que mostravam polimorfismo na progênie. A configuração “pseudo-testcross” foi detectada por 78 “primers” onde o marcador estava presente em um parental, ausente em outro e segregava na F1. Os 78 “primers” selecionados foram utilizados para análise RAPD em 80 indivíduos da progênie F1 produzindo um total de 168 marcadores. A análise de ligação dos locos revelou que 123 marcadores foram mapeados em 18 grupos de ligação (10 grupos de ‘Sunki’ e 8 grupos de ‘Rubidoux’)

enquanto que 45 marcadores não se ligaram a qualquer grupo. O comprimento total dos mapas foi de 732,32 cM para ‘Sunki’ e 867,58 cM para ‘Rubidoux’ com a distância entre marcadores variando de 0 a 43,8 cM (Kosambi).

Marcadores moleculares ligados ao gene de imunidade ao vírus da tristeza dos citros foram mapeados no grupo de ligação I de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux. O marcador encontrado mais próximo ao Ctv foi o OPAV12\_470 localizado a 17,8 cM do gene.

Cem híbridos obtidos no cruzamento entre *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Rubidoux foram também avaliados quanto sua capacidade de multiplicação *in vitro* e enraizamento de estacas, visando futuros trabalhos de seleção à gomose de *Phytophthora*.

Os marcadores RAPD foram utilizados também para a identificação de plântulas nucelares e zigóticas dos cruzamentos: laranja ‘Caipira’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) x laranja ‘Azeda’ (*Citrus aurantium* L.) e laranja ‘Caipira’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) x limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck), sendo que foram obtidos 17 (6%) e 8 (9,6%) híbridos em cada cruzamento, respectivamente.

**GENETIC LINKAGE MAPPING OF *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux AND LOCALIZATION OF THE CITRUS TRISTEZA VIRUS RESISTANCE GENE**

Author: Mariângela Cristofani

Adviser: Dr Augusto Tulmann Neto

**SUMMARY**

Genetic linkage maps for *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux have been developed exploiting the pseudo-testcross mapping strategy using RAPD markers. From controlled crosses 314 F1 zygotic progeny individuals were obtained. Two separate data sets were generated, one for each parent. Preliminary linkage analysis was carried out using MAPMAKER V2.0 for Mac under a phase-unknown backcross model at a LOD > 4.0 and max.  $\theta = 0.30$ . A total of 208 arbitrary 10-mer primers were screened for segregating RAPD markers. Pseudo-testcross mating configurations were displayed by 78 primers where the marker was present in one parent, absent in the other and segregating in the progeny. These 78 primers were run on 80 progeny amplifying a total of 168 RAPD markers. Linkage analysis revealed that 123 of these RAPD loci fell into 18 linkage groups ( 10 groups for 'Sunki' e 8 groups for 'Rubidoux') while 45 loci remained unassigned to any linkage group. The total length of the maps was 732.32 cM for 'Sunki'

and 867.58 cM for 'Rubidoux' with the distance between markers ranging from 0 to 43.8 cM.

A QTL for citrus tristeza virus immunity in *Poncirus trifoliata* was mapped. The *Ctv* gene region was found to be located on linkage group I of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux. The closest molecular marker to the CTV immunity locus was OPAV12\_470 at 17.8 cM.

One hundred hybrids obtained from the cross between *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux were multiplied using micropropagation and rooting of stem cuttings.

RAPD markers were also used to identify nucellar and zygotic seedlings in crosses of sweet orange 'Caipira' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) x sour orange (*Citrus aurantium* L.) and sweet orange 'Caipira' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) x 'Rangpur lime' (*Citrus limonia* Osbeck). In each cross, 17 (6%) and 8 (9.6%) hybrids were obtained, respectively.

## LISTA DE ABREVIATURAS

No decorrer do presente trabalho foram utilizadas abreviaturas, cujo significado é dado a seguir:

BAP	Benzil-aminopurina
CTAB	Hexadecyltri-methylammonium Bromide
dNTPs	Deoxyribonucleoside Triphosphates
EDTA	Etileno Diamino Tetra-acetato
IBA	Ácido Indolacético
NAA	Ácido Naftalenoacético
QTL	Quantitative Trait Loci
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TAE	Tampão Tris- acetato/EDTA
TEMED	N, N, N', N' - tetra- methylethylenediamine
TRIS	(Hydroxymethyl) Aminomethanol

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de citros, particularmente de laranja e também o maior exportador de suco concentrado (NEVES, 1996). Segundo dados da FAO, em 1994 o país deteve 31,7% da produção mundial de laranja e o Estado de São Paulo respondeu por 79,3% da produção total do país, tornando-o o maior produtor mundial de laranja e superando inclusive, a produção dos Estados Unidos, que ocupou o segundo lugar em 1994.

Apesar do gênero *Citrus* apresentar uma grande diversidade de espécies, um pequeno número de variedades é utilizado comercialmente. Em um cadastramento de viveiros no Estado de São Paulo realizado recentemente pelo Fundecitrus (REVISTA DO FUNDECITRUS, 1996), observa-se a predominância do limão ‘Cravo’ (85%), seguido pela tangerina ‘Cleopatra’ (9%), citrumelo ‘Swingle’ (3%) e tangerina ‘Sunki’, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e limão ‘Volkameriano’ (1%), como variedades utilizadas como porta-enxertos. Estes dados se referem à distribuição de porta-enxertos em mudas já enxertadas.

Das variedades mais utilizadas como copa, destacam-se a 'Pêra' (36%), 'Natal' e 'Valência' (14%), tangerina 'Ponkan' (10%) e limão 'Taiti' (7%). Estas mais 'Hamlin', 'Valência Americana'; 'Westin' e 'Murcote' representam 91% das variedades que compõem as mudas enxertadas.

A utilização de um pequeno número de variedades com estreita base genética e o sistema de produção dos citros, caracterizado como monocultura em grandes extensões de área, torna a citricultura bastante vulnerável às pragas e doenças, como aconteceu com a tristeza dos citros na década de 40 (MOREIRA & MOREIRA, 1991). O problema foi contornado com o emprego em larga escala de embriões nucelares e a completa reformulação das combinações copa e porta-enxertos. O aparecimento da tristeza impediu que se continuasse utilizando a laranja 'Azeda' como porta-enxerto, exceto para variedades de copa mais tolerantes à virose, como por exemplo, os limões verdadeiros. A partir de 1960 o limão 'Cravo' passou a ser quase o único porta-enxerto utilizado.

Com o aparecimento do declínio de plantas cítricas no Estado de São Paulo na década de 70 (BERETTA *et al.*, 1989), situação semelhante vem sendo observada em pomares comerciais, onde um grande número de plantas afetadas por essa anomalia vem sendo constatado. A sua incidência é maior em plantas de laranja doce enxertadas sobre limão 'Cravo'. Em plantios novos, e na reposição de plantas mortas pelo declínio, vem se observando uma substituição lenta e gradativa das plantas afetadas por combinações varietais, como por exemplo, plantas formadas sobre os cavalos de laranja 'Caipira', tangerinas 'Cleopatra' e 'Sunki', fazendo com que o problema com podridões de raízes e gomose causados por fungos do gênero *Phytophthora* se tornem preocupantes (FEICHTENBERGER, 1989).



Atualmente, o maior problema da citricultura brasileira é a clorose variegada dos citros (CVC) que foi detectada primeiramente nos Estados de São Paulo e Minas Gerais em 1987 (ROSSETTI & NEGRI, 1990). Esta doença vem se espalhando rapidamente e representa uma séria ameaça à citricultura, já tendo sido constatada em cerca 82% dos pomares de São Paulo (POMPEU Jr., 1996).

Além das doenças, pragas como cochonilhas (várias espécies), coleópteros (*Pantomorus cervinus* e *Naupctus*), ácaros da ferrugem, da leprose, das gemas e o bicho furão (*Gymnandrosoma aurantianum*) podem ser citados como graves problemas a serem enfrentados (MACHADO *et al.*, 1996a).

O histórico da citricultura brasileira evidencia a necessidade de se buscar novas variedades e combinações de copas e porta-enxertos.

O melhoramento dos citros por métodos tradicionais tem sofrido limitações devido à descontinuidade nos programas estabelecidos e a fatores biológicos característicos da espécie, como por exemplo, longos ciclos de reprodução, juvenildade, poliembrionia nuclear e poliploidia (GROSSER & GMITTER Jr., 1990).

O advento dos marcadores moleculares tornou possível a construção de mapas genéticos para um grande número de espécies de plantas anuais e perenes. A construção de tais mapas é a base para estudos avançados de genética, além de possibilitar a localização de marcadores flanqueando genes de interesse agrônômico. Tais marcadores são potencialmente úteis aos programas de melhoramento pois permitem a identificação de características desejadas sem a necessidade de se empregar métodos clássicos de avaliação e seleção para resistência a doenças, por exemplo. Permitem também a seleção precoce de

características que somente irão se expressar no estágio adulto das plantas (TANKSLEY *et al.*, 1989).

Técnicas especiais como BSA - “Bulked Segregant Analysis” (MICHELMORE *et al.* 1991) e linhagens isogênicas associadas a marcadores moleculares, tais como RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”), RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) e AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) têm sido utilizadas visando focalizar uma ou mais regiões do genoma que controlam uma característica qualitativa ou quantitativa.

O BSA tem sido particularmente interessante para espécies perenes, onde a construção de linhagens isogênicas através de retrocruzamentos é inviável. Amostras agrupadas de DNA (“bulk samples”) são construídas misturando-se quantidades equimolares de DNA de indivíduos de uma população segregante que possuem um determinado fenótipo (por exemplo, resistência a doenças). A detecção de polimorfismo entre os dois “bulks” pode revelar a existência de marcadores que estejam ligados ao gene de interesse. A confirmação da ligação é realizada analisando-se a co-segregação do marcador e do fenótipo na progênie que deu origem às amostras agrupadas.

Em citros, GMITTER Jr. *et al.* (1996) e ROOSE *et al.* (1996) encontraram marcadores associados ao vírus da tristeza, porte da árvore e acidez dos frutos utilizando BSA e marcadores moleculares do tipo RAPD. A identificação de marcadores ligados a estes genes potencialmente possibilitará identificar plantas com características desejadas indiretamente através da seleção assistida por tais marcadores (MAS - “Marker Assisted Selection”).

O presente trabalho teve como principais objetivos: (a) obter uma população segregante entre *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv Rubidoux, laranja 'Caipira' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) e laranja 'Caipira' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e laranja 'Azeda' (*Citrus aurantium* L.); (b) avaliar resistência e tolerância das progênies de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. em relação a tristeza; (c) mapear QTL para resistência e tolerância a tristeza dos citros na progênie de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux; (d) o estudo da herança da resistência ao CTV em híbridos F1 de tangerina 'Sunki' e *Poncirus trifoliata* e (e) clonar plantas obtidas nos cruzamentos visando obter um número suficiente de plantas para avaliar resistência a doenças do sistema radicular como gomose de *Phytophthora* e declínio dos citros.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Genética e melhoramento de citros

Os *Citrus* são cultivados em climas tropicais e subtropicais, em uma faixa do globo terrestre aproximadamente entre as latitudes 40° N e 40° S.

O gênero *Citrus* pertence a subtribo *Citrinae*, tribo *Citreae*, sub-família *Aurantioideae* da família *Rutaceae*. Este gênero também contém espécies do sub-gênero *Papeda*, que não apresenta frutos comestíveis. Além dos *Citrus*, a subtribo *Citrinae* apresenta mais 12 outros gêneros divididos em três grupos, o grupo dos “citros primitivos” (*Severinia*, *Pleiospermium*, *Burkillanthus*, *Limnocitrus* e *Hesperathusa*), o grupo dos gêneros “próximos a citros” (*Citropsis* e *Atalantia*) e o grupo dos “citros verdadeiros” que inclui o gênero *Citrus* e cinco outros gêneros: *Eremocitrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus* e *Clymenia*. Na grande maioria das espécies de *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*

o número de cromossomos é  $x = 9$ , sendo a diploidia ( $2n = 18$ ) a condição normal nesses grupos de plantas.

A subtribo *Citrinae* é nativa de uma ampla área Asiática que vai desde a região do Himaláia na Índia até o Norte e Centro da China, estendendo-se a Burma, Tailândia, Indonésia e Nova Caledônia. Os centros de origem dos principais cultivares comerciais de *Citrus* não foram definidos com clareza devido à provável hibridização ocorrida em tempos antigos. COOPER & CHAPOT (1977) relatam, baseados em escritos chineses, que quase todos os cultivares de *Citrus* se originaram na China. Esta hipótese está de acordo com estudos recentes do genoma de cloroplastos de cultivares de *Citrus* (GREEN *et al.*, 1986).

A situação taxonômica das tribos, subtribos, gênero e espécies na sub-família *Aurantioideae* é bastante complexa. Os *Citrus* e muitos gêneros relacionados se hibridizam (SWINGLE & REECE, 1967). Portanto, não há separação clara entre espécies. A classificação dos citros é controversa, enquanto Linnaeus (1753) (BARRETT & RHODES, 1976) reconheceu somente duas espécies (*Citrus medica* L. e *Citrus aurantium* L.), SWINGLE (1943) relatou a existência de 16 espécies no gênero *Citrus* e TANAKA (1954) descreveu 162 espécies. Entretanto, alguns críticos acreditam que Tanaka tenha incluído muitos híbridos que não garantem a condição de espécie. Por outro lado, acreditam que Swingle combinou muitas plantas dissimilares em uma única espécie.

Estudos recentes utilizando quimiotaxonomia (SCORA & KUMAMOTO, 1983) e morfologia de plantas (BARRETT & RHODES, 1976; SCORA, 1988) sugerem a existência de somente três grupos em *Citrus*, o primeiro consistindo de *Citrus medica* L., *Citrus aurantifolia* L. e *Citrus limon* Burm. f. (Grupo de *Citrus medica* L.), o segundo

consistindo de *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus sinensis* L. Osbeck, *Citrus paradisi* Macf., *Citrus aurantium* L. e *Citrus jambhiri* Lush. (Grupo de *Citrus reticulata* Blanco) e o terceiro consistindo de *Citrus grandis* L. Osbeck (Grupo *Citrus grandis* L. Osbeck ). Uma quarta espécie, *Citrus halimii*, também existe mas não tem importância comercial. Estes grupos derivaram de estudos utilizando dados bioquímicos, morfológicos e anatômicos, tais como grau de poliembrião. Portanto, de acordo com estes estudos, as cidras (*Citrus medica* L.), as toranjas (*Citrus grandis* L. Osbeck ) e as tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco) são as únicas espécies de importância comercial. Os outros biótipos têm, provavelmente, origem híbrida, e foram propagados apomiticamente. As laranjas doces parecem ser híbridos de tangerinas e limão Rugoso ou *Citrus grandis* L. Osb. e as limas ácidas híbridos de *Citrus medica*, *Citrus grandis* e *Microcitrus* (SCORA, 1988). A condição de apenas três espécies ancestrais é apoiada por estudos baseados em isoenzimas, RFLP e minissatélites (GREEN *et al.*, 1986; HANDA *et al.*, 1986; TORRES *et al.*, 1978; ROOSE, 1988; LURO *et al.*, 1992).

Além dos estudos morfológicos, bioquímicos e moleculares, estudos citogenéticos têm sido realizados principalmente visando determinar as relações taxonômicas das espécies/variedades de *Citrus* (AGARWAL, 1987; IWAMASA & NITO, 1988), os mecanismos citogenéticos envolvidos na redução da fertilidade e ausência de sementes em citros (BOAVENTURA & PIO, 1989) e na formação de poliplóides (CAMERON & FROST, 1968; IWAMASA & NITO, 1988).

AGARWAL (1987) realizou um estudo sobre o comportamento meiótico de três híbridos intergenéricos: citrumelo, citrange e limequat e observou uma estreita homologia entre os cromossomos de *Citrus* e *Poncirus*. A não formação de univalentes,

multivalentes ou anormalidades como translocações e inversões indicam que os genomas destes gêneros não são diferentes estruturalmente.

Um outro trabalho foi realizado pelo mesmo autor (AGARWAL, 1989) onde foi estudada a citomorfologia de três híbridos intergenéricos: (*Citrus jambhiri* x *P. trifoliata*), (*Citrus reshni* x *P. trifoliata*) e (*Citrus paradisi* x *Citrus reticulata*) x *P. trifoliata*. Os estudos meióticos mostraram a formação de nove bivalentes e distribuição equitativa dos cromossomos nas anáfases I e II, indicando uma estreita homologia no genoma desses dois gêneros.

Entretanto, em estudos realizados por IWAMASA & NITO (1988) foram observadas univalentes em alguns cruzamentos mostrando que existe uma diferenciação cromossômica entre algumas espécies de *Citrus* e *Poncirus*. Segundo os autores, existe diferença na época de florescimento entre os dois gêneros, o que pode ter causado diferenças estruturais nos cromossomos das duas espécies.

AGARWAL (1992) conduziu estudos meióticos em nove espécies de *Citrus*: *Citrus amblycarpa*, *Citrus canaliculata*, *Citrus depressa*, *Citrus hystrix*, *Citrus keraji*, *Citrus macrophylla*, *Citrus nakoor* e *Citrus shukokan*. O número de cromossomos foi  $2n=18$  em todas as espécies. A formação regular de bivalentes na meiose indicou que os genomas de cada espécie eram homólogos e não apresentavam grandes diferenças estruturais. A presença de associações secundárias de bivalentes em *Citrus canaliculata*, *Citrus hystrix*, *Citrus keraji*, *Citrus macrophylla* e *Citrus shukokan* indicou a origem híbrida destas espécies.

O fato de que os *Citrus* e os gêneros relacionados se hibridizam com certa facilidade tem criado um grupo de plantas interessante para o melhoramento. A existência

de híbridos intergenéricos é comum entre *Citrus* e gêneros relacionados. Swingle desenvolveu um elaborado sistema de nomenclatura dos híbridos, como por exemplo, os citranges [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf x *Citrus sinensis*], citrandarins (*P. trifoliata* x *Citrus reticulata*), citremons [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf x *Citrus limon*], citradias (*P. trifoliata* x *Citrus aurantium*), citrumquats (*P. trifoliata* x *Fortunella spp*), eremoranges (*Citrus sinensis* x *Eremocitrus spp*), entre outros. Híbridos interespecíficos incluem os tangores (*Citrus sinensis* x *Citrus reticulata*), tangelos (*Citrus paradisi* x *Citrus reticulata*), lemonanges (*Citrus limon* x *Citrus sinensis*) (DAVIES & ALBRIGO, 1994).

Embora a diversidade genética de *Citrus* seja grande, a base genética de várias espécies economicamente importantes é estreita, especialmente *Citrus sinensis* L. Osb. (laranja doce) e *Citrus paradisi* Macf. (pomelos). Estas “espécies” provavelmente se originaram como híbridos interespecíficos e a proliferação de cultivares se deu pela seleção de mutações somáticas. Cerca de 24% das variedades de laranjas doce são comprovadamente originadas de mutações de gemas, enquanto 23% o foram a partir de mutações em plântulas. O restante tem origem desconhecida (HODGSON, 1967).

Apesar da facilidade de cruzamento, a obtenção de novas variedades em *Citrus* tem sido prejudicada por uma série de fatores relacionados às características biológicas de suas espécies.

As dificuldades que limitam o melhoramento de *Citrus* pelos métodos convencionais (longo ciclo reprodutivo, alta heterozigosidade, esterilidade, apomixia, juvenilidade prolongada, depressão por endogamia) também limitam significativamente os estudos genéticos em citros (GROSSER & GMITTER Jr., 1990).



A apomixia ou embrionia nucelar representa um dos maiores obstáculos aos programas de melhoramento via hibridização sexual em citros. Os embriões nucleares competem com o embrião zigótico por espaço e nutrientes nas sementes em desenvolvimento, resultando frequentemente na perda do embrião zigótico (FROST & SOOST, 1968). São conhecidas três formas de poliembrionia nos citros: a) a poliembrionia nucelar, dando origem a um número variável de “seedlings” maternos idênticos e derivados do nucelo; b) a poliembrionia por clivagem, originada pela suposta bipartição do embrião sexual e c) a poliembrionia decorrente da existência de mais de um gametófito normal no óvulo.

FROST (1926, 1938) observando 1200 híbridos, encontrou dez casos em que dois “seedlings” híbridos aparentemente idênticos em sua constituição genética provinham da mesma semente. Para explicar a origem de tais gêmeos propôs e posteriormente comprovou a hipótese da poliembrionia por clivagem.

MEDINA FILHO *et al.* (1993) relataram que em cerca de 1000 plantas analisadas genotipicamente com isoenzimas, determinou-se 633 híbridos. Entre estes híbridos, foram identificados 12 pares de gêmeos e 1 trigêmeo. O trigêmeo (*Citrus sunki* Hort. ex. Tan. x *Citrus aurantium*) e 10 pares de gêmeos [*Citrus sunki* x *Citrus limonia*, *Citrus sunki* x *Citrus aurantium*, *Citrus sunki* x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] eram monozigóticos enquanto que os dois restantes (*Citrus sunki* x *Citrus aurantium*, *Citrus sunki* x *Citrus limonia*) eram dizigóticos. Uma vez determinadas as contribuições alélicas dos gametas femininos foi possível concluir que na formação de cada planta dos dois pares de gêmeos dizigóticos participaram gametas femininos geneticamente distintos.

A proporção de embriões zigóticos e nucelares varia grandemente com as espécies/variedades de citros (MONTENEGRO, 1958). Algumas podem produzir somente embriões zigóticos (monoembriônicas), como é o caso das cidras (*Citrus medica*), toranjas (*Citrus grandis*), *Citrus clementina*, *Citrus tangerina*, *Citrus temple*, *Citrus nobilis* e *Citrus halimii* (BARRETT & RHODES, 1976, SCORA & KUMAMOTO, 1983); outras produzem somente embriões nucelares, como é o caso de alguns citranges (*P. trifoliata* x *Citrus sinensis*) e tangelos (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*). Outros ainda produzem um número variável de embriões nucelares e zigóticos. SOARES FILHO *et al.* (1992) encontraram frequências de embriões zigóticos de 18,6% para limão ‘Cravo’, 6,0% para laranja ‘Pera’ e 5,2% para tangerina ‘Cleopatra’ sendo que o número médio de embriões por semente foi de 2,0 para limão ‘Cravo’, 6,3 para Laranja ‘Pera’ e 10,1 para tangerina ‘Cleopatra’ em cruzamentos com *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

Devido à poliembrionia, a produção de uma população de híbridos segregantes de tamanho suficiente para a seleção se torna difícil. Várias técnicas têm sido utilizadas para identificar plântulas zigóticas e plântulas nucelares, como por exemplo, isoenzimas (TORRES *et al.*, 1982; MOORE & CASTLE, 1988; XIANG & ROOSE, 1988; MEDINA FILHO *et al.*, 1993) ou marcadores do tipo RAPD (BASTIANEL, 1995; CRISTOFANI *et al.*, 1996). A utilização de variedades monoembriônicas como tangerinas ‘Dancy’ e ‘Clementina’ e toranjas (*Citrus grandis*) ou mesmo variedades poliembriônicas que gerem uma progênie com grande número de “seedlings” zigóticos, tem sido uma das opções para os programas de melhoramento envolvendo hibridização sexual.

A poliploidia é bastante comum em citros e é um dos fatores que interferem na já complexa transmissão de caracteres. O número básico de nove cromossomos aparece

em algumas variedades, não somente multiplicado por dois, mas também em maior número, como ocorre com as formas tetraplóides e triplóides (IWAMASA & NITO, 1988).

As plantas tetraplóides ( $2x = 36$ ) apresentam as folhas maiores na largura, mais espessas e a coloração tende a ser mais escura. O crescimento é mais lento nos tetraplóides e as brotações vigorosas são menos comuns. A planta é menor, menos ereta e mais compacta, demora mais a florescer e geralmente frutifica menos (MOREIRA & PIO, 1991).

CAMERON & FROST (1968) realizaram uma ampla revisão sobre o assunto. O número de sementes é baixo em alguns tetraplóides. Quando as sementes são poucas, muitos frutos podem ter um bom desenvolvimento, eles apresentam a tendência de serem maiores e mais alongados que os correspondentes diplóides. O número de embriões por semente tende a ser menor nos tetraplóides e o tamanho médio dos embriões é maior.

As plantas autotetraplóides produzem frutos de baixa qualidade e têm baixo rendimento na produção em comparação com as plantas diplóides. Entretanto, elas são valiosas no melhoramento, uma vez que, em cruzamentos com plantas diplóides podem produzir variedades triplóides sem sementes (GROSSER & GMITTER Jr., 1990).

Os triplóides assim como os tetraplóides ocorrem espontaneamente entre os “seedlings” de citros, e podem também ser produzidos em certos cruzamentos. Normalmente, os triplóides são provenientes de “seedlings” de origem sexual enquanto os tetraplóides surgem como formas apomíticas (CAMERON & FROST, 1968; SOOST & CAMERON, 1981; BARRETT & HUTCHISON, 1981).

A partenocarpia, desenvolvimento de frutos sem fertilização levando à formação de frutos sem sementes, ocorre em citros devido à esterilidade gamética ou auto-

incompatibilidade. A esterilidade gamética e a auto-fecundação têm sido juntamente com a triploidia as principais causas do aparecimento de frutos sem sementes (IWAMASA, 1966; SPIEGEL-ROY & VARDI, 1989).

A base genética da partenocarpia em *Citrus* e o número de genes envolvidos neste fenômeno são pouco compreendidos, no momento. Existem dois tipos de partenocarpia - autônoma (como ocorre na laranja 'Bahia' e tangerina 'Satsuma') e estimulada (auto-incompatibilidade em variedades tais como 'Clementina', 'Nova' e 'Ellendale', etc) (VARDI, 1992).

Em alguns casos, certos genes ou combinações de genes são letais para o desenvolvimento do grão de pólen ou saco embrionário de forma que não são produzidos gametas viáveis. Uma constituição genética particular pode impedir o desenvolvimento de estames e pistilos, ou dos tecidos reprodutivos na planta. A esterilidade da laranja 'Washington Navel' ou 'Bahia' é deste tipo, uma vez que as células mãe dos grãos de pólen se degeneram antes da divisão reducional (IWAMASA, 1966).

A redução cromossômica irregular, levando a presença de cromossomos extras ou à falta de uma parte do conjunto normal, pode levar à esterilidade gamética ou aborto do embrião. Esta é a principal causa da esterilidade nos triplóides e que também reduz grandemente a fertilidade dos tetraplóides. Problemas na redução meiótica dos cromossomos ocorrem frequentemente em híbridos obtidos a partir de cruzamentos distantes (IWAMASA, 1966).

Para RAGHUVANSHI (1962) a porcentagem de grãos de pólen inviáveis parece ser razoavelmente alta entre várias categorias taxonômicas de *Citrus*, variando de

3,0% a 86% e conclui que a esterilidade do pólen para este gênero é de origem genética e cromossômica.

AGARWAL (1989) encontrou baixa fertilidade dos grãos de pólen no híbrido obtido do cruzamento entre *Citrus jambhiri* x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., porém no cruzamento recíproco observou-se alta fertilidade dos grãos de pólen (82,75%), indicando a natureza citoplasmática da herança desta característica.

Fatores como baixas temperaturas podem estar relacionados à redução da fertilidade em *Citrus aurantifolia* (IWAMASA & IWASARI, 1963) e em algumas variedades de *Citrus junos*, *Citrus junks* e *Citrus kino-su* (ELISSEV & GUASALIYA, 1988).

MOREIRA & GURGEL (1941) encontraram diversas variedades que apresentavam altas proporções de pólenes inviáveis, entre elas podem ser citadas: laranjas ‘Lima’, ‘Pêra’ e ‘Cadenera’. Todas apresentavam um número baixo de sementes.

NAKAMURA (1943) encontrou muitas outras variedades e espécies, particularmente aquelas que parecem estar taxonomicamente relacionadas ao *Citrus limon* que mostraram um alto grau de esterilidade do grão de pólen. Entre elas estão: ‘Otakeiti’, limão ‘Rugoso’, laranja ‘Azeda Bouquet’ e *Citrus junos*.

A auto-incompatibilidade foi encontrada em cultivares de *Citrus grandis*, *Citrus clementina*, tangelos, alguns cultivares de *Citrus limon*, *Citrus limettoides* e *Citrus sinensis*. Numerosos cultivares de laranja doce, limões e pomelos apresentam vários graus de esterilidade (VARDI, 1992).

Os *Citrus* são geralmente tidos como um gênero muito heterozigoto (BARRETT & RHODES, 1976), porém HERRERO *et al.* (1996) mostraram que isto não

é verdade para todas as espécies do gênero. Através de estudos com isoenzimas, uma alta porcentagem de heterozigosidade foi encontrada no grupo dos limões (*Citrus limon*, *Citrus meyeri*, *Citrus karna*, *Citrus volkameriana* ), limas ácidas (*Citrus aurantifolia*, *Citrus limettioides*, *Citrus lattifolia* ) e *Citrus bergamia*, o que revela uma origem através de hibridação interespecífica. Entretanto, nem todas as espécies apresentam tais valores altos de heterozigose. O fato de se ter encontrado espécies que mostram valores muito baixos ou mínimos de heterozigose sugere que a auto-fecundação pode ter desempenhado um importante papel na sua origem e evolução. Algumas delas são ou foram utilizadas como porta-enxerto (*Citrus reshni*, *Citrus sunki*, *Citrus myrtifolia*). Os dados encontrados por MOORE & CASTLE (1988) baseados em estudos com 7 locos isoenzimáticos em uma população de 15 porta-enxertos, estão de acordo com esta hipótese. ROOSE *et al.* (1994) relataram que todos os “seedlings” zigóticos de sementes de polinização aberta de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Flying Dragon apresentavam genótipos isoenzimáticos consistentes com a origem por auto-polinização.

Em *Citrus grandis* uma espécie monoembriônica e predominantemente de polinização-cruzada (SOOST, 1964), alguns de seus clones apresentam a tendência de auto-polinização (BARRETT & RHODES, 1976) e geram progênies auto-fecundadas relativamente vigorosas.

*Citrus clementina*, uma outra espécie monoembriônica, apesar de ser auto-incompatível, mostrou a menor variabilidade genética dentro do grupo de espécies estudadas por HERRERO *et al.* (1996).

Um outro problema que dificulta os trabalhos de melhoramento é o desconhecimento do modo de herança de características desejadas. Algumas características

de significância econômica para o melhoramento dos citros que podem ser herdadas como características determinadas por um único gene são a resistência ao vírus da tristeza dos citros (CTV) (YOSHIDA, 1985; GARNSEY *et al.*; 1987), resistência aos nematóides dos citros (*Tylenchulus semipenetrans*) (HUTCHINSON, 1985), embrião nucelar (CAMERON & SOOST, 1979) e o caráter folha trilobada de *Poncirus trifoliata* (VARDI, 1992). O porte anão pode estar relacionado com herança citoplasmática assim como a esterilidade gamética (VARDI & SPIEGEL-ROY, 1981). A auto-polinização de ‘Wiking’ (tangerina monoembriônica) produziu cerca de 25% da progênie com o fator letal albino. VARDI & SPIEGEL-ROY (1981) relataram que a ocorrência de assínapse na meiose em uma progênie de auto-polinização da tangerina ‘Wiking’ é controlada por um único gene recessivo.

Exemplos de características quantitativas podem ser: tamanho do fruto, cor, níveis de acidez, tolerância a *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* (GROSSER & GMITTER Jr., 1990).

Cruzamentos controlados vêm sendo realizados pelo homem e vários híbridos de importância econômica foram obtidos, como exemplo, a maioria dos tangelos de importância comercial tais como ‘Orlando’ e ‘Minneola’ que surgiram de um cruzamento entre a tangerina ‘Dancy’ (*Citrus reticulata*) e o pomelo ‘Duncan’ (*Citrus paradisi*) realizados por WEBBER & SWINGLE em 1897 (DAVIES & ALBRIGO, 1994). Em tangerinas os exemplos são mais numerosos, por exemplo, ‘Page’ [(*Citrus paradisi* x *Citrus reticulata*) x *Citrus reticulata*], ‘Robinson’ [*Citrus reticulata* x (*Citrus paradisi* x *Citrus reticulata*)], ‘Osceola’ e ‘Lee’ [*Citrus reticulata* x (*Citrus paradisi* x *Citrus reticulata*)], ‘Sunburst’ (‘Robinson’ x ‘Osceola’), ‘Fallglo’ [*Citrus reticulata* x (*Citrus paradisi* x *Citrus*

*reticulata*) x *Citrus reticulata* ], ‘Ambersweet’ [*Citrus reticulata* x (*Citrus paradisi* x *Citrus reticulata* )] x laranja ‘Midseason’ (*Citrus sinensis* ) (HEARN, 1985).

Os citranges (*Citrus sinensis* x *P. trifoliata* ) e citrumelos (*Citrus paradisi* x *P. trifoliata* ) que têm importância como porta-enxertos foram desenvolvidos por cruzamentos realizados por Swingle por volta de 1895 (DAVIES & ALBRIGO, 1994).

De modo generalizado, as principais linhas de trabalho de melhoramento tanto para variedades de copa como de porta-enxertos, são aquelas relacionadas à resistência a doenças e pragas, na melhoria da qualidade de frutos, sazonalidade de produção e, em síntese, aumento de produtividade (MOORE & JANICK, 1983).

O melhoramento de variedades copa fica restrito ao parâmetro qualidade do fruto, que não pode sofrer muita alteração além dos limites conhecidos, o que de outro modo, comprometeria seu valor para a indústria ou mercado *in natura*. Praticamente não existem informações sobre a ligação genética de características como qualidade de frutos, provavelmente poligênicas, com outras quaisquer. Híbridos intra-específicos são altamente segregantes para essa característica. Isso explica a quase inexistência de híbridos interespecíficos como variedades de copa, principalmente de laranjas doce e limões. Para as tangerinas, híbridos interespecíficos são mais conhecidos, provavelmente associados ao número elevado de espécies dentro desse grupo (MACHADO *et al.*, 1996a).

O melhoramento de variedades porta-enxertos é direcionado no sentido de: resistência a doenças e pragas: tristeza, gomose, declínio, brocas cochonilhas, nematóides. Melhoria na relação copa/porta-enxerto: redução do tamanho da copa e maior adaptabilidade a fatores nutricionais (GROSSER & GMITTER Jr., 1990).



A seleção de uma população de plantas híbridas requer métodos de seleção eficientes para se identificar os genótipos desejados. Esta seleção pode levar anos para ser realizada, exigindo várias repetições. O desafio de combinar diferentes características controladas por locos simples e múltiplos é extremamente difícil na ausência de procedimentos de seleção rápidos e eficientes, principalmente quando o tamanho da população é limitada e as gerações são longas (GMITTER Jr *et al.*, 1996).

## 2.2. Marcadores Moleculares

Marcadores fenotípicos tais como cor de flores ou formato de folhas são de fácil identificação, mas alguns marcadores morfológicos são difíceis de serem selecionados com precisão, pois podem sofrer influência do meio ambiente ou de genes modificadores MOORE & JANICK (1983). Além disso, a utilidade dos marcadores fenotípicos é restrita devido ao pequeno número de marcadores disponíveis e, conseqüentemente, as ligações entre eles somente podem ser detectadas em uma pequena fração do genoma. Os marcadores moleculares transpõem essas dificuldades detectando diretamente a herança de diferenças alélicas na seqüência de DNA. Essas diferenças denominadas de polimorfismo de DNA, podem ser detectadas como alterações no tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) ou pela amplificação de fragmentos do DNA por reação de polimerase em cadeia (PCR) (TANKSLEY, 1983; SAKI *et al.*, 1988).

O desenvolvimento da tecnologia do RFLP representou um avanço considerável nos trabalhos de genética de plantas e outros organismos. Os marcadores RFLP podem ser de grande utilidade pois são codominantes, exibem herança Mendeliana,

são fenotipicamente neutros, raramente exibem epistasia ou pleiotropia (TANKSLEY, 1983; TANKSLEY *et al.*, 1989) e são detectáveis em plantas perenes como citros, tanto na fase adulta como na fase juvenil (DURHAM *et al.*, 1992; JARREL *et al.*, 1992). O RFLP tornou possível o desenvolvimento de mapas de ligação detalhados utilizando somente uma ou poucas famílias segregantes em muitas espécies como milho (HELENTJARIS *et al.*, 1988), alface (LANDRY *et al.*, 1987), tomate (HELENTJARIS *et al.*, 1986; TANKSLEY *et al.*, 1992), batata (TANKSLEY *et al.*, 1989) e numerosas outras. Essa metodologia é particularmente atrativa para culturas perenes como citros, onde linhagens teste, linhagens isogênicas e populações experimentais são difíceis de serem obtidas (JARREL *et al.*, 1992).

Novos marcadores moleculares foram desenvolvidos com o advento da reação de polimerase em cadeia (PCR) (SAIKI *et al.*, 1988). O PCR permite a amplificação de regiões específicas do DNA através do uso de pequenas sequências de oligonucleotídeos (“primers”) e DNA polimerase termoestável. PCR com “primers” derivados de genes com sequência conhecida foram utilizados para detectar polimorfismos em cevada (SHIN *et al.*, 1990) e arroz (WILLIAMS *et al.*, 1990), por exemplo. Entretanto, a técnica mais promissora para rápida identificação de polimorfismos é o uso de “primers” com sequência de nucleotídeos arbitrária na reação de PCR (WELSH & McCLELLAND, 1991; WILLIAMS *et al.*, 1990) produzindo marcadores denominados de RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) (WILLIAMS *et al.*, 1990).

O RAPD apresenta várias vantagens em relação ao RFLP para os estudos de ligação gênica: pequenas quantidades de DNA genômico (10-100 ng) são necessárias; a técnica não necessita a hibridação Southern; o polimorfismo é visualizado em gel de agarose

corado com brometo de etídio; o polimorfismo pode ser detectado em regiões altamente repetitivas, produzindo mapas que podem cobrir mais completamente o genoma do que o RFLP. A amplificação de um fragmento específico de DNA por um “primer” arbitrário depende da ocorrência de dois sítios de ligação idênticos em aproximadamente 3000 pb, um dos quais deve estar na orientação invertida. Esta exigência é encontrada com mais frequências em regiões contendo DNA repetitivo. Esta predominância de RAPD em regiões com DNA repetitivo foi observada em culturas como trigo (DEVOS & GALE, 1992), batata (BAIRD *et al.*, 1992) e alface (PARAN & MICHELMORE, 1993).

Um único “primer” de sequência arbitrária resulta na amplificação de várias bandas podendo gerar mais que um polimorfismo (MICHELMORE *et al.*, 1991). Uma desvantagem do RAPD é que o polimorfismo é geralmente detectado como presença e ausência de bandas, isto é, o RAPD geralmente segrega como marcador dominante. Isto reduz a informação contida em cada indivíduo e limita a dois o número de alelos por locos.

Em citros, o marcador RAPD tem sido utilizado para estudos de relações genéticas e caracterização de coleções de germoplasma (MATSUYAMA *et al.*, 1992; MOTOHASHI *et al.*, 1992; MACHADO *et al.*, 1996b), mapeamento genético (JARREL *et al.*, 1992; ROOSE *et al.*, 1992; CAI *et al.*, 1994; LURO *et al.*, 1994; GMITTER Jr. *et al.*, 1996), identificação de embriões nucelares e zigóticos (BASTIANEL, 1995; CRISTOFANI *et al.*, 1996).

### 2.3. A construção de mapas de ligação em espécies perenes

O método mais importante e comum de mapeamento de gene usa a frequência de recombinação para determinar a distância relativa entre dois genes ligados. Sturtevant em 1911 estabeleceu que a frequência de quiasmas entre dois genes ligados é de certa forma proporcional à distância física entre eles. Este princípio permanece a base para o mapeamento genético até hoje (SUZUKI *et al.*, 1981). Uma unidade de centimorgan equivale a aproximadamente 1% de recombinação quando os marcadores estão bem próximos, ou podem diferir da porcentagem de recombinação quando estão mais distantes devido à ocorrência de “crossing-over” duplo, triplo, etc. Diversas funções de mapeamento têm sido utilizadas na correção das distâncias calculadas em porcentagem de recombinação para a distância calculada em centimorgans (HALDANE, 1919; KOSAMBI, 1944; CROW, 1990).

Com base na frequência de recombinação é realizada uma análise para distribuição independente entre os locos segregantes para identificar pares de genes ligados.

Após esta etapa, os marcadores ligados são combinados em grupos de ligação. A ordem linear dos marcadores dentro de cada grupo é deduzida da distância genética relativa a cada um em estimativas dois a dois (RITTER *et al.*, 1990). Outros métodos mais sofisticados utilizando estimativas de máxima verossimilhança da frequência de recombinação entre os marcadores e algoritmos de ordenação rápida de um grande número de marcadores têm sido utilizados para a construção de mapas com maior precisão. Existem disponíveis diversos programas computacionais, com diferentes linguagens e complexidade, todos baseados no método da máxima verossimilhança tais como Linkage I (SUITER *et al.*, 1983), Mapmaker (LANDER *et al.*, 1987), Gmendel (LIU & KNAPP, 1992) e JoinMap (STAM, 1993).

Um mapa saturado do genoma é a base para estudos avançados de genética, incluindo a identificação e isolamento de genes e estudos da estrutura, expressão e função desse gene. Altas resoluções em regiões específicas (isto é, próximas a genes de interesse) são fundamentais para a identificação e o isolamento de genes. A clonagem de genes se tornou uma realidade em espécies com mapas genéticos bem definidos (LEYESER *et al.*, 1993; MARTIN *et al.*, 1993).

Desde o advento dos marcadores moleculares, a construção de mapas genéticos não havia sido descrita para nenhuma espécie de árvore frutífera perene pois poucos marcadores Mendelianos são conhecidos para estas espécies (JARREL *et al.*, 1992). O desenvolvimento e aplicação da técnica de isoenzimas para muitas espécies de plantas, aumentou o número de marcadores genéticos disponíveis (TORRES, 1982, 1983; WEEDEN, 1989). Entretanto, um pequeno número de locos isoenzimáticos foram analisados para a maioria das culturas e portanto, não viabilizaram seu uso para a construção de mapas de ligação. As relações de ligação entre locos codificando características de importância biológica e econômica permanecem desconhecidas nestas espécies (DURHAM *et al.*, 1992; JARREL *et al.*; 1992 e LIOU, 1990).

Mapas de ligação moderadamente saturados do genoma de citros foram desenvolvidos com locos isoenzimáticos e RFLP (DURHAM *et al.*, 1992; JARREL *et al.*; 1992 e LIOU, 1990). Estes mapas foram construídos utilizando famílias de retrocruzamento intergenérico de *Citrus* e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (DURHAM, 1990), um retrocruzamento interespecífico de *Citrus reticulata* e *Citrus paradisi* (LIOU, 1990) e uma família F2 intergenérica de *Citrus* e *Poncirus* (JARREL *et al.*, 1992).

A comparação destes três mapas independentes mostrou boa correspondência em locos detectados com as mesmas sondas RFLP. Estes mapas, entretanto, não descrevem ligação com locos controlando características fenotípicas importantes.

CAI *et al.* (1994) trabalhando com RAPD colocaram mais marcadores no mapa anteriormente construído por DURHAM (1990). O mapa ficou constituído de 9 grupos de ligação contendo 109 marcadores RAPD, além dos 51 marcadores RFLP e isoenzimáticos mapeados anteriormente, cobrindo 1192 cM a uma distância média de 7,5 cM entre locos, representando cerca de 70-80% do genoma.

A este mesmo mapa, GMITTER Jr. *et al.* (1996) acrescentaram marcadores RADP associados ao gene de resistência ao vírus da tristeza de *Poncirus trifoliata* L. Esta região contendo o gene da resistência ao vírus da tristeza e marcadores moleculares a ele associados foi integrada ao grupo de ligação I. Todos os marcadores se agruparam em um mesmo grupo de ligação, corroborando a hipótese de herança simples para o gene da tristeza. CAI *et al.* (1996) localizaram no grupo IV um loco que influencia a metilação de citosina em seu sítio de restrição.

LURO *et al.* (1994) construíram um mapa intergenérico utilizando uma progênie resultante do cruzamento entre *Citrus grandis* x [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus reshni*] com 95 marcadores RFLPs em 12 grupos de ligação com um total de 1503 cM.

Outros exemplos de construção de mapas de ligação em plantas perenes podem ser encontrados na literatura, como em *Eucalyptus* (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994) e *Pinus* (NELSON *et al.*, 1993). Mapas de ligação genética baseados

em marcadores RAPD foram desenvolvidos em pessegueiro (CHAPARRO *et al.*, 1994). MESSEGUER *et al.* (1994) utilizaram RFLP para construir mapas de ligação para amendoeira (*Prunus amygdalus*). RAJAPAKSE *et al.* (1995) construíram um mapa de ligação em pêsego [*Prunus persica* (L.) Batsch] consistindo de marcadores RFLP, RAPD e morfológicos, com base na genotipagem de 71 indivíduos F2. Quarenta e seis locos RFLP, 12 locos RAPD e 7 marcadores morfológicos foram mapeados. Um mapa de ligação foi construído para café (*Coffea canephora* P.) a partir de uma população de duplo-haplóides. Foram construídos 15 grupos de ligação com 47 marcadores RFLP e 100 marcadores RAPD (PAILLARD *et al.*, 1996).

Um mapa de ligação preliminar de “Blueberry” (*Vaccinium sp*) obtido a partir do cruzamento entre duas espécies foi construído com 70 marcadores RAPD em uma população de 38 plantas. O objetivo de tal mapa é a identificação de marcadores ligados a genes que controlam o choque frio requerido para a frutificação e a resistência às baixas temperaturas (ROWLAND & LEVI, 1994).

A estratégia de mapeamento para a maioria dos programas de melhoramento para espécies perenes como macieiras (HEMMAT *et al.*, 1994) e coníferas (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994) tem sido a utilização de progênie F1, devido a dificuldade em se obter gerações mais avançadas. Esta estratégia baseia-se no fato de que se uma árvore for heterozigota para um marcador RAPD e a outra árvore tiver genótipo nulo (outras formas alélicas não detectadas), a progênie F1 segrega na proporção 1:1 para a presença e ausência do segmento RAPD detectado. Após a genotipagem de uma amostra de várias dezenas de indivíduos F1 para os marcadores selecionados, dois conjuntos distintos de marcadores são gerados, resultando em um mapa de ligação para cada progenitor.

Marcadores deste tipo são denominados de polimorfismo de dose única (“single dose polymorphism”) e têm sido utilizados eficientemente para possibilitar o mapeamento genético em espécies poliplóides (AL-JANABI *et al.*, 1993; MUDGE *et al.*, 1996). Uma vez que a configuração do cruzamento não é conhecida *a priori* como em um cruzamento teste (“testcross”) clássico, e sim inferida *a posteriori* após a análise de segregação na progênie, a estratégia de mapeamento utilizando polimorfismo de dose única, foi denominada de estratégia “pseudo-testcross” (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994).

A eficiência da estratégia “pseudo-testcross” é diretamente proporcional ao nível de heterozigose da espécie e da distância genética entre os indivíduos cruzados (CARLSON *et al.*, 1991).

### **2.3.1. Mapeamento de características qualitativas**

As fases do mapeamento molecular de genes de interesse são:

- Obtenção de uma população segregante;
- Identificação de marcadores polimórficos e potencialmente associados ao gene de interesse;
- Confirmação da ligação e distância genética entre o marcador molecular e o gene de interesse.

Os métodos para identificação de marcadores potencialmente associados a genes de interesse incluem:



### Uso de linhas isogênicas (“NILs - Near Isogenic Lines”)

CHUNWONGSE *et al.* (1994) relataram a localização de marcadores moleculares ligados ao gene de resistência (Lv) ao Oídio (*Leveillula taurica*) em tomate utilizando NILs e marcadores do tipo RFLP e RAPD. Um destes fragmentos amplificados, OP 248, com um peso molecular de 0,7Kb, foi mapeado no cromossomo 12, a 1 cM do gene.

Em feijão (*Phaseolus vulgaris*) ensaios utilizando RAPD e NILs permitiram encontrar marcadores associados ao gene de resistência ao vírus do mosaico. Foram encontrados dois marcadores ligados, um em associação ( $1,9 \pm 1,4\text{cM}$ ) e um em repulsão ( $7,1 \pm 2,6 \text{cM}$ ) com o alelo bc-3 (HALEY *et al.*, 1994).

ADAM-BLONDON *et al.* (1994) utilizando linhagens isogênicas encontraram marcadores moleculares ligados ao gene de resistência (Are) ao *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causador da antracnose em feijão (*Phaseolus vulgaris*). O marcador mais próximo ao gene foi utilizado para gerar um par de “primers” que amplificam especificamente aquela região (“sequence characterized amplified region”, SCAR).

JOHNSON *et al.* (1995) encontraram em uma introdução de feijão Preto [*Phaseolus vulgaris* (PI) 181996], resistente a ferrugem do feijão causada por *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*, dois marcadores RAPD ligados ao gene de resistência.

### 2.3.2. BSA - “Bulked Segregant Analysis”

Como em espécies perenes a construção de NILs através de retrocruzamentos é inviável devido ao longo ciclo de reprodução, o BSA tem sido utilizado com bastante frequência.

O requisito básico dessa técnica é a existência de uma população resultante de um cruzamento que segregue para o gene de interesse. Seu sucesso dependerá da divergência genética entre os progenitores na região a ser mapeada (MICHELMORE *et al.*, 1991).

MICHELMORE *et al.* (1991) utilizaram BSA para identificar marcadores ligados ao gene de resistência ao míldio (*Bremia lactucae*) em alface (*Lactuca sativa*) fazendo dois “bulks” de 17 indivíduos F2 cada. Os autores demonstraram que bandas de RAPD ligadas a um caráter de interesse poderiam ser facilmente identificadas usando-se duas amostras de DNA: de indivíduos que expressam o caráter e de indivíduos que não expressam. A detecção de polimorfismo entre os dois “bulks” pode revelar a existência de marcadores que estejam ligados ao gene de interesse. A confirmação da ligação é realizada analisando-se a segregação do marcador e do gene na progênie que deu origem aos “bulks”.

Conforme o mapa se aproxima da saturação, o mapeamento de polimorfismo detectado por marcadores RAPD se torna progressivamente menos eficiente. O BSA proporciona um método de focalizar regiões de interesse ou áreas pouco povoadas com marcadores, tais como “gaps” ou regiões terminais de grupos de ligação. É, também, uma técnica para localização rápida de genes que não segregam nas populações inicialmente utilizadas para o mapeamento (MICHELMORE *et al.*, 1991).

A ligação entre um marcador polimórfico e o loco alvo é confirmado e quantificado utilizando-se a população segregante a partir da qual os “bulks” foram gerados.

Os marcadores para um loco alvo que são polimórficos e absolutamente ligados ao gene ou região usada para distinguir os indivíduos que compõe os “bulks” irão detectar diferenças entre eles. Em contraste, locos não ligados mostrarão igual intensidade de banda em cada “bulk”. Recombinações entre o marcador e os locos polimórficos farão com que a distinção entre os dois “bulks” diminua a medida que o número de recombinantes aumente. Obviamente, locos que não segregam na população, se ligados ou não, não irão distinguir os “bulks”. O BSA não revela novos tipos de variação mas permite uma rápida seleção de vários locos e portanto, a identificação de marcadores segregando na região alvo (WILLIAMS *et al.*, 1993)

A técnica assume que marcadores adjacentes ao gene alvo estarão em desequilíbrio de ligação (isto é, a recombinação não será casualizada nestes marcadores em relação ao gene). Conforme a distância de ligação aumenta, mais recombinantes estarão presentes em cada “bulk” culminando em 50% de recombinantes (nenhum desequilíbrio de ligação), e portanto, nenhuma diferença entre os “bulks” (WILLIAMS *et al.*, 1993).

Marcadores segregando em uma “janela genética” de 10% de recombinação em ambos os lados do loco alvo sempre seriam detectados. Muitos marcadores em uma “janela genética” de 30% de recombinação também poderão ser detectados, ao menos como bandas de intensidade desigual (WILLIAMS *et al.*, 1993).

Segundo MICHELMORE *et al.* (1991) a sensibilidade do BSA parece ser aproximadamente a mesma com RFLP e RAPD. Todos os marcadores próximos de 15 cM do loco alvo podem ser detectados. O limite de detecção parece ser 25 cM.

Qualquer população segregante originada de um cruzamento pode ser usada. “Bulks” construídos a partir de populações de retrocruzamento proporcionam grande foco

ao redor da região de interesse e as populações F2 são as que proporcionam máxima amplitude genética na região selecionada para o polimorfismo. Se um número suficientemente grande de indivíduos é agrupado por “bulk”, a “janela genética” será simétrica ao redor da região de interesse, em contraste às regiões de locos selecionados durante a geração de NILs, que podem ser extremamente assimétricas (WILLIAMS *et al.*, 1993).

A maioria dos marcadores RAPD se comportam como marcadores dominantes, de modo que em uma população F1 irão segregar na proporção 1:1 (ausência e presença). Se a mutação a ser mapeada é recessiva, no loco alvo o “bulk” mutante só terá DNA do parental mutante (homozigoto), e o tipo selvagem será heterozigoto. Então, os marcadores ligados em *cis* ou em associação a este loco detectarão polimorfismo entre os dois “bulks”, enquanto que os marcadores não ligados não irão revelar o polimorfismo porque ambos os alelos marcadores estarão presentes em ambos os “bulks”. No caso do marcador estar ligado em *trans* ou em repulsão em um “bulk” de indivíduos F1, a banda específica vai aparecer no pai resistente e no “bulk” suscetível.

Ocasionalmente, polimorfismo pode ser falsamente detectado em um loco RAPD não ligado ao loco alvo. Isto pode acontecer se, por acaso, somente o alelo mutante ocorrer no “bulk” mutante em qualquer loco não ligado. MICHELMORE *et al.* (1991) relataram que a propabilidade de detectar falso polimorfismo diminui conforme aumenta o número de indivíduos no “bulk”.

Para um “bulk” com 5 indivíduos, por exemplo, o tamanho da “janela genética” é mais amplo, pode-se obter “janelas genéticas” de 4 a 26 unidades de recombinação. Conforme o número de indivíduos aumenta de 5, 10 e 40, o tamanho mais

provável diminui de 15, 8 a 5 unidades de recombinação, respectivamente. A probabilidade de se obter uma “janela genética” de 0 a 20 unidades de recombinação é cerca de 0,80 para um “bulk” de 5 indivíduos. Há um tamanho máximo de “bulk” acima do qual nenhuma redução no tamanho da janela é obtido (WILLIAMS *et al.*, 1993).

Vários trabalhos foram desenvolvidos em diferentes espécies visando a localização de marcadores ligados a genes qualitativos. Em maçã a sarna causada por *Venturia inaequalis*, pode ser controlada pelo gene de resistência denominado Vf em *Malus floribunda* clone 821. A durabilidade do gene Vf de *M. floribunda* tem feito deste gene um importante alvo para o mapeamento. YANG & KRUGER (1994) identificaram marcadores moleculares associados ao gene Vf utilizando RAPD e BSA.

YANG & KORBAN (1996) descreveram o desenvolvimento de “Marker Sequence Specific PCR” a partir dos marcadores selecionados por YANG & KRUGER (1994), demonstraram seu uso na seleção de cultivares de maçã resistentes a Sarna e verificaram a presença destes marcadores RAPD em genótipos resistentes.

Em pistache (*Pistacia vera*), uma espécie dióica, HORMAZA *et al.* (1994) identificaram um marcador RAPD ligado a determinação de sexo utilizando BSA. A determinação precoce do sexo das plantas é importante pois as plantas de pistache levam de 5 a 8 anos para atingir a maturidade reprodutiva.

Outros exemplos da utilização de marcadores moleculares e BSA visando encontrar marcadores associados a genes de importância agronômica podem ser citados em outras culturas, como por exemplo, em *Lactuca serriola* (MAISONNEUVE *et al.*, 1994), trigo (*Triticum aestivum* L.) (HARTL *et al.*, 1995), em sorgo (OH *et al.*, 1994), em cevada (PENNER *et al.*, 1993).

A herança da resistência a ferrugem em cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) foi estudada em uma progênie de autofecundação através de infecção natural no campo e inoculação artificial em casa de vegetação. Foi identificada segregação discreta de 3:1, que pode ser atribuída a um gene maior dominante para resistência. Este gene estava ligado, a 10 cM, com um marcador molecular do tipo RFLP (DAUGROIS *et al.*, 1996).

POULSEN *et al.* (1995) utilizaram BSA e RAPD para localizar 1 marcador (OPU02\_2700) localizado aproximadamente a 12 cM do gene de resistência a ferrugem da folha (*Puccinia hordei*) em cevada.

## **2.4. Vírus da tristeza dos citros**

### **2.4.1. Tristeza dos Citros**

A tristeza dos citros (citrus tristeza virus, CTV) é uma doença causada por um Closterovírus, com partícula filamentosa de 2.000 nm de comprimento e 12 nm de largura. exclusivo do floema. Existem vários isolados do vírus que podem causar diferentes sintomas nas plantas (LEE *et al.*, 1994).

Um tipo de sintoma comumente encontrado é o declínio de variedades copa enxertadas sobre a laranja ‘Azeda’ (*Citrus aurantium* L.). Dependendo do isolado, as plantas infectadas sofrem um declínio rápido e morrem em poucas semanas. O problema do declínio rápido em árvores enxertadas sobre laranja ‘Azeda’ tem sido tão severo em alguns

países que o uso da laranja ‘Azeda’ como porta-enxerto foi abandonado em pomares comerciais como aconteceu no Brasil a partir da década de 30 (McCLEAN, 1974).

Outra síndrome associada à infecção pelo CTV é o “stem pitting” ou caneluras. Observada em limas ácidas (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle), pomelos (*Citrus paradisi* Macf.) e algumas laranjas doces (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (SCHNEIDER, 1959; WALLACE, 1978). Os sintomas produzidos em limas ácidas, que são as indicadoras mais utilizadas para o diagnóstico do CTV, variam de acordo com os isolados (WALLACE, 1968). Assim, nas limas ácidas podem ser observados sintomas de clareamento das nervuras, acanoamento das folhas e caneluras.

O “seedling yellow” é outra reação produzida por alguns isolados do CTV em plântulas de laranja ‘Azeda’, pomelo e limão (*Citrus limon* Burm. f.) é uma reação observada geralmente em casa de vegetação; porém, existem indicações que limões e pomelos enxertados em porta-enxertos infectados com isolados “seedling yellows” do vírus da tristeza podem apresentar os sintomas no campo (MÜLLER & COSTA, 1993).

O vírus da tristeza pode ser facilmente transmitido por enxertia, se uma união vascular for bem estabelecida entre os tecidos doadores e receptores. Borbulhas, garfos, pedaços de folhas e de raízes têm sido utilizados como fontes de inóculo com sucesso. O vírus pode ainda ser transmitido por *Cuscuta sp.* (MÜLLER & COSTA, 1991).

A expressão de sintomas nos citros varia via de regra com a espécie hospedeira e a severidade do isolado da tristeza. Laranjas doces e limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck) de maneira geral não são afetados pelo vírus, mas podem sofrer danos quando infectados com isolados fortes. O vírus afeta tipos de citros com tecidos intolerantes como as limas ácidas, pomelos, algumas laranjas doces mais sensíveis como a laranja ‘Pera’,

outras de menor importância econômica e também alguns gêneros de *Rutaceae* (MÜLLER & COSTA, 1991).

*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. é a única fonte conhecida de resistência, que parece ser controlada por um único gene dominante (YOSHIDA, 1985, 1993). Este gene impede a proliferação do vírus na planta por um mecanismo ainda não elucidado. Variedades de porta-enxertos resistentes ao CTV foram desenvolvidas a partir de híbridos entre *Citrus* e *Poncirus* (HEARN *et al.*, 1993)

Segundo GARNSEY *et al.* (1987) resultados obtidos em ELISA confirmaram que a segregação para a imunidade ao CTV ocorre na primeira geração de híbridos de trifoliata. Baseando-se nos resultados em ELISA, diferenças na reação dos citranges [híbridos de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e *Citrus sinensis*] ao CTV são qualitativas e não quantitativas. Isto é, citranges sensíveis ao CTV, tais como o 'Rusk', apresentam uma concentração de vírus comparável com as laranjas doces, e não um valor intermediário.

A proteção cruzada é considerada uma outra forma de resistência, ou resistência induzida e é obtida pelo uso de um isolado fraco do vírus para proteger as plantas contra danos econômicos causados pela infecção com isolados severos (GONSALVES & GARNSEY, 1989). No Brasil, a proteção cruzada tem sido utilizada para controlar isolados fortes de CTV que causam caneluras em laranjas doce, especialmente no cultivar 'Pêra'. A mesma estratégia tem sido utilizada na África do Sul para reduzir danos em pomelos (BAR-JOSEPH *et al.*, 1989).

Porém, alguns fatores devem ser considerados, em variedades tolerantes, ou em um esquema de proteção cruzada. O vírus se multiplica no hospedeiro, e pode servir de



fonte de inóculo para outros cultivares nos quais a reação pode ser mais severa. Além disso, a multiplicação do vírus pode levar a uma variação no mesmo, que pode resultar na origem de isolados mais virulentos.

O melhoramento genético para resistência a tristeza inclui basicamente os trabalhos de obtenção de variedades por introgressão dessa característica a partir de *Poncirus trifoliata* (HEARN *et al.*, 1993), mapeamento dessa característica monogênica visando o isolamento do gene para trabalhos futuros de transformação genética de variedades copa (GMITTER Jr. *et al.*, 1996) e transformação de plantas com o gene da capa proteica do vírus (ESPINOSA, 1995).

#### **2.4.2. Detecção da presença do vírus da tristeza dos citros**

O procedimento de rotina para identificar o vírus da tristeza é através da inoculação por enxertia de “seedlings” de limão ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia* L.) (planta indicadora) com gemas da planta a testar. Pode ser também utilizado o teste de dupla enxertia, enxertando-se a planta indicadora de limão ‘Galego’ e a borbulha da planta a ser testada em um porta-enxerto vigoroso. Os sintomas característicos para as limas ácidas, como palidez das nervuras, redução do tamanho, acanoamento das folhas e aparecimento de caneluras no tronco podem ser observados (MÜLLER & COSTA, 1993).

Testes baseados em serologia específica têm sido utilizados para a detecção rápida do vírus da tristeza. Os testes que vêm sendo mais utilizados para a detecção do CTV são o ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”) e “Western Blot” (GARNSEY *et al.*, 1987; ROCHA-PEÑA & LEE, 1991; GARNSEY & CAMBRA, 1991).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

As principais características das espécies escolhidas incluem:

**Limão ‘Cravo’** (*Citrus limonia* Osbeck) - conhecido também pelos nomes de Rosa, Vermelho, Bravo, Francês, Vinagre e “Rangpur” é uma planta bastante produtiva, sementes pequenas (dez a quinze por fruto) e poliembrionicas. É praticamente o único porta-enxerto sobre o qual está construída a citricultura brasileira. É intolerante aos viróides da exocorte e xiloporose e muito suscetível ao fungo da verrugose, *Elsinoe fawcetti* Jenk. Tem suscetibilidade média à gomose de *Phytophthora* spp. Tolerante a tristeza e intolerante ao declínio dos citros. (POMPEU Jr., 1991).

**Laranja ‘Caipira’** [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] - a utilização da laranja ‘Caipira’ começou no início deste século, quando a citricultura brasileira alcançou expressão comercial e com o aparecimento das vantagens da enxertia. A baixa resistência da

‘Caipira’ à seca e à gomose de *Phytophthora* conduziram sua substituição pela laranja ‘Azeda’, que estava se tornando o principal porta-enxerto no mundo (POMPEU Jr., 1991).

**Laranja ‘Azeda’** (*Citrus aurantium* L.) - por quase duas décadas, 1920 a 1940, a laranja ‘Azeda’ foi o principal porta-enxerto da citricultura brasileira. Com a introdução do vírus da tristeza em 1937 no vale do Paraíba em São Paulo, e a sua rápida disseminação pelo pulgão Preto, pereceram as plantas enxertadas em laranja ‘Azeda’ e em lima da Pérsia, que são intolerantes ao vírus. A laranja ‘Azeda’ apresenta grande resistência à gomose e à seca, confere à copa boa produção, qualidade boa dos frutos e é tolerante ao declínio (POMPEU Jr., 1991).

**Tangerina ‘Sunki’** (*Citrus sunki* Hort. ex. Tan.) - dentre seus atributos favoráveis como porta-enxerto pode-se destacar a precocidade, maior volume da copa e boa produtividade; frutos de qualidade média, copa vigorosa (SALIBE, 1978). Alta tolerância ao declínio, altamente tolerante a tristeza dos citros, alta suscetibilidade a gomose, bastante compatível por enxertia com outras espécies e variedades de citros (POMPEU Jr., 1991). Entretanto, algumas características são consideradas como desvantagens, destacando-se dentre elas o seu pequeno número de sementes viáveis (3 por fruto) (TEÓFILO SOBRINHO, 1991). Apresentam sementes pequenas, dez a quinze por fruto e são poliembriônicas.

***Poncirus trifoliata* (L.) Raf.** - única espécie do gênero, planta de porte médio a pequeno e bastante produtiva. As sementes são grandes, trinta e cinco a quarenta por fruto e poliembriônicas. É intolerante ao viróide da exocorte, tolerante a xiloporose, tristeza e resistente à gomose de *Phytophthora* sp (FEICHTENBERGER, 1989), suscetível ao declínio dos citros, resistente aos nematóides dos citros e das lesões (*Tylenchulus semipenetrans* e *Pratylenchulus coffeae*, respectivamente (SHANNON *et al.*, 1960). Incompatível com algumas copas de laranjas doces, como a laranja ‘Pera’ (TEÓFILO

SOBRINHO *et al.*, 1989), confere melhor qualidade de suco à copa (PIO, 1993). Confere melhor porte à planta (TEÓFILO SOBRINHO *et al.*, 1984).

### 3.2. Geração de populações segregantes

Para obtenção das progênes segregantes a serem utilizadas na construção dos mapas de ligação foram realizados cruzamentos controlados em vários acessos do Banco Ativo de Germoplasma do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, na florada de agosto a outubro de 1993. A Tabela 1 apresenta as plantas utilizadas para a obtenção das progênes.

Tabela 1. Plantas utilizadas em cruzamentos controlados para obtenção das progênes F1.

Espécie	Nome Comum	Introdução
Porta-enxerto		
<i>Citrus aurantium</i> L.	laranja 'Azeda'	CV-244
<i>Citrus limonia</i> Osbeck	limão 'Cravo'	Limeira
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	laranja 'Caipira DAC'	CV-137
<i>Citrus sunki</i> Hort. ex. Tan.	tangerina 'Sunki'	Matriz
<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.		
cv. Rubidoux	laranja trifoliata	CN 835

CN = Clone Novo; CV = Clone Velho

Foram realizados cruzamentos entre laranja 'Caipira' (*Citrus sinensis* Osbeck) e limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck), laranja 'Caipira' (*Citrus sinensis* Osbeck) e laranja 'Azeda' (*Citrus aurantium* L.) e tangerina 'Sunki' (*Citrus sunki* Hort. ex. Tan.) e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf..

### 3.3. Polinização

Os procedimentos para a polinização foram realizados de acordo com MEDINA FILHO *et al.* (1992).

Dois a quatro dias antes da antese, os botões florais do clone utilizado como progenitor feminino foram emasculados. Nessa fase os estigmas ainda não estavam receptivos e as anteras estavam ainda imaturas, indeiscentes. Os ramos após emasculação das flores foram protegidos com sacos de papel especial. Os botões florais dos progenitores masculinos foram colhidos antes da antese e mantidos em placas de Petri até a abertura da flor e liberação dos grãos de pólen.

Dois a cinco dias após a emasculação, os sacos foram abertos e os estigmas, então receptivos, foram polinizados. Em seguida os sacos foram novamente fechados e os ramos etiquetados. Procedeu-se desta maneira para obter-se o maior número possível de cruzamentos e evitar autopolinizações ou contaminações por pólen estranho.

Após uma ou duas semanas da polinização, os sacos de papel foram removidos, os ramos marcados para serem visualizados à distância e identificados com fitas coloridas. Periodicamente cada ramo foi inspecionado, eliminando-se novos botões florais que poderiam surgir em floradas subsequentes e competir com os frutos do cruzamento.

A viabilidade dos grãos de pólen foi determinada observando-se a germinação em meio de cultura apropriado constituído de: 1% de ágar, 15% de sacarose, 100 mg/l de  $H_3BO_3$ , 300 mg/l de  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ , 200 mg/l de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e 100 mg/l de  $KNO_3$ . Os grãos foram espalhados na superfície de uma lâmina de microscopia contendo 2 ml do meio de cultura e foram colocados em caixas de plástico com papel de filtro umedecido. A incubação ocorreu a temperatura de 28°C por 24 horas.

### 3.4. Germinação das sementes

Os frutos foram coletados entre os meses de maio e junho de 1994. Após o amadurecimento dos frutos, as sementes foram extraídas, descascadas, desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio comercial (2% do princípio ativo) a 25% e colocadas em frascos contendo meio de cultura MT (MURASHIGE & TUCKER, 1969) com metade da concentração de macro e micronutrientes e sem adição de sacarose, visando favorecer a germinação de embriões zigóticos. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura de 24°C.

As plantas obtidas foram transplantadas para substrato (Rendmax) em tubetes e mantidas em casa de vegetação.

### 3.5. Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de folhas frescas das plântulas F1 com aproximadamente 3 meses de idade. Para a extração do DNA foi utilizada a metodologia descrita por MURRAY & THOMPSON (1980), com algumas mudanças introduzidas por MACHADO *et al.* (1996b).

As folhas foram trituradas em nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino que foi homogeneizado em 35 volumes do tampão de extração (1% CTAB; 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,7 M NaCl; 2% de sarkosyl; 140 mM 2-mercaptoetanol) e aquecido por 30 min a 60 °C. Após resfriar até a temperatura ambiente, 1 vol de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1) foi adicionado e as misturas foram incubadas por 5 min com

agitação leve. As fases foram separadas por centrifugação por 5 min a 12.000 rpm em uma microcentrífuga Sorval MC12V. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, 0,1 vol de CTAB 10% (10% CTAB; 0,7M NaCl) foi adicionado, e uma nova extração com 1 vol de clorofórmio : álcool isoamílico foi realizada. O sobrenadante foi transferido para um outro tubo, e 1 vol de tampão de precipitação (1% CTAB; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA) foi adicionado.

Após misturar gentilmente, os tubos foram centrifugados novamente por 5 min a 12.000 rpm, e o sobrenadante descartado. O “pellet” foi dissolvido em 400 µl de TE alto sal (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 1M NaCl) a 65 °C por 1 hora. Quando os tubos atingiram a temperatura ambiente, o DNA foi precipitado com 2 vol de etanol 100% gelado. Após centrifugação por 5 min a 12.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e os “pellets” foram lavados com etanol 70% e 100%. O DNA foi dissolvido em 25 µl de 0,1 x TE contendo 10µg/µl de RNase.

### **3.6. Quantificação e qualificação do DNA**

Para a quantificação do DNA genômico seguiu-se o protocolo de SAMBROOK *et al.*(1989). Aliquotas de 1µl de cada amostra de DNA, misturadas com 3µl de água e 1µl de tampão (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose) foram colocadas em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio (0,5 ng/ml), juntamente com uma série de diluições de λ-DNA com concentrações conhecidas (50, 100, 150, 200 e 250 ng/µl). Após 30 min de corrida eletroforética em tampão TAE 1%, o gel foi observado sobre luz ultra violeta e as intensidades de fluorescência das amostras de DNA foram

comparadas com os padrões. Depois disso, uma alíquota de cada amostra de DNA foi diluída a uma concentração de trabalho de 5 ng/ $\mu$ l e armazenada a -20°C.

A qualificação do DNA foi realizada observando-se a ausência de rastro (degradação do DNA e presença de impurezas) na corrida eletroforética no gel de agarose.

### **3.7. Reações de amplificação**

As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 13  $\mu$ l (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994) e constituídas de:

- H<sub>2</sub>O (4,4  $\mu$ l)
- Tampão 10X - 10 mM Tris-HCl (pH 8,3); 50 mM KCl; 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,001% de gelatina (1,3  $\mu$ l)
- dNTPs - 0,2 mM de cada dATP, dTTP, dCTP e dGTP - Pharmacia (1  $\mu$ l)
- “primer” - 0,2 mM de “primer” de 10 nucleotídeos (15 ng) - Operon (3  $\mu$ l)
- Taq polimerase - 1,5 unidades - CENBIOT/RS. (0,3  $\mu$ l)
- Solução de DNA (3  $\mu$ l)

Depois de preparadas, as reações foram cobertas com 25  $\mu$ l de óleo mineral (SIGMA) e a amplificação foi realizada em termocicladores MJ Research Thermocycler (com blocos para tubos de 0,5 ml ou placas de 96 poços) programados para 36 ciclos de 1



min a 92°C, 1 min a 36°C e 2 min a 72°C. Ao final do último ciclo, acrescentou-se uma extensão de 10 min a 72°C.

### **3.8. Visualização dos fragmentos amplificados**

Os produtos da reação foram visualizados em gel de agarose (1,4%) preparado em tampão TAE (0,04 M Tris-acetato, 1 mM EDTA) e corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml). A 13 µl da solução da reação foram adicionados 2,2 µl do tampão de carregamento da amostra (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose) e 4 µl foram aplicados em gel de agarose 1,4% em TAE. Como marcador de peso molecular utilizou-se o padrão de 1Kb Ladder (GIBCO-BRL). A corrida eletroforética foi realizada em tampão TAE 1X por aproximadamente 3h e os géis fotografados sobre luz UV.

### **3.9. Análise dos Dados Moleculares**

#### **3.9.1. Análise para identificação de plântulas zigóticas e nucelares.**

A análise para a identificação de plântulas zigóticas e nucelares dos cruzamentos entre laranja ‘Caipira’ (*Citrus sinensis* Osbeck) e limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck), laranja ‘Caipira’ (*Citrus sinensis* Osbeck) e laranja ‘Azeda’ (*Citrus aurantium* L.) foi realizada através da comparação dos padrões de bandas obtidas nos

indivíduos da progênie e os padrões de bandas dos parentais com a utilização de 4 “primers” decâmeros da Operon Technologies Inc.(OPE16, OPH04, OPH15 e OPM05).

O grau de similaridade entre as plantas zigóticas e os parentais do cruzamento entre *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux foi estimado através de bandas RAPD (monomórficas e polimórficas), avaliadas como caracteres binários, por presença (1) ou ausência (0). Os dados foram organizados em uma matriz binária sendo que os indivíduos da progênie e os parentais constituíram as colunas da matriz e os dados referentes aos marcadores constituíram as linhas da matriz. A matriz de similaridade gerada foi obtida através do coeficiente DICE (DICE, 1945) utilizando-se o programa computacional NTSYS 1,7 - “Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System” (ROHLF, 1992).

O fenograma resultante foi obtido utilizando-se o método da média aritmética não ponderada para agrupamento aos pares (UPGMA - “Unweigthed pair group arithmetic average”) de acordo com SNEATH & SOKAL (1973).

### **3.9.2. Análise dos dados para construção dos mapas de ligação**

Foi realizada uma triagem de 208 “primers” com sequência arbitrária de 10 nucleotídeos, kits (C, J, R, U, M, N, Q, AV, K, AT, E e H) da Operon Technologies Inc., utilizando os dois progenitores [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux e *Citrus sunki* Hort. ex. Tan.] e uma amostra de seis indivíduos da progênie.

Os marcadores polimórficos segregantes do cruzamento entre *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux e *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. foram avaliados para presença (1) ou ausência de bandas (2) em uma amostra de 80 indivíduos da progênie.

A hipótese nula de segregação Mendeliana 1:1 para a herança Mendeliana na configuração “pseudo-testcross” foi testada com análise de  $\chi^2$  ( $\alpha=0,05$  e  $\alpha=0,01$ , GL=1), para cada marcador.

As relações de ligação entre os marcadores foram determinadas utilizando o programa MAPMAKER Macintosh V2.0 (LANDER *et al.*, 1987). Para permitir a detecção de ligação de marcadores RAPD em fase de repulsão, o conjunto de dados foi duplicado e recodificado (AL-JANABI *et al.*, 1993; GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994). Os grupos de ligação foram determinados com o comando “Two point/Group” com um LOD > 4,0 e uma frequência máxima de recombinação ( $\theta$ ) = 0,30. Os marcadores foram ordenados nos grupos de ligação utilizando os comandos “Multipoint/First Order” e/ou “Two point/Three Point”. A ordem foi confirmada utilizando o comando “Multipoint/ Ripple”. Alguns marcadores que se agruparam com um critério de LOD > 3,0 e  $\theta$  = 0,40 foram inseridos aos grupos de ligação através do comando “Multipoint/Try”. A função Kosambi (KOSAMBI, 1944) foi utilizada para converter as frações de recombinação em valores de distâncias de mapa ou centimorgans (cM).

Para se referir a um produto polimórfico amplificado a convenção sugerida por PARAN *et al.* (1991) foi utilizada. Por exemplo, o marcador AV12\_470 era relacionado ao fragmento de 470 pares de bases amplificado pelo “primer” 12 do Kit AV da Operon Technologies Inc.

O peso molecular foi determinado com o uso do software GEL (SCHAFFER & SEDEROFF, 1989) e os valores médios obtidos da análise de quatro géis por “primer” foram “arredondados”. Por exemplo, para o marcador AV12\_470 o valor médio para o peso molecular encontrado foi de 467,83 e o peso molecular foi “arredondado” para 470. Para os

marcadores Q14\_570 e Q14\_600 os valores médios encontrados foram de 566,44 e 597,45, respectivamente.

### **3.10. Avaliação da resistência ao CTV.**

Borbulhas de uma amostra de 80 indivíduos do cruzamento entre *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux e *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e os parentais foram enxertadas sobre limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck) obtendo-se três repetições por planta. Após o pegamento da enxertia e início do desenvolvimento das brotações (cerca de um mês), duas borbulhas de laranja doce ‘Barão B’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] contaminadas com um isolado severo (isolado ‘Barão B’) do vírus da tristeza foram enxertadas, aproximadamente, 2 cm abaixo da região de enxertia das borbulhas das plantas híbridas (MÜLLER & COSTA, 1993).

As folhas das plantas em avaliação foram coletadas aos 30 e 90 dias após a enxertia da borbulha contaminada (fonte de inóculo). Todo o experimento foi conduzido em casa de vegetação à prova de pulgão (*Toxoptera citricidus*), vetor do vírus da tristeza. A avaliação da presença do vírus nos tecidos foi realizada através de serologia CTV específica utilizando-se “Western Blot” e “DIBA” (“Dot Immunobinding Assay”).

#### **3.10.1. Procedimento para “Western Blot”**

O procedimento foi realizado de acordo com as especificações de LKB (LKB-Produkter, Bromma, Sweden)

### **3.10.1.1. Coleta do material vegetal**

O material vegetal (folhas) foi coletado e colocado em isopor contendo gelo, lavado e imediatamente utilizado para a extração de proteínas.

### **3.10.1.2. Procedimento para a extração de proteínas**

Foram triturados 100 mg de nervuras em um almofariz com auxílio de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, adicionou-se 1 ml de tampão de extração (63 mM Tris-HCl pH 7,0; 5% de Mercaptoetanol; 2% SDS; 10% de glicerol), homogeneizou-se e transferiu-se para tubo de Eppendorf. Os tubos foram colocados em banho maria fervente durante 3 min e, em seguida, no gelo. Centrifugou-se durante 10 min a 1200 rpm. Transferiu-se o sobrenadante para novo tubo e manteve-se a -20°C

### **3.10.1.3. Preparo do gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS - PAGE)**

#### **Soluções estoque usadas no preparo dos géis**

- Acrilamida : bisacrilamida em 30:0,8 - 30 g de acrilamida e 0,8 g de bisacrilamida em 100 ml de água destilada. A solução foi filtrada e mantida em frasco escuro a 4°C.
- Tampão de resolução do gel: 3M Tris-HCl pH 8,8

- Tampão de empacotamento do gel: 0,5M Tris-HCl pH 6,8.
- 10% SDS
- 3% persulfato de amônia
- TEMED
- Tampão de corrida: 25 mM Trizma base; 0,192 M glicina, pH 8,3; 0,1% SDS

### Preparo dos géis (gradiente 5 a 20%)

Foram utilizados para um volume de 25 ml os seguintes volumes das soluções estoque:

Soluções	gel 5% (ml)	gel 20% (ml)
acrilamida:bisacrilamida	2,04	8,04
tampão de resolução	1,50	1,50
10% SDS	0,109	0,109
glicerol	–	1,20
3% persulfato de amônia	0,136	0,136
TEMED	4,02 $\mu$ l	4,02 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	qsq 12	qsq 12

Os géis foram preparados com auxílio de um formador de gradiente. Após a polimerização, foram colocados o pente e o gel de empacotamento com a seguinte composição:

Soluções	Volume (ml)
H <sub>2</sub> O	5,85
acrilamida:bisacrilamida	1,25
tampão de empacotamento	2,50
10% SDS	0,10
3% persulfato de amônia	0,25
TEMED	7,5 µl

#### **3.10.1.4. Preparo das amostras para eletroforese**

Aliquotas de 60 µl das amostras de proteínas, preparadas como descrito acima, foram colocadas em tubos Eppendorfs onde foram adicionados 2 µl de tampão de carregamento ( para 8 ml colocou-se 1ml de 0,5M Tris-HCl pH 6,8; 0,8 ml de glicerol; 1,6 ml de 10% SDS; 0,4 ml de β-mercaptoethanol; 0,1% azul de bromofenol e completou-se com água destilada ). Os tubos foram colocados em banho maria fervente por 10 min. Após resfriamento, as amostras foram aplicadas nos géis.

#### **3.10.1.5. Corrida eletroforética**

A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts e à temperatura ambiente, até que a frente de azul de bromofenol atingisse o fim do gel.

### 3.10.1.6. “Western Blot”

Após a eletroforese, os géis foram incubados duas vezes durante 30 min à temperatura ambiente em tampão de transferência (48 mM Trizma base; 39 mM de glicina; 0,04% SDS; 20% metanol) e, em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond C extra, Amersham) a 0,8 mA/cm<sup>2</sup> durante 1 hora, em Multphor II Novablot (Pharmacia LKB).

Após a transferência as membranas foram incubadas durante pelo menos 3 horas em TBS (0,1 M Trizma base; 0,9% de NaCl, pH 7,5) contendo 5% de leite em pó desnatado Molico. Posteriormente as membranas foram incubadas durante duas horas em TBS contendo 0,1% de Tween 20; 5% de leite em pó desnatado Molico e o anticorpo [anticorpo policlonal BR-1006 (BAPTISTA *et al.*, 1996) na diluição 1:10.000]. As membranas foram lavadas três vezes por 10 min com TBS contendo 0,1% Tween 20. Posteriormente, as membranas foram incubadas durante 1 h em TBS contendo 0,1% Tween 20; 5% de leite em pó desnatado Molico e o conjugado anti-Rabbit IgG - fosfatase alcalina (no caso de anticorpos policlonais) na diluição 1:8.000. As membranas foram lavadas novamente, como descrito acima. A revelação das membranas foi realizada com uma solução contendo 25 ml de tampão de reação (0,1 M Trizma base; 0,1 M NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>); 2 mg de BCIP (5-bromo 4 cloro 3-indolyl phosphate); 4 mg de NBT (nitro blue tetrazolium).

Para cada época de avaliação realizou-se duas vezes a análise de “Western Blot” para cada amostra. Na avaliação realizada após 30 dias da enxertia da borbulha contaminada, as amostras de cada uma das repetições das plantas a serem testadas foram colocadas no gel separadamente. Na segunda época de avaliação (90 dias) as amostras das três repetições foram agrupadas compondo uma só amostra por planta.



### **3.11. DIBA - “Dot immunobinding assay”**

A coleta do material vegetal e extração da proteína total foram realizadas como descrito nos itens 3. 10.1.1. e 3. 10.1.2.

Após a extração da proteína total, alíquotas de 10 µl das amostra foram aplicadas em membranas de nitrocelulose. Esperou-se secar por cerca de 30 min e procedeu-se da mesma forma como após a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose na análise de “Western Blot” (item 3.10.1.6).

### **3.12. BSA - “Bulked Segregant Anlysis”**

Os “primers” (Kits Operon) selecionados para a construção dos mapas de ligação foram utilizados para o BSA, em que dois grupos de DNA foram obtidos com base nos testes de seleção para a multiplicação do vírus da tristeza dos citros (CTV). O DNA dos indivíduos selecionados para compor as amostras agrupadas foi extraído separadamente e diluído para a concentração de trabalho (5ng/µl). Alíquotas de 10 µl de cada DNA (7 ou 14 indivíduos) foram misturadas para cada “bulk”.

Os DNA dos indivíduos tolerantes (multiplicam o vírus) foram misturados e comparados à mistura de DNA dos indivíduos imunes (não multiplicam o vírus) juntamente com as amostras de DNA dos progenitores.

**3.13. Análise de presença ou ausência de marcadores RAPD ligados ao gene de resistência ao CTV em diferentes cultivares e híbridos de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.**

Diferentes cultivares e híbridos de *Poncirus trifoliata* do banco de germoplasma do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC foram avaliados para a presença e ausência do vírus da tristeza dos citros em seus tecidos utilizando “Western Blot”, sem a infecção artificial. Reações de PCR foram realizadas utilizando o DNA genômico destas plantas e “primers” que detectaram marcadores ligados ao gene de resistência ao CTV. As plantas utilizadas foram:

<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	{ ‘Davis A’ VEL 848 ‘Kryder 15-3’ VEL 1703 ‘Flying Dragon’ CN 718
Citranges	{ ‘Carrizo’ CV 387 ‘Rusk’ CV 398
Citrandarins	{ ‘Cleopatra’ x ‘Rubidoux’ CN 713 ‘Sunki’ x ‘English Large’ VEL 1519

**3.14. Micropropagação e enraizamento de estacas das plantas obtidas no cruzamento entre *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv Rubidoux.**

A micropropagação e o enraizamento de estacas foram realizados com a finalidade de obter repetições das plantas híbridas do cruzamento de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf cv. Rubidoux visando, principalmente, aos testes de

resistência às doenças do sistema radicular como gomose de *Phytophthora* e declínio dos citros.

#### **3.14.1. Micropropagação**

Quatro estacas com números variáveis de gemas axilares (3 a 7) foram coletadas de 100 híbridos e dos parentais. Após desinfestação superficial ( 5 min em álcool 70%, 5 min em Movadol 5% e 5 min em solução a 25% de hipoclorito de sódio comercial - 2% do princípio ativo). Posteriormente, as estacas foram lavadas três vezes em água destilada autoclavada e inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura MT (MURASHIGE & TUCKER, 1969), suplementado com 0,1 mg/l de BAP (Benzilamiloipurina). As brotações obtidas, com mais ou menos 5 cm de comprimento foram transferidas para meio MT contendo 1 mg/l de IBA (ácido indol-butírico) para induzir o enraizamento. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 repetições para cada genótipo.

A avaliação foi realizada obtendo-se o número médio de plantas em relação ao número de estacas utilizadas por genótipo. Os dados foram transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ .

#### **3.14.2. Enraizamento de Estacas *in vivo***

Estacas foram coletadas de 100 indivíduos da progênie e dos parentais do cruzamento entre *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Rubidoux .

Quatro estacas com cinco gemas axilares de cada genótipo foram imersas por 10 min em uma solução contendo 40% de etanol, 1 g/l de IBA (ácido indol-butírico) e 1 g/l de NAA (ácido naftaleno-acético) e colocadas em substrato em casa de vegetação com irrigação por nebulização.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado.

A avaliação foi realizada obtendo-se a porcentagem de estacas enraizadas por genótipo.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Obtenção da população de mapeamento e identificação de plântulas nucleares e zigóticas.

O primeiro passo para a construção dos mapas genéticos foi a obtenção de uma população segregante com a escolha de cruzamentos de forma a maximizar a probabilidade de detectar polimorfismo ao nível de DNA e também segregação para as características desejadas nas plantas da progênie. A Tabela 2 apresenta os resultados dos cruzamentos controlados.

Tabela 2. Resultados de cruzamentos controlados .

Cruzamentos	Nº de flores polinizadas	Nº de frutos obtidos	Nº total de sementes	Nº de plântulas	Nº de plântulas híbridas
laranja 'Caipira' x limão 'Cravo'	125	14	72	96	8
laranja 'Caipira' x laranja 'Azeda'	560	96	497	336	17
tangerina 'Sunki' x <i>Poncirus trifoliata</i>	74	60	461	316	314

No cruzamento realizado com laranja ‘Caipira’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e laranja ‘Azeda’ (*Citrus aurantium* L.) foram polinizadas 560 flores. Destas foram obtidos 96 frutos, 497 sementes (aproximadamente, 275 sementes não germinaram) e 336 plantas, das quais 282 foram avaliadas com RAPD, sendo que 17 plantas foram identificadas como híbridas, resultando em uma taxa de 6% de embriões zigóticos.

No cruzamento realizado com laranja ‘Caipira’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck) foram polinizadas 125 flores resultando em 14 frutos, 72 sementes e 96 plantas, sendo que 13 plantas foram perdidas por contaminação ou morte após o transplante para substrato. Foram identificadas 8 plantas híbridas entre as 83 plantas avaliadas resultando em uma taxa de 9,6% de embriões zigóticos (Figura 1).

Vários trabalhos apontam que a frequência de zigóticos, dependendo da espécie/variedade, não ultrapassa 15% tendo, inclusive em alguns casos, somente embriões nucleares (PRATES, 1977). No citrange ‘Rusk’ as sementes desenvolvem somente embriões nucleares (PIO, 1993). Em 12 acessos de porta-enxertos, XIANG & ROOSE (1988) encontraram frequências de zigóticos variando de 5,5 a 50,6% em polinizações abertas, em análises utilizando isoenzimas. A proporção de embriões zigóticos que se desenvolvem e originam plântulas depende do genótipo e das condições ambientais, como fertilidade do solo, condições sanitárias e nutricionais da planta (CAMERON & FROST, 1968).

BOWAMAN *et al.* (1995) observaram que a frequência de híbridos no cultivar Cipó [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck ] varia com o polinizador. A frequência de híbridos em sementes provenientes de polinização aberta foi menor que 1%, porém foi de 5% quando o cultivar Cipó foi polinizado com *Poncirus trifoliata* e 20% quando polinizado com *Citrus ichangensis*.

SOARES FILHO *et al.* (1992) encontraram frequências de embriões zigóticos de 18,6% para o limão ‘Cravo’, 6,0% para a laranja ‘Pera’ e 5,2% para a tangerina ‘Cleopatra’, sendo que em cruzamentos com *Poncirus trifoliata* o número médio de embriões por semente foi 2,0 para o limão ‘Cravo’, 6,3 para laranja ‘Pera’ e 10,1 para tangerina ‘Cleopatra’.

Vários trabalhos correlacionam o tamanho e a capacidade de sobrevivência dos embriões zigóticos com o número de embriões por semente. Por exemplo, o limão ‘Cravo’ devido ao seu moderado grau de poliembrionia (56,8%) e baixo número de embriões por semente (2,0), apresenta embriões zigóticos relativamente grandes, (86,8%  $\geq 5,0$  mm). Em consequência, a sobrevivência dos embriões zigóticos por semente (18,6%) foi maior que a observada em laranja ‘Pera’ (6,0%) ou tangerina ‘Cleopatra’ (5,2%). Estes resultados indicam que o limão ‘Cravo’ poder ser melhor utilizado como progenitor feminino em cruzamentos controlados (SOARES FILHO *et al.*, 1992).

MOREIRA & GURGEL (1941) estudando o fenômeno da poliembrionia assinalaram que em laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck) o número médio de embriões por semente foi de 1,3; para laranja ‘Azeda’ (*Citrus aurantium* L) o número médio de embriões por semente foi de 1,6 e para o limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck) a média foi de 1,1 embriões por semente, quando realizou-se a contagem de embriões germinados.

No presente trabalho, nos cruzamentos de laranja ‘Caipira’ x laranja ‘Azeda’ e laranja ‘Caipira’ x limão ‘Cravo’, os números médios de plantas obtidas por semente foram de 1,52 e 1,33, respectivamente. Uma taxa de pegamento de frutos de 55,6% foi obtida para o limão ‘Cravo’ como progenitor feminino em cruzamento com *P. trifoliata* como doador de pólen (SOARES FILHO *et al.*, 1991). PASSOS *et al.* (1988) em cruzamento nos quais também empregaram pólen de *P. trifoliata*, alcançaram taxas de vingamento de fruto

de 10% e 6% em laranja ‘Pera’ e tangerina ‘Ponkan’ (*Citrus reticulata* Blanco), respectivamente. No presente trabalho, as taxas de pegamento de frutos foram de 11,2% e 17,14% quando foram utilizados o limão ‘Cravo’ e laranja ‘Azeda’, respectivamente, como plantas doadoras de pólen. No caso do cruzamento entre ‘Sunki’ e ‘Rubidoux’ o pegamento foi de 81%.

No cruzamento entre *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. foram polinizadas 74 flores, obtidos 60 frutos e 461 sementes. Obteve-se uma média de 7,68 sementes/fruto, porém, nem todas as sementes eram viáveis. Cerca de 121 sementes eram inviáveis, obtendo-se uma média de 5,6 sementes viáveis/fruto. Das 313 sementes que germinaram foram obtidas 316 plantas, uma média de 1,009 plantas/semente. Três pares de gêmeos foram obtidos e confirmados pelos mesmos padrões de bandas com todos os “primers” testados. Duas plantas com limbo foliar simples eram embriões nucelares pois apresentavam os mesmos padrões do progenitor feminino *Citrus sunki*. Todas as plântulas zigóticas apresentavam o carácter folha trilobada sugerindo que o gene que determina esta característica é dominante e está em homozigose em *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux, pois não houve segregação na progênie. A folha caracteristicamente trilobada serve como um marcador morfológico com a finalidade de identificar embriões zigóticos oriundos de cruzamentos envolvendo esta espécie como progenitor masculino. Contudo, esta característica monogênica, em muitos casos não é completamente eficiente, já que muitas plantas de *P. trifoliata* são heterozigotas ( IGLESIAS *et al.*, 1974; TORRES *et al.*, 1985).

A tangerina ‘Sunki’ é um porta-enxerto comercialmente utilizado, principalmente devido à sua tolerância ou resistência ao declínio. Sua grande limitação é o



reduzido número de sementes por fruto, que em nossas condições é em torno de três (TEÓFILO SOBRINHO, 1991).

No presente trabalho, realizou-se a contagem de embriões em 100 sementes de tangerina ‘Sunki’ com auxílio de microscópio-esteroscópico, encontrando-se somente um embrião por semente. Este resultado está de acordo com a média de aproximadamente 1,00 embrião/semente que germinou do cruzamento entre *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata* cv Rubidoux, o que pode indicar que a planta utilizada seja monoembriônica. Entretanto, deve-se ressaltar que a variabilidade da poliembrionia nas diversas espécies, híbridos e variedades de *Citrus*, ocorre de semente para semente, de fruto para fruto, de árvore para árvore e de ano para ano, na mesma planta (PRATES, 1977). Para se ter uma idéia precisa do grau de poliembrionia é necessário o exame de muitas sementes, retiradas de várias plantas, em mais de uma colheita.

A determinação do número de plântulas zigóticas obtidas nos cruzamentos entre laranja ‘Caipira’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck) e laranja ‘Caipira’ e Laranja ‘Azeda’ (*Citrus aurantium* L.) foi realizada utilizando RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”). Foram utilizados 4 “primers” com sequência arbitrária de 10 nucleotídeos (OPE16, OPH04, OPH15, OPM05).

Com a utilização destes “primers” foi possível detectar 17 (6%) embriões zigóticos no cruzamento entre laranja ‘Caipira’ e laranja ‘Azeda’ e 8 (9,6%) embriões zigóticos no cruzamento entre laranja ‘Caipira’ e limão ‘Cravo’.

No cruzamento entre laranja ‘Caipira’ e limão ‘Cravo’, o número de fragmentos de DNA amplificados foi em média 10,7. Cada “primer” detectou números diferentes de plantas zigóticas. Os “primers” OPH15, OPH04, OPM05 e OPE16 detectaram 4, 4, 7 e 8 híbridos, respectivamente. O tamanho dos fragmentos variou de 182 a 3690 bp.

Sementes de citros são utilizadas para propagação clonal de porta-enxertos, pois a maioria dos embriões se desenvolvem através de embriões nucelar. A proporção de embriões zigóticos depende do cultivar e das condições de polinização. Para os trabalhos de melhoramento genético a ocorrência de embriões zigóticos é fundamental. Uma estratégia para aumentar o número de embriões zigóticos por semente é a sua retirada das sementes antes da germinação e o cultivo *in vitro*. BASTIANEL (1995), em cruzamentos com tangerinas, obteve 68,75% de embriões zigóticos isolando embriões das sementes e cultivando-os *in vitro*. Já para a produção de mudas de porta-enxerto a produção de plantas uniformes idênticas à planta matriz é condição desejada. A seleção visual que se faz nos viveiros com o objetivo de identificar e descartar os embriões zigóticos, baseada no vigor dos “seedlings” não é 100% eficiente. ANDERSON *et al.* (1991) utilizando isoenzimas detectaram até 5,8% de plantas zigóticas de citrumelo ‘Swingle’ em um pomar de laranja ‘Valência’ e verificaram que em algumas destas plantas zigóticas havia caneluras na região de enxertia da copa, indicando segregação para tolerância a tristeza ou incompatibilidade de enxertia.

Por sua rapidez, eficiência e número de marcadores a técnica RAPD pode ser utilizada para avaliar a eficiência de seleção de zigóticos nos viveiros e em programas de melhoramento envolvendo cruzamentos controlados.

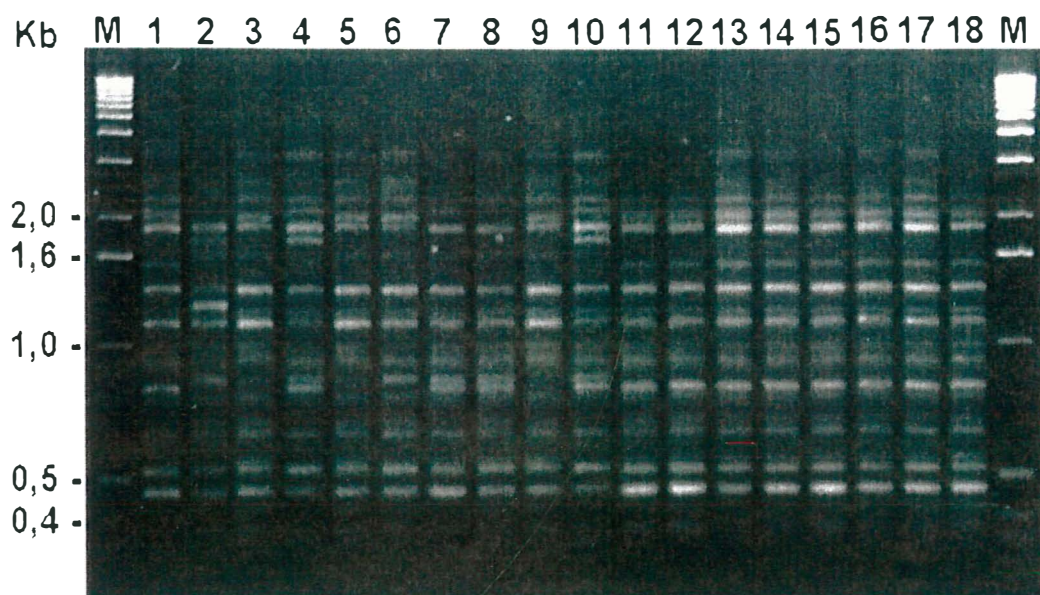


Figura 1. Amplificação do DNA de laranja 'Caipira' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (1), limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) (2) e plantas híbridas da progênie F1 (3 a 10) detectadas com o "primer" OPE16.

## 4.2. Multiplicação das plantas da progênie do cruzamento entre *Citrus sunki*

Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux.

As plantas híbridas da progênie do cruzamento entre *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux foram multiplicadas visando obter um número suficiente de plantas para avaliar resistência a doenças do sistema radicular como gomose de *Phytophthora* e declínio dos citros.

### 4.2.1. Micropropagação

Para o experimento de multiplicação *in vitro* foram utilizadas 100 plantas da progênie de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux. A média final obtida para cada uma das 100 plantas híbridas está apresentada na Tabela 3.

Houve diferença significativa, detectada pelo teste F (Apêndice 1), entre as médias de plantas obtidas/estacas para cada genótipo em relação ao cultivo *in vitro*.

No presente trabalho, observou-se que o *Poncirus trifoliata* respondeu melhor ao cultivo *in vitro* do que *Citrus sunki*. MOORE (1986) realizou um estudo utilizando três porta-enxertos de laranja ‘Azeda’ (*Citrus aurantium* L.), citrange ‘Carrizo’ e tangerina ‘Cleopatra’ (*Citrus reshni* Hort. ex. Tan.) em vários meios de cultura contendo BAP e NAA e observou que os três genótipos variaram quanto ao número de brotos produzidos. Segundo a autora, o principal fator para o estabelecimento de culturas organogênicas em *Citrus* foi o genótipo da planta. A tangerina ‘Cleopatra’ e a laranja ‘Azeda’ não responderam bem aos tratamentos. O citrange ‘Carrizo’ foi o cultivar que melhor respondeu aos tratamentos, após cinco subcultivos manteve sua capacidade de proliferação e cerca de 83% das brotações regeneraram raízes.

#### 4.2.2. Enraizamento de Estacas

Os mesmos genótipos utilizados no experimento de micropropagação foram utilizados no experimento de enraizamento *in vivo*. Quatro estacas com cinco gemas axilares de cada uma das 100 plantas híbridas foram utilizadas para este experimento.

De acordo com REUTHER *et al.* (1973) as várias espécies de *Citrus* e gêneros afins têm diferentes capacidades de enraizamento. Assim, os limões, limas ácidas e cidras enraizaram com facilidade; já as laranjas doce e 'Azeda', pomelos, citranges e trifoliata apresentam dificuldades e as tangerinas apresentam relativa dificuldade de enraizamento das estacas. No presente estudo, utilizando as concentrações de 1 g/l de NAA e 1 g/l de IBA, o desenvolvimento de raízes foi observado em todos os genótipos da progênie. Os valores percentuais variaram de 50, 75 e 100% (Tabela 3). A porcentagem de enraizamento da tangerina 'Sunki' foi de 75% e do trifoliata 'Rubidoux' foi de 50%. Na maioria dos genótipos da progênie observando-se 100% de enraizamento revelando que houve uma combinação favorável de genes dos dois parentais em vários indivíduos.

Resultados semelhantes foram relatados por SABBAH *et al.* (1991) que obtiveram 77,78% de enraizamento para a tangerina 'Cleopatra' e 44% para *Poncirus trifoliata* cv. Argentina, com imersão das estacas em uma solução contendo de 1 a 3 g/l de IBA e NAA.

Tabela 3. Número médio de plantas micropropagadas e porcentagem de estacas enraizadas obtidas em plantas híbridas do cruzamento entre *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

Nº da planta híbrida	Média de plantas obtidas	% de enraizamento	Nº total de plantas*	Nº da planta híbrida	Média de plantas obtidas	% de enraizamento	Nº total de plantas*
'Sunki'	0.60	75	17	50	0.60	100	16
'Rubidoux'	1.05	50	20	51	0.41	100	9
1	0.42	50	8	52	0.25	100	9
2	0.80	100	20	53	0.33	100	9
3	0.81	100	17	54	0.30	100	10
4	0.48	100	17	55	0.83	100	19
5	0.31	100	10	56	0.50	100	14
6	0.52	100	15	57	0.43	75	10
7	0.60	100	16	58	0.27	100	9
8	0.86	100	17	59	0.81	100	13
9	0.47	100	12	60	0.61	100	17
10	0.57	100	16	61	0.63	75	17
11	0.46	50	8	62	0.61	100	17
12	0.57	100	12	63	0.52	75	14
13	0.60	100	16	64	0.72	100	22
14	0.40	100	13	65	0.62	100	19
15	0.40	100	10	66	0.62	100	19
16	0.14	75	5	67	0.58	75	13
17	0.28	100	8	68	0.40	100	12
18	0.33	75	8	69	0.61	100	17
19	0.88	100	20	70	0.50	100	11
20	0.76	100	17	71	0.50	100	12
21	0.42	100	10	72	0.29	100	12
22	0.43	100	11	73	0.35	100	11
23	0.30	100	7	74	0.66	100	14
24	0.16	100	8	75	0.37	100	10
25	0.24	100	10	76	0.50	100	14
26	0.04	75	4	77	0.65	100	19
27	0.85	100	16	78	0.64	100	13
28	0.38	100	11	79	0.38	75	10
29	0.30	100	8	80	0.88	100	12
30	0.46	100	10	81	0.30	100	10
31	0.87	100	18	82	0.60	100	18
32	0.60	75	9	83	0.30	100	13
33	0.71	100	14	84	0.73	100	21
34	0.33	75	6	85	0.10	100	6
35	0.52	100	14	86	1	100	13
36	0.77	100	11	87	0.57	100	15
37	1	100	19	88	0.70	100	16
38	0.85	100	21	89	0.50	100	11
39	0.88	75	19	90	0.39	100	13
40	0.46	100	10	91	0.43	50	9
41	0.70	100	11	92	0.75	100	19
42	0.66	100	16	93	0.73	100	15
43	0.21	100	8	94	0.71	100	19
44	0.75	100	16	95	0.30	75	7
45	1	100	18	96	0.23	75	8
46	0.55	100	14	97	0.81	100	17
47	0.76	100	14	98	0.64	100	15
48	0.36	75	10	99	0.76	100	23
49	0.45	100	13	100	0.86	100	17

\*Número total de plantas obtidas nos experimentos de micropropagação e enraizamento de estacas.

Não houve correlação ( $R = 0,04467$ ) entre a capacidade de multiplicação *in vitro* e o enraizamento de estacas *in vivo* de 100 plantas da progênie do cruzamento entre *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux. Por exemplo, o trifoliata ‘Rubidoux’ foi o que melhor respondeu ao cultivo *in vitro* (Tabela 3), no entanto, apresentou somente 50% de capacidade de enraizamento de estacas *in vivo*.

As plantas obtidas por micropropagação ou por enraizamento de estacas estão sendo utilizadas em programas para obtenção de porta-enxertos resistentes à gomose e podridão de raízes causadas por fungos do gênero *Phytophthora* e mapeamento de QTLs envolvidos na herança desta característica.

### **4.3. Mapas de Ligação**

Para a construção dos mapas de ligação, o cruzamento priorizado foi o de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux, por serem os parentais mais divergentes e pelo número de híbridos obtidos.

#### **4.3.1. Seleção de “primers”**

A avaliação inicial do nível de polimorfismo na progênie, objetivando principalmente a seleção dos “primers” randômicos, foi realizada utilizando-se os dois parentais [*Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Rubidoux] e seis indivíduos da progênie (Figura 2).

Nas condições em que os experimentos foram realizados, as reações de PCR amplificaram uma média de 10,3 bandas visíveis em gel de agarose (1,4%) corado com brometo de etídio. Com este formato (dois parentais e 6 indivíduos da progênie F1), a

origem parental dos locos polimórficos assim como seu estado alélico (homozigoto ou heterozigoto) foram diretamente inferidos a partir da presença em um parental, ausência em outro e pelo menos uma presença/ausência na amostra da progênie. Dos 208 “primers” analisados, 47 (22,5%) não produziram qualquer produto de amplificação, 83 (40%) não detectaram polimorfismo na progênie e 78 (37,5%) detectaram polimorfismo com 1 a 7 bandas por “primer” com pesos moleculares variando entre 0,20 a 3 Kb, gerando um total de 168 marcadores (Tabela 4). O número médio de marcadores por “primer” selecionado foi de 2,15 e de 0,80 por qualquer “primer” testado.

Baixo número de marcadores/”primer” foi encontrado, no presente trabalho, em relação a outros trabalhos que utilizaram a estratégia “pseudo-testcross” e marcadores de dose única. GRATTAPAGLIA & SEDEROFF (1994) trabalhando com *Eucalyptus* encontraram 3,69 marcadores por “primer” selecionado ou 1,82 para qualquer “primer” testado. Em cana de açúcar (AL-JANABI *et al.*, 1993) foram encontrados 2,65 marcadores por “primer” selecionado e em maçã HEMMAT *et al.* (1994) encontraram 5,64 marcadores por ”primer” selecionado. A eficiência da estratégia de mapeamento utilizando a configuração “pseudo-testcross” é diretamente proporcional ao nível de heterozigosidade das espécies em estudo, o que é uma função do sistema de reprodução e da divergência genética entre os indivíduos (CARLSON *et al.*, 1991).

Em pêsego [*Prunus persica* (L.) Batsch], em um cruzamento intraespecífico, 50% dos “primers” selecionados amplificaram um ou mais fragmentos em uma população mapa F2. Vinte e dois “primers” resultaram em 25 marcadores RAPD, ou seja, apenas 1,13 marcadores por “primer” selecionado. Esse resultado pode estar associado à auto-polinização, que é frequente em pêsego, e ao cruzamento intraespecífico. Embora



pêssego seja uma cultura de auto-polinização, observou-se que os parentais não eram homocigotos para todos os locos (RAJAPAKSE *et al.*, 1995). Os autores encontraram polimorfismo suficiente com RAPD em pêsego em um cruzamento intraespecífico.

No presente trabalho, dos 168 marcadores, 82 eram provenientes de ‘Rubidoux’ e 86 de ‘Sunki’. Este resultado sugere um grau similar de heterocigosidade dos parentais.

A análise de 253 bandas polimórficas e monomórficas a partir de 39 “primers” para a construção de um fenograma (Figura 3) revelou que 53 (20,94%) das bandas estavam em homocigose em ‘Rubidoux’, 51(20,15%) estavam em homocigose em ‘Sunki’, 37(14,62%) estavam em heterocigose em ‘Rubidoux’, 44 (17,39%) estavam em heterocigose em ‘Sunki’ e 68 bandas (26,87%) eram comuns aos dois genomas. No caso em que as bandas eram comuns aos dois parentais, como em 80 indivíduos não foi detectada nenhuma segregação, é possível que os locos estejam em homocigose em um ou em ambos os parentais.

Valores baixos de heterocigose podem indicar que a auto-polinização tenha desempenhado um importante papel na origem e evolução de algumas espécies de citros (HERRERO *et al.*, 1996). Algumas destas espécies, utilizadas como porta-enxertos (*Citrus sunki*, *Citrus reshni* e *Citrus myrtifolia*), podem ter surgido por auto-fecundação e terem sido propagadas vegetativamente, explicando a manutenção da baixa heterocigosidade. Os dados encontrados por MOORE & CASTLE (1988), baseados na genotipagem com isoenzimas (7 locos) em 15 porta-enxertos, apoiam esta hipótese. ROOSE *et al.* (1994) relataram que todas as plântulas zigóticas de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf cv. Flying Dragon

de polinização aberta, tinham genótipos isoenzimáticos consistentes com a origem por auto-polinização.

A baixa porcentagem (37,5%) de marcadores mostrando polimorfismo, em relação a outros trabalhos, pode ser um indício de uma baixa heterozigosidade em *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv Rubidoux e *Citrus sunki*. Em *Eucalyptus*, de 305 “primers” arbitrários avaliados 57 (18,7%) não produziram nenhum produto de amplificação, 50 (16,4%) não detectaram polimorfismo na progênie e 198 (64,9%) produziram pelo menos um fragmento polimórfico (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994). Em *Citrus*, com uma população mapa proveniente de um retrocruzamento, de 140 “primers” avaliados, 69 (49%) mostraram polimorfismo (CAI *et al.*, 1994). Em cana de açúcar, dos 420 “primers” avaliados, 36 (8,6%) falharam em amplificar qualquer loco, 139 (33,1%) não detectaram polimorfismo e 245 (58,3%) detectaram pelo menos um polimorfismo (AL-JANABI *et al.*, 1993).

No presente trabalho, na análise de um total de 253 bandas para a construção de um fenograma (Figura 3) verificou-se que somente 26,3% das bandas eram compartilhadas entre os dois genomas. Apenas 42% de similaridade entre os dois genomas, foi encontrado. Portanto, a explicação para o baixo polimorfismo pode ser devido à baixa heterozigose dos genomas e não devido à pouca divergência entre eles.

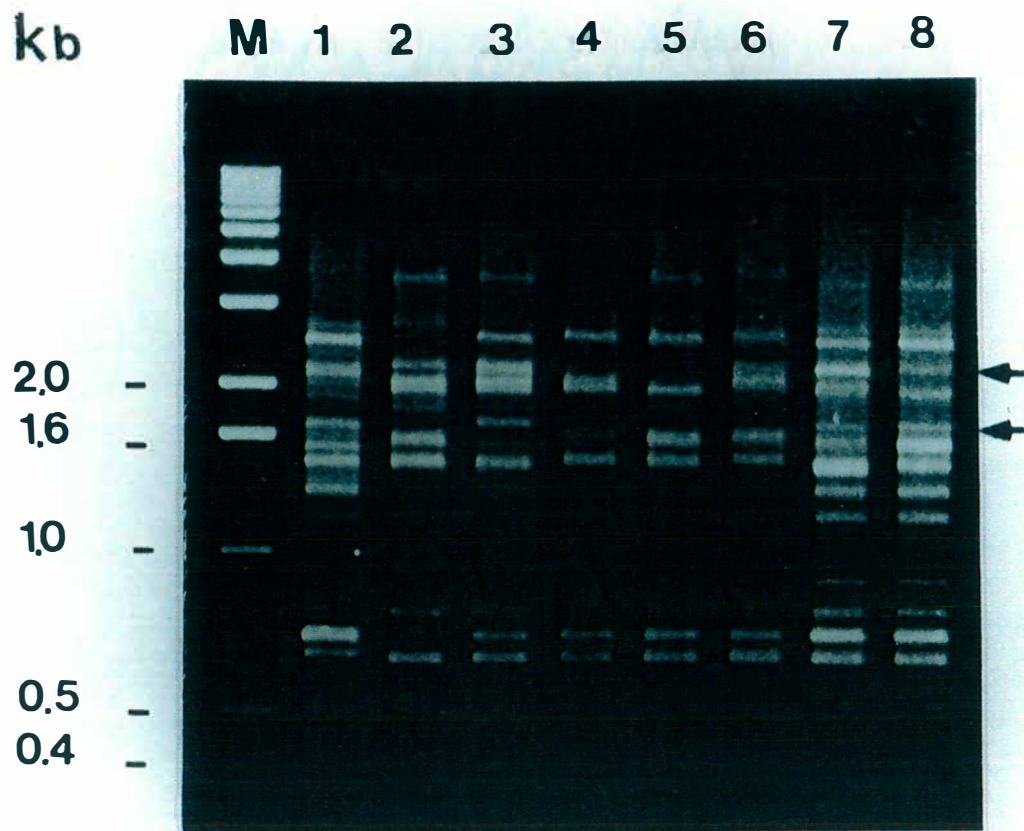


Figura 2 . Triagem de “primers” para a configuração “pseudo-testcross”. O “primer” OPN15 foi utilizado com o DNA genômico dos parentais *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux (1) e *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. (2) e uma amostra de seis indivíduos da progênie F1. Marcadores polimórficos estão indicados . M = marcador de peso molecular

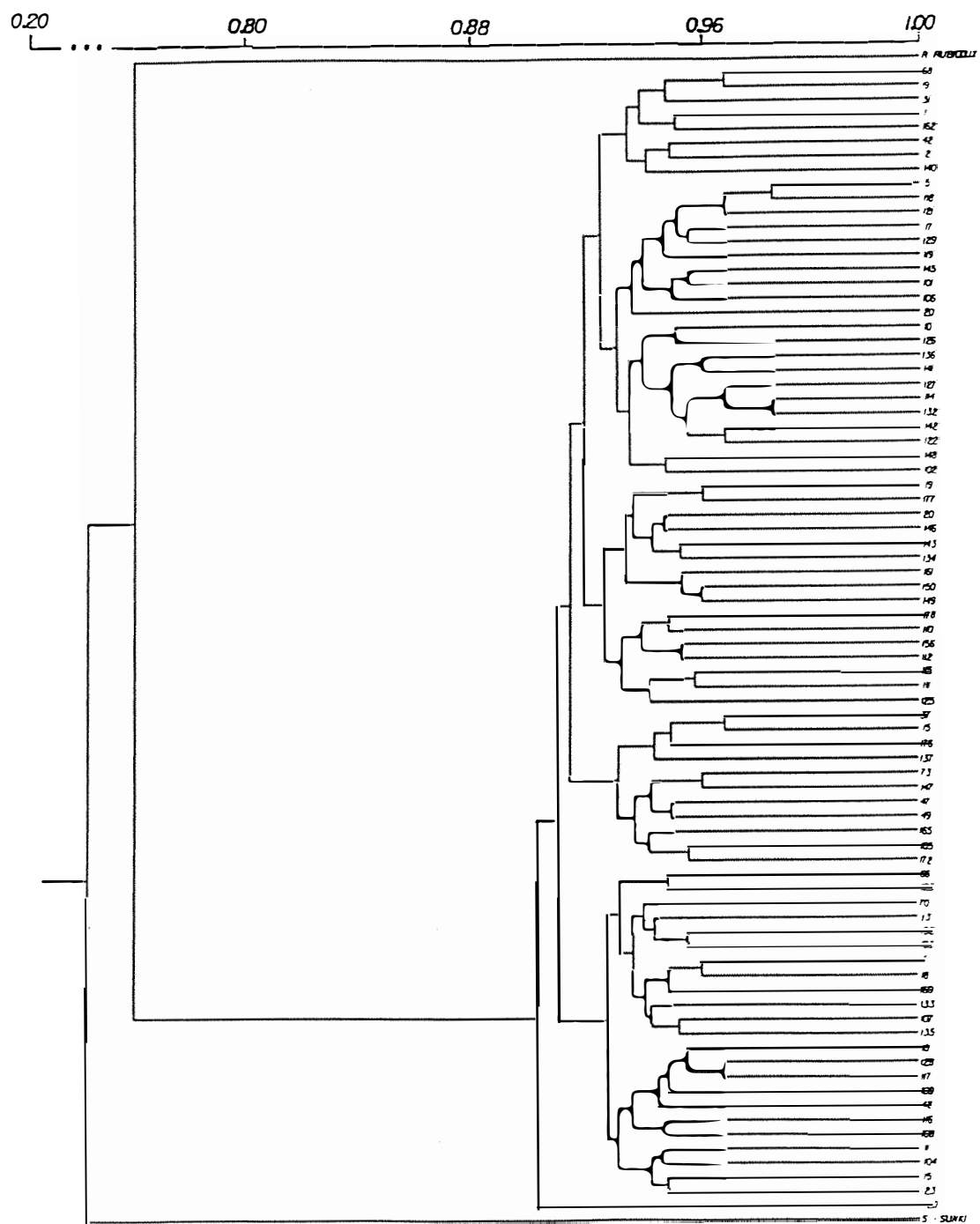


Figura 3. Similaridade genética, com base em 253 marcadores, entre os indivíduos resultantes do cruzamento de tangerina 'Sunki' (*Citrus sunki* Hort. ex. Tan.) e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux (coeficiente Dice).

Tabela 4. “Primers” selecionados e número de marcadores polimórficos de uma população F1 de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux.

Código do “primer”	Sequência de nucleotídeos 5' a 3'	Número de marcadores	Código do “primer”	Sequência de nucleotídeos 5' a 3'	Número de marcadores
OPA01	GAGGCCCTTC	1	OPC05	GATGACCGCC	3
OPA04	AATCGGGCTG	3	OPC06	GAACGGACTC	4
OPA09	GGGTAACGCC	2	OPC07	GTCCCGACGA	1
OPA10	GTGATCGCAG	7	OPC10	TGTCTGGGTG	3
OPA12	TCGGCGATAG	1	OPC11	AAAGTGCGG	1
OPA18	AGGTGACCGT	3	OPC12	TGTCATCCCC	1
OPAT03	GACTGGGAGG	2	OPC13	AAGCCTCGTC	1
OPAT04	TTGCCTCGCC	1	OPC14	TGCGTGCTTG	3
OPAT05	ACACCTGCCA	1	OPC15	GACGGATCAG	2
OPAT07	ACTGCGACCA	4	OPC19	GTTGCCAGCC	3
OPAT14	GTGCCGCACT	2	OPE07	AGATGCAGCC	3
OPAT18	CCAGCTGTGA	3	OPE15	ACGCACAACC	1
OPAV02	TCACCGTGTC	5	OPE16	GGTGACTIONG	3
OPAV03	TGTAGCCGTG	3	OPE20	AACGGTGACC	2
OPAV05	GTGAGCGTGG	3	OPK07	AGCGAGCAAG	1
OPM02	ACAACGCCTC	3	OPM05	GGGAACGTGT	3
OPAV08	TGAGAAGCGG	3	OPM06	CTGGGCAACT	4
OPAV09	GAGGTCCTAC	1	OPM07	CCGTGACTCA	1
OPAV11	GACCCCGACA	4	OPM09	GTCTTGCGGA	2
OPAV12	AGCCGTCGAA	3	OPM11	GTCCACTGTG	2
OPAV16	GACAAGGACC	2	OPQ05	CCGCGTCTTG	3
OPM12	GGGACGTTGG	2	OPQ06	GAGCGCCTTG	2
OPM13	GGTGGTCAAG	3	OPQ07	CCCCGATGGT	2
OPM15	GACCTACCAC	1	OPQ12	AGTAGGGCAC	1
OPM16	GTAACCAGCC	1	OPQ14	GGACGCTTCA	3
OPM17	TCAGTCCGGG	1	OPR02	CACAGCTGCC	1
OPM20	AGGTCTTGGG	3	OPR07	ACTGGCCTGA	1
OPN01	CTCACGTTGG	2	OPR09	TGAGCACGAG	3
OPN05	ACTGAACGCC	1	OPR14	CAGGATTCCC	1
OPN06	GAGACGCACA	2	OPR19	CCTCCTCATC	1
OPN08	ACCTCAGCTC	3	OPR20	ACGGCAAGGA	2
OPN09	TGCCGGCTTG	2	OPU03	CTATGCCGAC	1
OPN10	ACAACCTGGGG	1	OPU05	TTGGCGGCCT	2
OPN11	TCGCCGCAAA	1	OPN12	CACAGACACC	1
OPN13	AGCGTCACTC	1	OPU08	GGCGAAGGTT	1
OPN14	TCGTGCGGGT	3	OPU11	AGACCCAGAG	2
OPN15	CAGCGACTGT	5	W	CGCGGCCA	1
OPN16	AAGCGACCTG	2	OPH04	GGAAGTCGCC	3
OPQ03	GGTCACCTCA	1	OPH11	ACATGCCGTTG	1
			Total = 78 “PRIMERS”		Total = 168 MARCADORES

### 4.3.2. Análise da ligação

A reprodução dos produtos das reações RAPD foi confirmada através da repetição das reações com 40 indivíduos. Com 14 “primers” apareceu uma banda polimórfica a mais em um dos dois conjuntos de reações. Estas bandas não foram incluídas na análise de ligação. Foram utilizados três tipos de termocicladores, MJ com 96 poços, MJ com 60 poços e Robocycle com 96 poços. Para alguns “primers” os padrões de bandas não foram os mesmos nos três tipos de aparelhos. Por esta razão, as reações que eram realizadas com um “primer” sempre foram conduzidas no mesmo aparelho.

Com base na análise de ligação, 123 dos 168 marcadores encontrados se agruparam em 18 grupos de ligação. Sessenta e três marcadores se ligaram em 10 grupos de ligação em *Citrus sunki* e em *Poncirus trifoliata* cv. Rubidoux, 60 marcadores se ligaram em 8 grupos de ligação.

A análise de Qui-quadrado (Tabela 5) revelou que 39 (23,21%) marcadores exibiram segregação distorcida da proporção esperada de 1:1 ( $\alpha=0,05$ , GL=1). Segregações distorcidas têm sido amplamente discutidas. Tais distorções têm sido observadas em cruzamentos intra e interespecíficos. Em *Citrus*, em geral, não são particularmente altas quando comparadas com aquelas observadas em espécies anuais e perenes (HELENTJARIS *et al.*, 1986; JARREL *et al.*, 1992).

A Tabela 5 mostra a segregação observada dos marcadores na população de mapeamento. Para um  $\alpha=0,05$ , considerando um total de 168 marcadores, cerca de 8,40 destes eram esperados mostrar este comportamento devido ao acaso. Como este número foi maior, isto é, foram encontrados 39 (23,21%) (17 com  $\alpha=0,05$  e 22 com  $\alpha=0,01$ , GL=1)

marcadores mostrando desvio na segregação é possível que tais distorções tenham uma causa biológica.

DURHAM *et al.* (1992) observaram que 37% dos marcadores RFLP exibiram segregação distorcida em retrocruzamento. Semelhantes desvios da taxa esperada também foram relatados em outros cruzamentos de *Citrus*. Nove dos 46 locos isoenzimáticos e RFLP (20%) identificados em um cruzamento intergenérico mostraram segregação distorcida (JARREL *et al.*, 1992), enquanto que, 29% dos marcadores em um cruzamento intraespecífico de *Citrus* tinham taxas distorcidas (DURHAM *et al.*, 1992). Taxas de segregação distorcidas foram encontradas em 7 dos 8 locos isoenzimáticos em certas famílias de um cruzamento entre *Citrus grandis* e *Poncirus trifoliata* (TORRES *et al.*, 1985).

O fato de que muitos marcadores RFLP e RAPD exibem segregações distorcidas indica que os marcadores DNA não são todos neutros e tanto as sequências codificantes e não codificantes podem estar sob pressão de seleção positiva ou negativa (LANDRY *et al.* 1992). Entretanto, isto não impede a utilização de tais locos nos estudos de mapeamento (CAI *et al.*, 1994).

No presente trabalho, 45 marcadores (26,78%) não se ligaram a qualquer grupo de ligação. Esta proporção é alta em relação aos mapas que foram construídos com maior número de marcadores como os de *Eucalyptus*, onde esta porcentagem foi de 4,5 (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994), cana de açúcar (15,4%) (AL-JANABI *et al.*, 1993) e maçã (4,64%) (HEMMAT *et al.*, 1994). Mas é semelhante aos mapas onde é necessário encontrar mais marcadores. Em *Citrus*, 77 marcadores (28,94%) não se ligaram (CAI *et al.*, 1994). Em “Blueberry” dos 89 fragmentos polimórficos, 72 estavam ligados

enquanto 17 (19%) não se ligaram a nenhum grupo de ligação (ROWLAND & LEVI, 1994). Em pêssego, 18 marcadores (27% do total) não se ligaram a qualquer grupo de ligação (RAJAPASKE *et al.*, 1995). Espera-se que esta proporção diminua conforme aumente o número de marcadores mapeados.



Tabela 5. Segregação de marcadores RAPD em uma progênie F1 e teste de homogeneidade para segregação esperada 1:1.

MARCADOR	NÚMERO DE PROGÊNIES +/-	FREQUÊNCIA ESPERADA +/-	$\chi^2$	MARCADOR	NÚMERO DE PROGÊNIES +/-	FREQUÊNCIA ESPERADA +/-	$\chi^2$
OPM05 1300	30:41	1:1	1.704225	OPAT03 1000	39:34	1:1	0.342466
OPA01 980	38:30	1:1	0.941176	OPAT03 1600	28:43	1:1	3.169014
OPA04 470	40:37	1:1	0.116883	OPAT04 430	15:23	1:1	1.684211
OP A04 480	34:43	1:1	1.051948	OPAT05 740	17:19	1:1	0.111111
OP A04 900	23:54	1:1	12.48052**	OPAT07 1700	50:19	1:1	13.92754**
OPA09 710	31:41	1:1	1.388889	OPAT07 3000	38:33	1:1	0.352113
OPA09 890	46:26	1:1	5.55556*	OPAT07 400	29:40	1:1	1.753623
OPA10 1200	37:38	1:1	0.013333	OPAT07 750	21:48	1:1	10.56522**
OPA10 200	18:18	1:1	0	OPAT14 1550	39:32	1:1	0.690141
OPA10 260	38:36	1:1	0.054054	OPAT14 600	42:31	1:1	1.657534
OPA10 300	33:42	1:1	1.076393	OPAT18 500	28:51	1:1	6.696203**
OPA10 490	50:25	1:1	8.333333**	OPAT18 799	50:29	1:1	5.582278*
OPA10 750	46:29	1:1	3.853333	OPAT18 800	29:50	1:1	5.582278*
OPA10 800	39:36	1:1	0.120000	OPAV02 1100	22:57	1:1	15.50633**
OPA12 980	44:24	1:1	5.882353*	OPAV02 1400	44:35	1:1	1.025316
OPAV03 250	30:48	1:1	4.153846*	OPAV02 2100	37:43	1:1	0.450000
OPAV03 600	43:36	1:1	0.620253	OPAV02 250	29:50	1:1	5.582278*
OPAV03 750	36:42	1:1	0.461538	OPAV02 3050	50:29	1:1	5.582278*
OPAV05 1200	18:21	1:1	0.230769	OPC05 750	35:41	1:1	0.473684
OPAV05 250	16:21	1:1	0.675676	OPC06 500	5:29	1:1	16.94118**
OPAV05 900	38:41	1:1	0.113924	OPC06 500	19:13	1:1	1.125
OPAV08 1750	35:43	1:1	0.820513	OPC06 500	16:22	1:1	0.947368
OPAV08 1800	42:36	1:1	0.461538	OPC06 500	16:22	1:1	0.947368
OPAV08 900	58:20	1:1	18.51282**	OPC07 1400	39:37	1:1	0.05263
OPAV09 980	13:24	1:1	3.27027	OPC10 500	19:20	1:1	0.277778
OPAV11 1300	34:44	1:1	1.282051	OPC10 500	23:15	1:1	1.684211
OPAV11 1430	30:47	1:1	3.753247	OPC10 500	20:18	1:1	0.105263
OPAV11 2000	38:41	1:1	0.113924	OPC11 400	49:30	1:1	4.56962*
OPAV11 250	37:41	1:1	0.205128	OPC12 1500	32:42	1:1	1.351351
OPAV12 490	45:35	1:1	1.250000	OPC13 500	16:21	1:1	0.675676
				OPC14 1300	43:37	1:1	0.450000
				OPC14 1500	38:42	1:1	0.200000
				OPC14 650	22:17	1:1	0.641026

Tabela 5. Continuação.

MARCADOR	NUMERO DE PROGENIES +/-	FREQUENCIA ESPERADA +/-	$\chi^2$	MARCADOR	NUMERO DE PROGENIES +/-	FREQUENCIA ESPERADA +/-	$\chi^2$
OPAV12 330	18:17	1:1	0,028571	OPC15 490	40:39	1:1	0,012658
OPAV12 410	18:17	1:1	0,028571	OPC15 990	40:39	1:1	0,012658
OPAV16 1400	40:37	1:1	0,116883	OPC19 380	27:52	1:1	7,911392**
OPAV16 800	35:42	1:1	0,636364	OPC19 390	17:21	1:1	0,421053
OPC05 1490	43:33	1:1	1,315789	OPC19 400	31:6	1:1	16,89189**
OPC05 1500	46:30	1:1	3,368421	OPE07 1100	56:18	1:1	19,51351**
OPE07 820	36:38	1:1	0,054054	OPW 1650	18:20	1:1	0,105263
OPE07 900	37:37	1:1	0	OPH04 990	37:30	1:1	0,731343
OPE15 1000	33:42	1:1	1,080000	OPH11 680	15:24	1:1	2,076923
OPE16 490	47:25	1:1	6,722222*	OPN01 420	12:25	1:1	4,567568*
OPE16 510	34:38	1:1	0,222222	OPN10 1550	38:35	1:1	0,123228
OPE16 520	40:32	1:1	0,888889	OPN11 500	50:19	1:1	13,92754**
OPK07 460	24:15	1:1	2,076923	OPN12 1550	49:28	1:1	5,727273*
OPN02 1650	45:29	1:1	3,459459	OPN13 1400	21:18	1:1	0,230769
OPN02 2990	43:34	1:1	1,051948	OPN14 1000	55:24	1:1	12,16456**
OPN02 3000	39:38	1:1	0,012987	OPN14 1600	42:37	1:1	0,316456
OPN05 1000	54:17	1:1	19,28169**	OPN14 400	38:41	1:1	0,113924
OPM05 380	37:34	1:1	0,126761	OPN15 1600	18:18	1:1	0
OPN06 1100	40:38	1:1	0,051282	OPM20-1500	41:27	1:1	2,2882353
OPN06 1250	24:14	1:1	2,631579	OPN05 1300	37:41	1:1	0,205128
OPN06 2000	16:22	1:1	0,947368	OPN06 1500	39:37	1:1	0,052632
OPN06 2300	50:29	1:1	5,582278*	OPN06 1590	32:44	1:1	1,884737
OPM07 410	12:21	1:1	2,454545	OPN08 2750	39:31	1:1	0,914289
OPM09 940	17:19	1:1	0,111111	OPN08 390	42:28	1:1	2,800000
OPM09 860	15:21	1:1	1	OPN08 750	56:14	1:1	25,20000**
OPM11 1500	36:39	1:1	0,120000	OPN09 1550	39:35	1:1	0,216216
OPM11 300	33:42	1:1	1,080000	OPN09 1030	47:25	1:1	6,722222**
OPM12 490	22:53	1:1	12,81333**	OPN01 850	24:13	1:1	3,27027
OPM12 990	51:25	1:1	8,894737**	OPQ05 510	42:36	1:1	3,764706
OPM13 300	38:39	1:1	0,012987	OPQ06 1600	10:22	1:1	4,50000*
OPM13 490	36:41	1:1	0,324635	OPQ06 1020	17:21	1:1	0,421053
OPM13 750	33:44	1:1	1,571429	OPU11 2200	46:32	1:1	2,512821
OPM15 990	35:41	1:1	0,473684	OPH04 1200	25:42	1:1	4,313433*
OPM16 300	42:36	1:1	0,461538	OPH04 1400	34:33	1:1	0,014925
OPM17 650	13:21	1:1	1,882353	OPU05 750	18:20	1:1	0,105263
OPM20 730	25:43	1:1	4,764706*	OPU08 1600	39:33	1:1	0,500000
OPM20 900	32:36	1:1	0,235294	OPU11 1550	39:39	1:1	0

Tabela 5. Cont.

MARCADOR	NÚMERO DE PROGÊNIES +/-	FREQUENCIA ESPERADA +/-	$\chi^2$	MARCADOR	NÚMERO DE PROGÊNIES +/-	FREQUENCIA ESPERADA +/-	$\chi^2$
OPN15 1610	18:18	1:1	0	OPQ07 250	34:35	1:1	0,014493
OPN15 2000	16:20	1:1	0,44444	OPQ07 430	24:15	1:1	2,076923
OPR20 920	19:18	1:1	0,01351	OPQ12 490	40:37	1:1	0,116883
OPN15 1630	19:18	1:1	0,027027	OPQ14 2200	36:44	1:1	0,800000
OPN15 920	18:19	1:1	0,027027	OPQ14 570	44:36	1:1	0,800000
OPN16 510	43:31	1:1	1,900000	OPQ14 600	36:44	1:1	0,800000
OPN16 500	15:20	1:1	0,714286	OPR02 750	32:39	1:1	0,690141
OPQ03 250	23:16	1:1	1,25641	OPR07 1610	40:36	1:1	0,210526
OPQ05 408	25:43	1:1	4,764706*	OPR09 1000	29:48	1:1	4,688312*
OPQ05 500	32:36	1:1	0,235294	OPR09 610	16:21	1:1	0,675676
OPU03 1550	41:37	1:1	0,205128	OPR09 500	13:24	1:1	3,270270
OPU05 740	30:07	1:1	14,2973**	OPR20 510	18:19	1:1	0,01351
OPR20 1100	36:39	1:1	0,120000	OPR14 800	50:20	1:1	12,85714**
OPR20 800	52:23	1:1	11,21333**	OPR19 1100	31:44	1:1	2,253333

Níveis de significância: \* $\alpha=0,05$ ; \*\* $\alpha=0,01$  a 1 grau de liberdade (GL)

(+) = presença da banda

(-) = ausência da banda

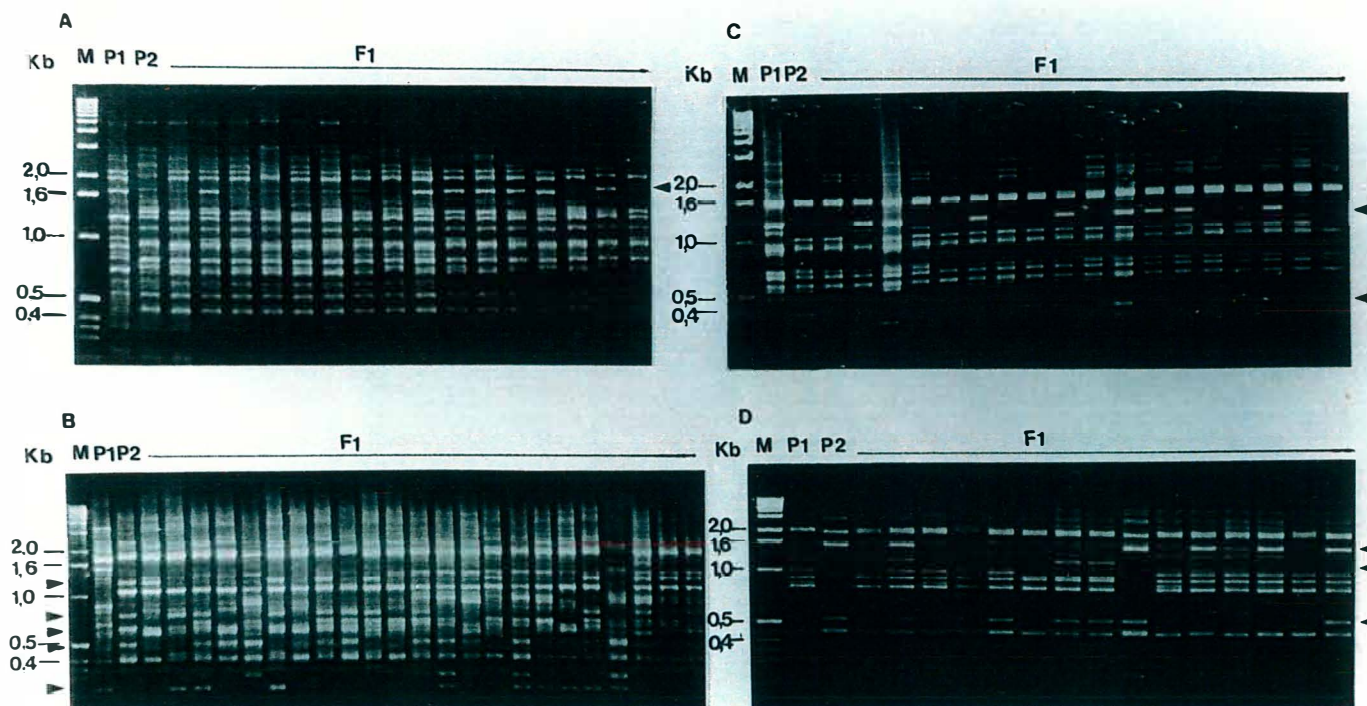


Figura 4. Amplificação do DNA de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux (P1), *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. (P2) e plantas da progênie F1 (todas as outras colunas). O DNA foi amplificado com os “primers” 5'-CGCGGCCA-3' (A), OPA10 (B), OPM05 (C) e OPH04 (D). As setas indicam marcadores polimórficos. M = marcador de peso molecular (1 - Kb Ladder).

### 4.3.3. Construção dos mapas de ligação

O comprimento total dos mapas foi de 867,58 cM para ‘Rubidoux’ (Tabela 6 e Figura 5) e 732,32 cM para ‘Sunki’ (Tabela 7 e Figura 6) com uma distância média de 14,45 cM entre marcadores para ‘Rubidoux’ (considerando os marcadores RAPD e o gene Ctv) e 11,62 cM para ‘Sunki’. O comprimento individual dos grupos de ligação variou de 3,20 a 246,67 cM para ‘Rubidoux’ e de 10,3 a 174,18 cM para ‘Sunki’. O maior intervalo entre marcadores foi de 43,8 cM. Foram encontrados em ‘Sunki’ 3 “gaps” com distância maior que 30 cM e em ‘Rubidoux’ foram encontrados 6 “gaps” com distância maior que 30 cM.

Os marcadores inseridos ao mapa de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv Rubidoux através do comando “Multipoint/Try” foram: OPA10\_250, OPK07\_460, OPAT03\_1600, OPAT18\_800, OPC05\_1500, OPU05\_740 e OPC06\_990. Para o mapa de *Citrus sunki* Hort. ex Tan. os marcadores inseridos foram: OPA01\_980, OPM16\_300 e OPM20\_900.

Tabela 6. Número de marcadores RAPD e o comprimento em Centimorgans (cM) de cada grupo de ligação do mapa de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf cv. Rubidoux.

Grupo de ligação	Número de marcadores	Comprimento (cM)
GI	14	246,67
GII	13	201,75
GIII	7	126,60
GIV	13	121,50
GV	6	118,76
GVI	3	31,50
GVII	2	17,60
GVIII	2	3,20
Total	60	867,58

Tabela 7. Número de marcadores RAPD e comprimento em Centimorgans (cM) de cada grupo de ligação do mapa de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan.

Grupo de ligação	Número de marcadores	Comprimento (cM)
GI	12	174.18
GII	13	149.10
GIII	13	126.72
GIV	6	82.20
GV	6	42.68
GVI	2	43.80
GVII	3	39.90
GVIII	4	41.54
GIX	2	21.90
GX	2	10.30
Total	63	732.32

Os grupos de ligação foram numerados sequencialmente do mais longo para o mais curto. Os grupos de ligação foram construídos utilizando marcadores em ambas as fases de ligação. Marcadores em uma fase de ligação foram indicados com o sinal “+”, enquanto que marcadores em uma fase alternativa foram indicados com um sinal “-” (Figuras 5 e 6). Um exemplo de marcadores completamente ligados em repulsão é mostrado na Figura 7. Os marcadores OPQ14\_570 e OPQ14\_600, de *Citrus sunki*, são exemplos de locos que estão ligados em repulsão e podem se comportar como um marcador codominante. Marcadores RAPD codominantes são raros (DAVIS *et al.*, 1995). Eles têm sido identificados como duas bandas de diferentes mobilidades no gel que exibem ligação completa em repulsão em uma população segregante (SCHULZ *et al.*, 1994).

O tamanho do genoma de *Citrus* foi estimado em 1500 a 1700 cM (LIOU, 1990; JARREL *et al.*, 1992). Assim sendo, os mapas atuais de ‘Sunki’ e ‘Rubidoux’ cobrem 43,07 a 48,82% e 51,03 a 57,83% dos genomas, respectivamente. O mapa de *Citrus* construído por CAI *et al.* (1994) cobre 1192 cM a uma distância média de 7,5 cM entre locos, representando cerca de 70-80% do genoma de *Citrus*. LURO *et al.* (1994) utilizando uma progênie resultante do cruzamento entre *Citrus grandis* x [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus reshni*] obtiveram um mapa com 95 marcadores RFLP em 12 grupos de ligação com um total de 1503 cM.

No presente trabalho, foram construídos dois mapas de ligação totalizando 1593,58 cM (867,58 cM para o trifoliata ‘Rubidoux’ e 732,32 cM para a tangerina ‘Sunki’). Os mapas de ligação obtidos (Figuras 5 e 6) são específicos para cada indivíduo. A estratégia de mapeamento utilizada, “pseudo-testcross”, é baseada na seleção de marcadores de dose única presentes em um parental e ausentes em outro. Nos mapas de ‘Sunki’ e ‘Rubidoux’ nenhum marcador foi comum aos dois genomas, logo, não foi possível determinar homologia entre os dois mapas ou integrá-los em um só, como acontece em uma estratégia de mapeamento utilizando populações tais como, retrocruzamentos, geração F2 ou gerações mais avançadas, onde ocorre recombinação entre os genomas e, desta forma, é possível haver marcadores de ambos os genomas em um mesmo grupo de ligação.

Para integrar mapas de ligação construídos com a estratégia “pseudo-testcross”, marcadores codominantes multialélicos com alelos segregando de ambos os parentais seriam mais eficientes, fornecendo um conjunto comum de locos que poderiam ser utilizados como ponte (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994). No presente trabalho, nenhum destes locos foi encontrado. O número de plantas (80) utilizado, no presente

trabalho, é suficiente para detectar pelo menos uma ausência do marcador na progênie. Este fato não foi observado, levando à conclusão de que os marcadores que estão presentes em ambos os parentais não estão segregando, o que quer dizer que em ambos ou pelo menos em um dos progenitores estes locos estão em homozigose.

Marcadores que mostram segregação distorcida estão agrupados em um grupo de ligação particular (LANDRY *et al.*, 1992; PRINCE *et al.*, 1993). JARREL *et al.* (1992) verificaram que locos RFLP com segregação distorcida se agrupavam em três lugares do genoma de *Citrus*. CAI *et al.* (1994) observaram que 40% dos locos que apresentavam segregação distorcida se agrupavam no grupo I e a maioria dos marcadores restantes se agruparam nos grupos de ligação II, III, IV e VIII. As áreas de agrupamento, em geral, correspondem às áreas com distorções. Estes padrões sugerem que a maioria dos locos em distorção no genoma de citros pode estar ligada a genes expostos à seleção. Em outros estudos, constatou-se que locos distorcidos agrupados eram distorcidos em direção a um parental em particular. No trabalho realizado por CAI *et al.* (1994) quase todos os locos distorcidos foram em direção ao pai recorrente *Citrus grandis*. Estes locos se encontravam em três grupos de ligação (I, II e IV), que contêm a maioria dos locos em distorção, enquanto todos os locos distorcidos em direção ao parental doador *P. trifoliata* se encontravam nos grupos VIII e IX. A presença destes grandes blocos de locos distorcidos em direção a um parental ou outro pode ter implicações para o uso desta população para análise de QTLs.

No presente trabalho, no mapa de ‘Rubidoux’ foram detectados 18 locos com segregação distorcida entre os 60 locos mapeados. Cerca de 34% destes locos se agruparam no grupo de ligação IV (Figura 5). No mapa de ‘Sunki’ foram detectados 11



locos com segregação distorcida e cerca de 55% destes locos se agruparam no grupo de ligação III (Figura 6).

O presente estudo demonstrou o potencial da estratégia “pseudo-testcross” e marcadores RAPD para a construção de mapas de ligação em espécies de *Citrus* e gêneros relacionados. Os genomas não foram saturados com marcadores, uma vez que, os números de grupos de ligação encontrados para a tangerina ‘Sunki’ (10 grupos) e trifoliata ‘Rubidoux’ (8 grupos) são maiores e menores, respectivamente, que o número haplóide de cromossomos dos citros ( $n=9$ ). Com a adição de um maior número de marcadores ao mapa, a tendência será de igualar o número de grupos de ligação com o número de cromossomos.

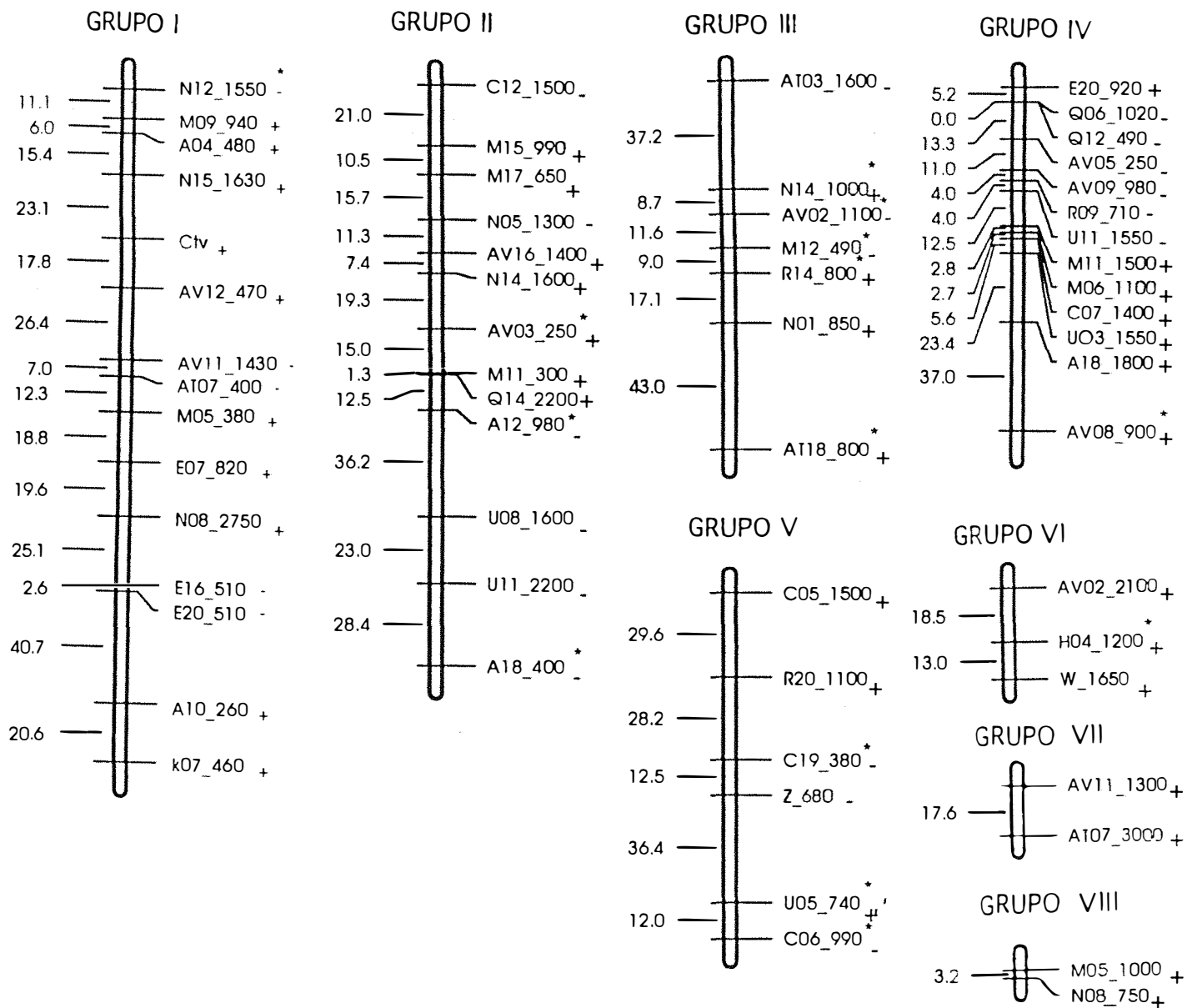


Figura 5. Mapa genético de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf cv Rubidoux. As relações de ligação de 60 marcadores RAPD e o gene de resistência a tristeza dos citros (Ctv) foram estabelecidas com um critério de LOD = 4,0 e um  $\theta$  máximo = 0,30. Os marcadores RAPD estão indicados pelo código do “primer” da Operon, tamanho do fragmento e fase de ligação (+ ou -). Os locos mostrando distorção significativa da taxa de segregação esperada (1:1) estão indicados com um asterisco. Os números à esquerda dos mapas indicam as distâncias em centimorgans (cM)

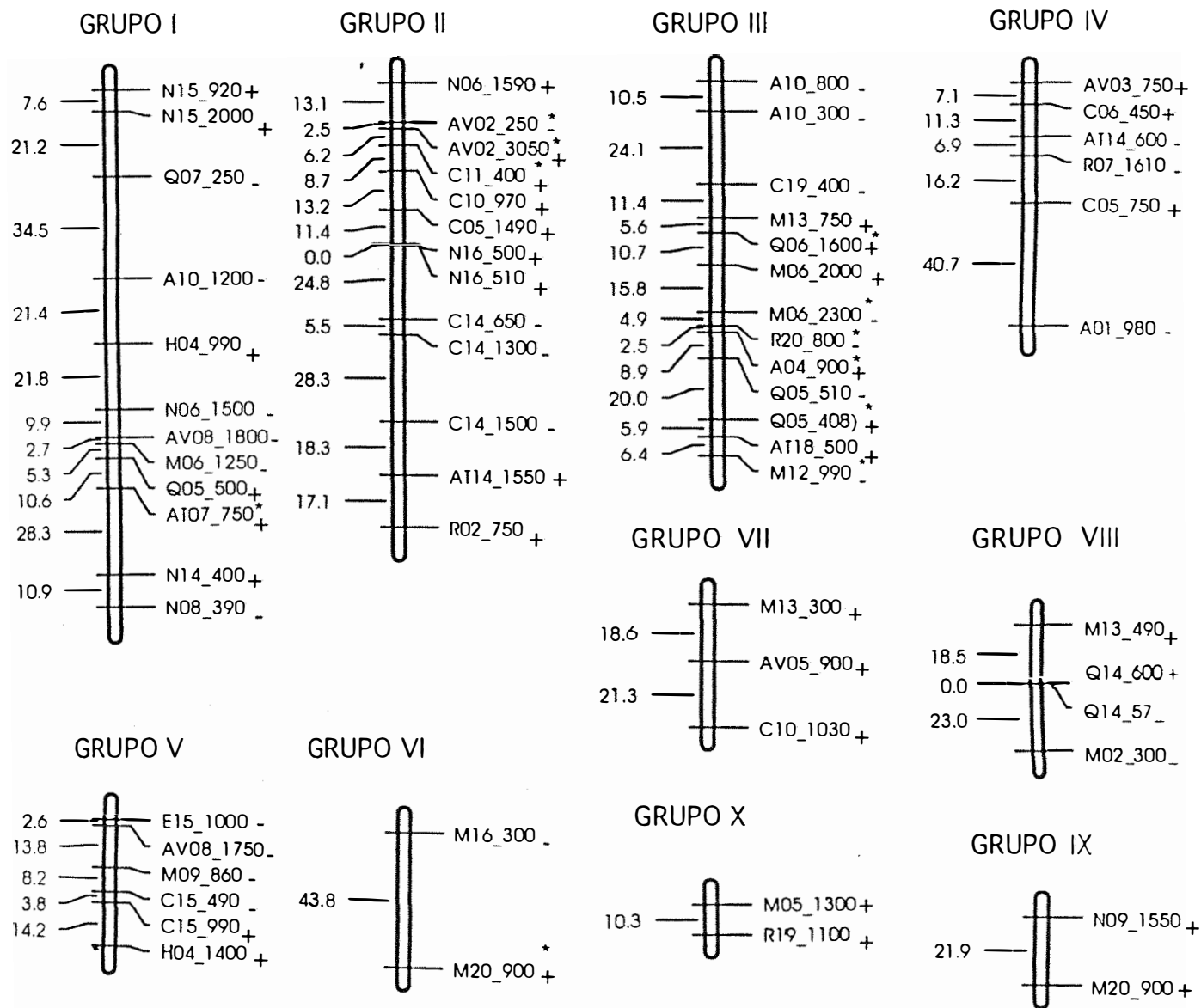


Figura 6. Mapa genético de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. As relações de ligação de 63 marcadores RAPD foram estabelecidas com um critério de LOD = 4,0 e um  $\theta$  máximo = 0,30. Os marcadores RAPD estão indicados pelo código do “primer” da Operon, tamanho do fragmento e fase de ligação (+ ou -). Os locos mostrando distorção significativa da taxa de segregação esperada (1:1) estão indicados com um asterisco. Os números à esquerda dos mapas indicam as distâncias em centimorgans (cM).

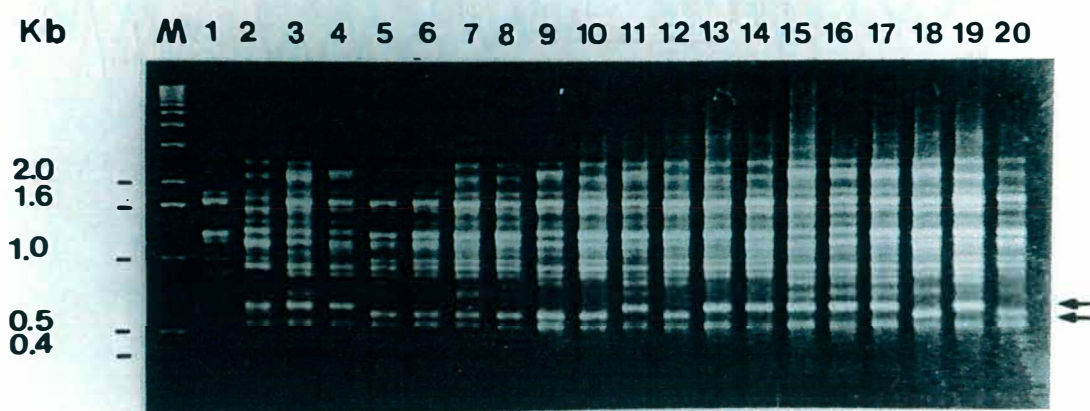


Figura 7. Amplificação do DNA de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux (coluna 2) , *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. (coluna 3) e plantas da progênie F1 com o “primer” OPQ14. As setas indicam dois marcadores (OPQ14\_600/570) provenientes de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e ligados em repulsão.

#### 4.4. Mapeamento de QTL para resistência ao CTV.

Oitenta plantas híbridas foram inoculadas com isolado severo do vírus da tristeza do cultivar ‘Barão B’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] através de dupla enxertia com borbulhas contaminadas (item 3.10 de Material e Métodos) (Figura 8). Em 11 plantas não houve pegamento das borbulhas utilizadas como fonte de inóculo. Assim sendo, foram avaliadas 69 plantas híbridas e os 2 parentais com 3 repetições de cada uma. O resultado encontra-se resumido na Tabela 8. Na primeira avaliação, realizada após 30 dias, 24 plantas apresentavam o vírus em pelo menos uma das três repetições. Na avaliação realizada após 90 dias da enxertia, 28 plantas apresentavam o vírus em pelo menos uma das repetições. A segregação na população foi aquela esperada para um gene simples dominante (Tabela 8). Nenhuma planta apresentou sintomas típicos de tristeza pois foram utilizadas uma variedade tolerante (*Citrus sunki*) e uma imune (*Poncirus trifoliata*).

A inoculação por enxertia é considerada uma forma severa de infecção pois a planta receptora está sob contínua exposição ao vírus que está sendo gerado no tecido utilizado como fonte de inóculo (GONSALVES & GARNSEY, 1989). Entretanto, se este tecido doador for deixado nas plantas a serem testadas garantirá a transmissão do vírus e reduzirá o tempo necessário para avaliar o grau de resistência (ESPINOSA, 1995).

As plantas nas quais o vírus pôde ser detectado aos 30 dias após a enxertia continuaram apresentando resposta positiva na análise de “Western blot” em pelo menos uma das três repetições. Duas repetições de cada análise foram realizadas para cada época de avaliação.

A análise aos 90 dias após a enxertia foi realizada de tecido diferenciado na primavera, quando a multiplicação do vírus é mais intensa acompanhando o desenvolvimento vegetativo das plantas. Verificou-se que outras plantas, anteriormente negativas, apresentaram resposta positiva para a presença do vírus. A avaliação realizada no período de inverno influenciou a resposta, pois apesar do experimento ter sido conduzido em casa de vegetação, observou-se que as plantas da progênie, assim como o *Poncirus trifoliata* cv. Rubidoux perderam grande parte de suas folhas nesta época. A perda de folhas sob condições de baixas temperaturas é uma característica dos trifoliatas que entram em dormência nas épocas de temperaturas mais baixas, diminuindo seu metabolismo e perdendo suas folhas. Por apresentarem esta característica os trifoliatas são utilizados como porta-enxertos em regiões de temperaturas mais amenas e sujeitas à geada (DAVIES & ALBRIGO, 1994).

A proteína do capsídeo do vírus da tristeza dos citros (CTV) foi detectada nas plantas através de “Western blot” (Figura 9) e “DIBA” (Figura 10). Somente híbridos com resultados positivos nos dois tipos de análises foram classificados como plantas que multiplicavam o vírus.

A Figura 9 mostra os resultados das análises de algumas repetições das 69 plantas avaliadas. As amostras foram incubadas com anticorpo policlonal BR-1006 (BAPTISTA *et al.*, 1996). Das 69 plantas avaliadas, 28 mostraram resultado positivo, isto é, presença do vírus na planta em pelo menos uma das três repetições. A avaliação após 90 dias confirmou a multiplicação do vírus nestas plantas.

A análise de “immunoblotting” das plantas infectadas com CTV demonstrou a ocorrência de três bandas (Figura 9), típicas da proteína do capsídeo do CTV.

Trabalhos de caracterização das proteínas do capsídeo do CTV de cinco isolados da Flórida foram realizados por LEE & CALVERT (1987) e LEE *et al.* (1988). Nestes trabalhos foram detectados dois peptídeos de 23 e 21 KDa, chamados CP1 e CP2 (coat protein), respectivamente, presentes em uma concentração de 5:1 (CP1:CP2). Já em preparações de proteínas do capsídeo do CTV de isolados encontrados na Espanha e Israel foram observados dois peptídeos de 27-28 e 26 KDa para CP1 e CP2, respectivamente (DULIEU & BAR-JOSEPH, 1990; GUERRI *et al.*, 1990).

De acordo com SEKIYA *et al.* (1991) estas bandas correspondem a CP intacta, CP1 e CP2 de  $M_r$  de 25 KDa, 24 KDa e 21 KDa, respectivamente, sendo as 25 KDa CP e 21 KDa CP2 mais pronunciadas que a CP1. Os autores sugerem que as CP1 e CP2 se originaram como produtos específicos da hidrólise da CP intacta, provavelmente por proteólise pós-tradução. Mais especificamente, eles estabeleceram que a CP1 é o resultado de uma clivagem específica da CP intacta entre 11 e 15 aminoácidos do amino-terminal, e CP2 é o resultado da hidrólise da CP intacta no aminoácido 26.

As três bandas (26 KDa CP, 25 KDa CP1 e 24 KDa CP2) são visíveis nos controles ('Pera Rio' e 'Pera IAC', colunas 1 e 2, respectivamente), na tangerina 'Sunki' (coluna 5 da Figura 9) e em alguns híbridos, somente uma banda foi detectada, no presente trabalho. Uma vez que dois produtos são formados da degradação da CP por enzimas proteolíticas, pode-se especular que estas proteases, tanto hospedeiro específicas, como sugeriu PAPPU *et al.* (1994), ou vírus específicas, estão presentes em quantidades muito pequenas para produzir proteólise ou mesmo, não existem em certas plantas. Outra possibilidade a ser considerada é a de que pode haver pouca quantidade de CP em certas plantas quando comparadas com o controle e, desta forma, mesmo que as proteases estejam

presentes degradando a CP, uma quantidade muito pequena dos produtos de degradação serão formados, impedindo que estes sejam detectados.

A Tabela 8 apresenta o “Western Blot” da avaliação para CTV na progênie do cruzamento entre ‘Sunki’ e ‘Rubidoux’, 90 dias após a inoculação do vírus.

Tabela 8. Avaliação para resistência ao CTV, 90 dias após a inoculação, na progênie F1 utilizando “Western Blot”.

	Freq. Observada	Freq. Esperada	$\frac{(o - e)^2}{e}$
Plantas que não multiplicaram o vírus	41	34,5	1,224
Plantas que multiplicaram o vírus	28	34,5	1,224
			$\chi^2 = 2,448$

Como o valor encontrado para o teste de homogeneidade de  $\chi^2 = 2,448$  é menor que o valor tabelado  $\chi^2 = 3,84$  ( $\alpha = 0,05$  e GL = 1), a hipótese nula ( $H_0 =$  segregação 1:1) não é rejeitada. Assim sendo, a frequência observada corresponde a segregação Mendeliana monogênica. Este resultado está de acordo com os resultados encontrados por YOSHIDA (1985, 1993) que relatou que a resistência ao CTV em *Poncirus trifoliata* era controlada por um único alelo dominante.

A transferência da imunidade ao CTV da primeira geração de híbridos tais como Citrumelo 80-9 e citrange ‘Carrizo’ para uma segunda geração em cruzamentos com hospedeiros suscetíveis ao CTV (proporção 1:1) sugere que o fator imunidade pode ser



manipulado e mantido em programas de melhoramento de *Citrus* envolvendo sucessivas gerações de cruzamentos (GARNSEY *et al.*, 1987).

Resultados com ELISA também confirmam que a segregação para imunidade ao CTV ocorre na primeira geração de híbridos de trifoliata. As diferenças nas reações ao CTV nos citranges foram qualitativas e não quantitativas. Desta forma, citranges suscetíveis ao CTV, como ‘Rusk’, apresentam um título de vírus comparável com o de laranja doce e não valores intermediários (GARNSEY *et al.*, 1987). Neste mesmo trabalho, GARNSEY *et al.* (1987) verificaram resultados negativos para infecção com CTV em cultivares de *Poncirus trifoliata* tais como: ‘English Large Flowered’, ‘Flying Dragon’, ‘Large Flower’, ‘Kryder’, ‘Pomeroy’, ‘Ronse’ e ‘Yamaguchi’.



Figura 8. Enxertia de borbulhas de híbridos de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv Rubidoux e *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. (A) e borbulhas de laranja doce cv 'Barão B' contaminadas com isolado severo de CTV (B) em porta-enxerto limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck).



Figura 9. Análise de “Western blot” utilizando proteína extraída da nervura principal de folhas de uma progênie F1 do cruzamento de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux. Colunas 1 e 2 controles positivos (laranjas ‘Pera IAC’ e ‘Pera Rio’, respectivamente), colunas 3 e 4 controles negativos (limão ‘Galego’ e laranja ‘Pera IAC’ microenxertada, respectivamente); 5 tangerina ‘Sunki’ e 6 ‘Rubidoux’. As outras colunas representam amostras de plantas da progênie F1. Três colunas (isto é, 7,8,9; 10,11,12; 13,14,15 e 16, 17, 18) representam as amostras de três repetições de cada uma das plantas híbridas. A análise foi realizada utilizando o anticorpo policlonal BR-1006 (diluição 1:10.000).

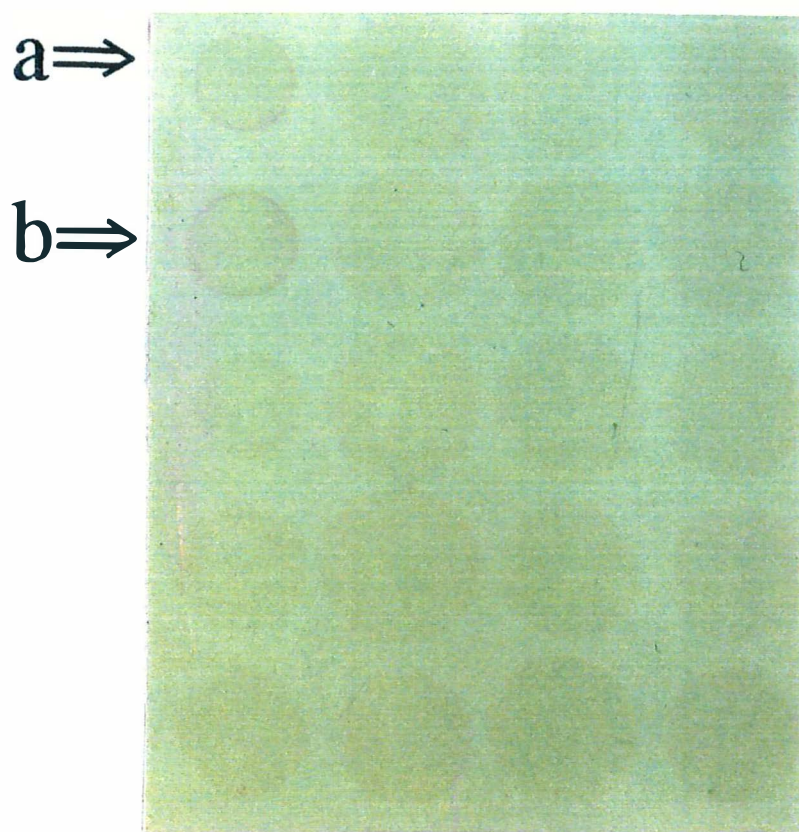


Figura 10. Análise “DIBA” utilizando proteína extraída da nervura principal de folhas de uma progênie F1 do cruzamento de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux e *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. (a) Controle positivo (laranja ‘Pera IAC’) e (b) amostra da progênie positiva para CTV. A análise foi realizada utilizando o anticorpo policlonal BR-1006 (diluição 1:10.000).

#### 4.5. “Bulked segregant analysis” para o gene de resistência ao CTV

A triagem de 78 “primers” decâmeros de sequência arbitrária com “bulks” de DNA de plantas que multiplicam o vírus da tristeza (“bulk”+) e plantas que não o multiplicam (“bulk”-) identificou 10 “primers” (Tabela 9) que produziram fragmentos polimórficos entre os dois “bulks”.

Tabela 9. Co-segregação de 10 marcadores RAPD e resistência ao CTV na população de mapeamento.

Marcador RAPD	Fenótipos para CTV e RAPD				r	LOD score
	R/+	S/+	R/-	S/-		
E16_510	9	17	26	9	0,29	1,87
AV11_1430	9	16	29	13	0,32	1,41
AT07_400	8	15	27	9	0,32	1,93
E20_510	4	10	13	6	0,30	0,76
E07_820	22	9	14	18	0,36	1,22
N08_2750	24	11	11	15	0,36	1,26
A04_480	23	7	14	23	0,31	2,36
N15_1630	16	2	6	11	0,22	2,75
M05_380	25	9	10	16	0,31	2,07
AV12_470	32	6	7	24	0,18	6,69

R = resistente baseado em “Western Blot”; S= suscetível baseado em “Western Blot”;

+ = presença de fragmento; - = ausência de fragmento

r = frequência de recombinação (número de indivíduos recombinates/número total de indivíduos).

A ligação foi confirmada com a análise de segregação dos marcadores e o gene de resistência ao CTV na progênie e a construção do mapa de ligação de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux (Figura 5) no qual os marcadores e o gene se encontram no grupo de ligação I. Se forem considerados todos os 208 “primers” avaliados para a construção dos mapas de ligação, a porcentagem de “primers” que detectaram polimorfismo entre os “bulks” foi de 4,8%.

GMITTER Jr. *et al.* (1996) encontraram 39 (12,18%) “primers” entre os 320 avaliados que apresentaram polimorfismo entre “bulks” contrastantes para imunidade ao vírus da tristeza em citros. Dos 39 fragmentos, somente 4 (1,25%) estavam presentes no “bulk” resistente e ausentes no “bulk” suscetível de todas as quatro famílias estudadas, implicando que eram possivelmente marcadores universais ligados ao CTV. Estes marcadores foram OPB11\_700, OPF06\_750, OPO16\_650 e OPW18\_450.

No presente trabalho, o “primer” OPW18 foi testado e não foi observada diferença entre os “bulks”, assim como, não houve segregação do marcador OPW18\_450 na progênie indicando que o cultivar ‘Rubidoux’ é homozigoto para este marcador.

Ao mesmo tempo em que os “primers” selecionados eram utilizados para a reações de PCR na população de mapeamento, também eram incluídos os “bulks” + e - (Figuras 11 e 12). Desta forma, realizou-se a seleção de marcadores ligados ao gene de resistência ao CTV.

No presente trabalho, foram utilizados “bulks” com 7 e 14 indivíduos. Com os “bulks” constituídos de 7 indivíduos, 10 “primers” mostraram polimorfismo entre os “bulks” contrastantes. Com os “bulks” constituídos de 14 indivíduos nenhum “primer” produziu polimorfismo nítido entre os dois “bulks” contrastantes para a presença ou

ausência do vírus da tristeza nas plantas. As bandas polimórficas identificadas com a utilização de “bulks” com 7 indivíduos, puderam ser identificadas como bandas com diferentes intensidades nos “bulks” com 14 indivíduos. A capacidade de detectar polimorfismos entre os “bulks” vai depender da distância que o marcador se encontra do gene, pois quanto maior a distância entre eles, maior é a probabilidade de ocorrer recombinação entre os locos. Então, no “bulk” (+) poderá haver indivíduos que multiplicam o vírus e apresentam o fragmento de DNA correspondente ao marcador. Neste caso, o polimorfismo entre os “bulks” não poderá ser detectado. Quando o número de indivíduos recombinantes é pequeno no “bulk” (+) é possível detectar a diferença entre os “bulks” através de diferentes intensidades das bandas nos dois “bulks”. Um exemplo da detecção de diferentes intensidades das bandas polimórficas entre os dois “bulks” é apresentado na Figura 13, onde a banda correspondente ao marcador OPE16\_510, ligado em repulsão ao gene de resistência ao CTV, aparece mais intensa no “bulk” (+). No caso de marcadores ligados em fase de repulsão (-) como indicado no mapa de *Poncirus trifoliata* cv. Rubidoux (exemplo, marcador OPE16\_510, Figura 13), a banda polimórfica vai aparecer em ‘Rubidoux’ e no “bulk” (+) (que multiplica o vírus). Exemplos de marcadores que estão ligados em repulsão são: OPA11\_1430, OPE16\_510, OPE20\_510 e OPAT07\_400 (Figura 5).

Embora a literatura cite que intervalos ou “janelas genéticas” para a detecção na diferença de bandas podem estar entre 15 a 25 cM, muitos marcadores em uma “janela” de 30 % de recombinação poderão ser detectados, pelo menos como intensidade desigual (MICHELMORE *et al.*, 1991). Foi possível, no presente trabalho, verificar polimorfismo entre “bulks” com quase todos os marcadores do grupo de ligação I onde foi localizado o



gene Ctv, quando foram utilizados sete indivíduos por “bulk” . A utilização de “bulks” com um número maior de indivíduos ou mais de um “bulk” com diferentes indivíduos em sua composição possibilita encontrar marcadores mais próximos ao gene de interesse (WILLIAMS *et al.*, 1993). GMITTER Jr. *et al.* (1996) encontraram marcadores universais para o gene de resistência ao vírus da tristeza dos citros utilizando “bulks” com 12 indivíduos.

O presente trabalho deverá ter continuidade com a avaliação de novos “primers” em “bulks” com 14 indivíduos, visando encontrar marcadores mais próximos ao gene Ctv.



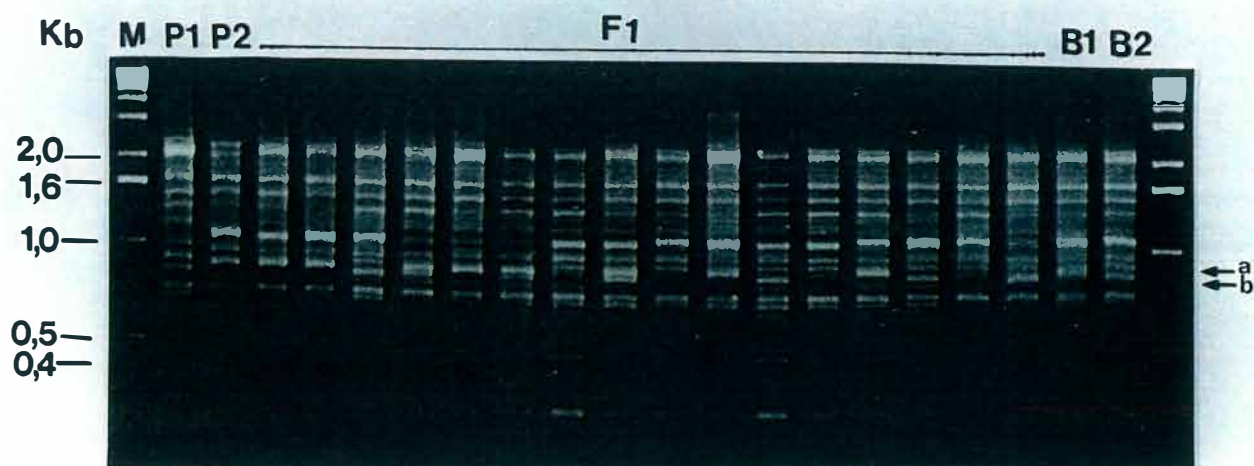


Figura 11. Amplificação do DNA de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux (P1), *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. (P2) e plantas da progênie F1, B1 (“bulk” de plantas que multiplicaram o vírus da tristeza) e B2 (“bulk” de plantas que não multiplicaram o vírus da tristeza). As setas a e b indicam bandas polimórficas que estão segregando na população. A seta b indica um marcador (OPE07\_820) que está presente no “bulk” B2 e ausente no “bulk” B1.

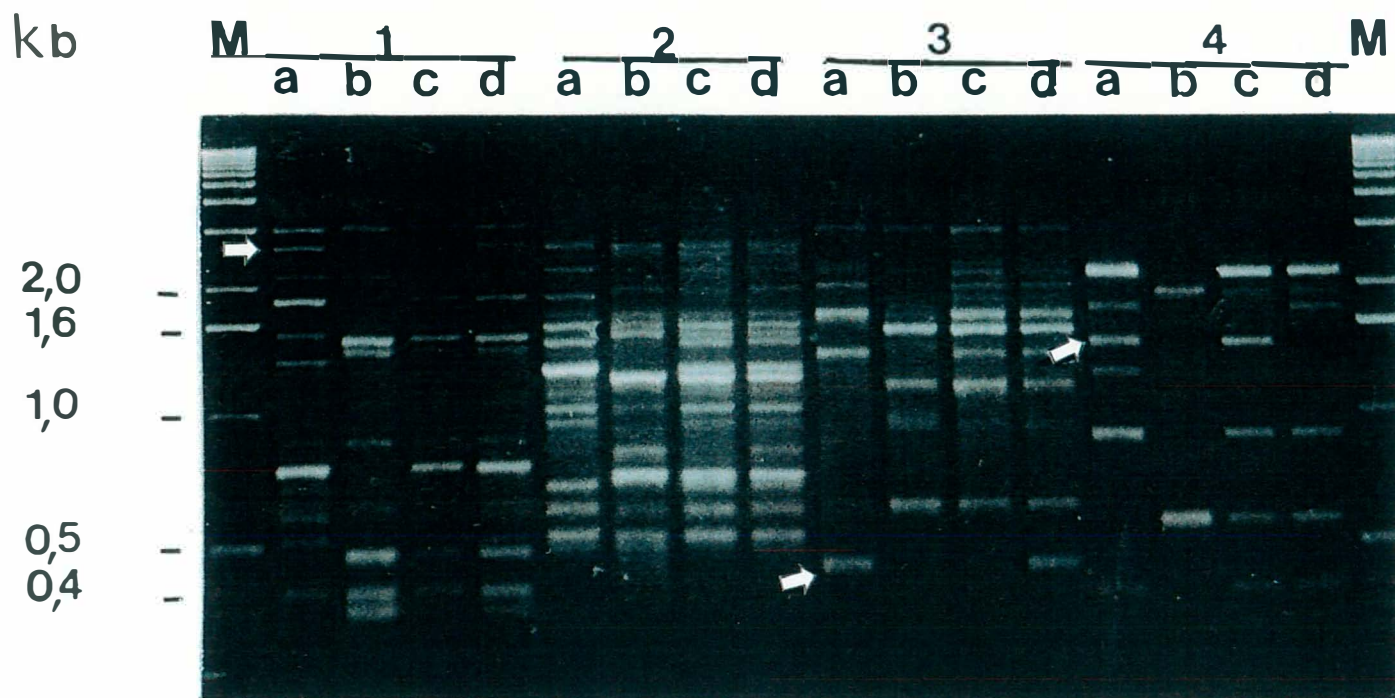


Figura 12 . Amplificação de DNA de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf cv. Rubidoux (a) , *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. (b), “bulk”(+) (c) e “bulk”(-) (d). As setas indicam os marcadores associados ao gene de resistência ao vírus da tristeza dos citros. A seta 1 indica o marcador OPN08\_2750, a seta 3 indica o marcador OPAV12\_470 e a seta 4 indica o marcador OPAV11\_1430 ligado em repulsão ao gene de resistência a tristeza dos citros. M= marcador de peso molecular (1-Kb Ladder).

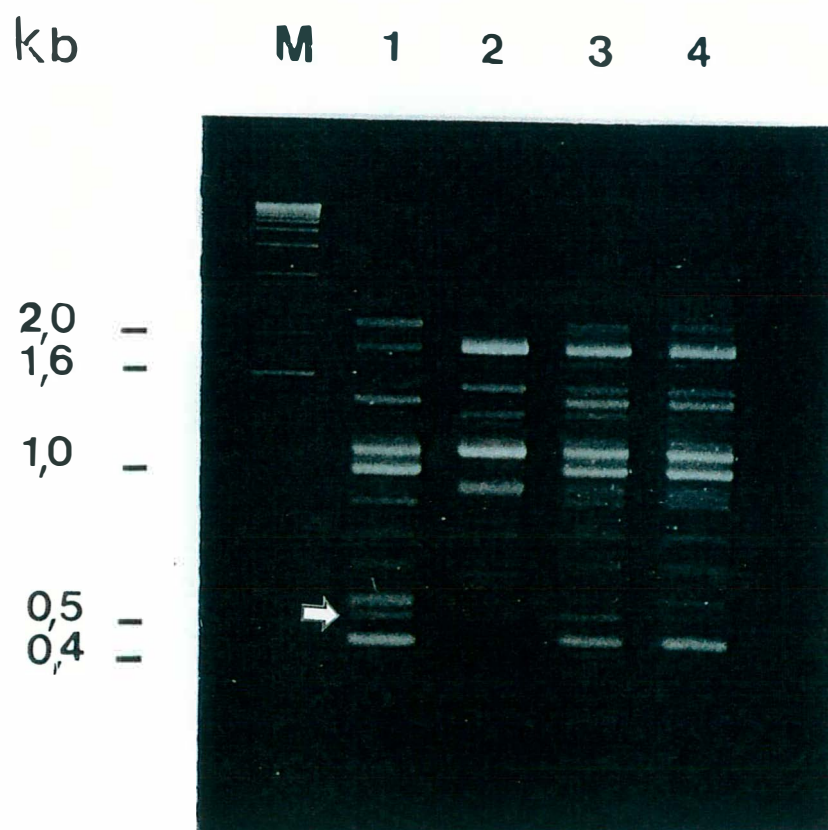


Figura 13. Padrões de amplificação de DNA de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux (1), *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. (2), “bulk”(+) (3) e “bulk”(-) (4). A seta indica o marcador OPE16\_510 ligado em repulsão ao gene de resistência ao CTV. M = marcador de peso molecular (1-Kb Ladder).

#### 4.6. Análise de ligação e mapeamento do gene de resistência ao CTV

Por se tratar de uma característica qualitativa como comprovado pelo teste de homogeneidade para segregação monogênica (Tabela 8), os resultados da avaliação para resistência ao CTV foram tabulados como caracteres binários sendo (1) para multiplicação do vírus e (2) para plantas que não multiplicavam o vírus. A análise foi realizada como descrito no item 3.9.2. (Material e Métodos).

O gene de resistência a tristeza e todos os marcadores a ele associados foram localizados no grupo de ligação I do mapa de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux (Figura 5), corroborando a hipótese de controle monogênico. Resultado semelhante foi encontrado por GMITTER Jr. *et al.* (1996). No mapa construído por CAI *et al.* (1994) o marcador OPA04\_480 foi encontrado no Grupo I. No presente trabalho este marcador também foi encontrado no Grupo de ligação denominado grupo I. Além disso, ROOSE *et al.* (1996) trabalhando com progênies descendentes de *Poncirus trifoliata* encontraram o marcador OPE16\_510 ligado em repulsão ao gene de resistência ao vírus da tristeza dos citros. No presente trabalho, o marcador OPE16\_510 também foi encontrado ligado em repulsão ao gene de resistência ao CTV (Figuras 5 e 13). Devido ao fato dos três trabalhos terem utilizado estratégias de mapeamento diferentes, podem ser encontrados diferentes marcadores nos grupos de ligação, uma vez que, em uma progênie do tipo BC1F1 os grupos podem conter marcadores de ambos os progenitores. No caso de uma progênie F1, como a do presente trabalho, os grupos de ligação serão formados somente com marcadores pertencentes a um único progenitor, a não ser que haja um marcador comum aos parentais. Por esta razão, são construídos dois mapas de ligação, um para cada parental. No entanto, existe homologia entre os grupos de ligação onde o gene de resistência ao CTV foi localizado no presente trabalho e nos trabalhos de GMITTER Jr. *et al.* (1996) e ROOSE *et*

al. (1996). Assim sendo, existe grande probabilidade destes grupos serem o mesmo grupo de ligação.

#### 4.7. Marcadores ligados ao gene de resistência ao CTV em cultivares e híbridos de *Poncirus trifoliata*

A Tabela 10 resume os resultados encontrados quando “primers”, que detectaram marcadores ligados ao gene de resistência a tristeza dos Citros (Ctv) em trifoliata ‘Rubidoux’, foram utilizados em reações com outros cultivares e híbridos de *Poncirus trifoliata*.

Tabela 10. Marcadores ligados ao gene de resistência ao CTV em diferentes cultivares e híbridos de *Poncirus trifoliata*.

Marcadores	Trifoliata ‘Flying Dragon’ CN 718 (CTV-)	Citrange ‘Carrizo’ CV 387 (CTV+)	Citrange ‘Rusk’ CV 398 (CTV+)	Citrândarin ‘Cleopatra’ x ‘Rubidoux’ CN 713 (CTV+)	Citrândarin ‘Sunki’ x ‘English Large’ VEL 1519 (CTV+)	Trifoliata ‘Davis A’ VEL 848 (CTV-)	Trifoliata ‘Kryder 15-3’ VEL 1703 (CTV-)
OPAO4_480	+	-	-	-	-	-	+
OPN08_2750	+	+	+	-	+	+	+
OPAV12_470	+	+	-	-	-	+	+
OPAV11_1430	-	-	+	+	-	-	-
OPE16_510	-	-	+	+	+	+	-
OPAT07_400	-	-	+	+	-	+	-
OPN15_1630	+	+	+	-	-	+	+

+ = presença da banda

- = ausência da banda

CN = clone novo

CV = clone velho

VEL = velho

CTV- = resultado negativo para a presença do vírus da tristeza com base em “Western blot”

CTV+ = resultado positivo para a presença do vírus da tristeza com base em “Western blot”.

O marcador OPA04\_480 (Figura 14) está presente em ‘Flying Dragon’ e ‘Kryder’ e ausente em ‘Carrizo’, ‘Rusk’, ‘Cleopatra’ x ‘Rubidoux’ e ‘Davis A’. Por estar mais distante do gene *Ctv* uma recombinação entre o marcador OPA04\_480 e o gene pode ter ocorrido em um dos clones que deram origem aos híbridos ou pode ter ocorrido uma mutação que alterou o sítio do “primer”.

O marcador OPN08\_2750 (Figura 14) está presente em todos com exceção de ‘Cleopatra’ x ‘Rubidoux’ também devido sua distância a ocorrência de recombinação é mais provável.

O marcador OPAV12\_470 (Figura 14) está ligado em associação ao gene de resistência a tristeza nos cultivares ‘Flying Dragon’, ‘Carrizo’, ‘Davis A’ e ‘Kryder’ e ausente em ‘Rusk’, ‘Cleopatra’ x ‘Rubidoux’ e ‘Sunki’ x ‘English Large’. Este marcador é o que se encontra mais próximo ao gene de resistência a tristeza, no presente trabalho. É, provavelmente, o marcador que vai apresentar respostas mais coerentes com a presença ou ausência do gene, entretanto esta distância ainda é grande permitindo aproximadamente 17,8% de recombinação. A análise “Western Blot” revelou que os citrandarins ‘Sunki’ x ‘English Large’ e ‘Cleopatra’ x ‘Rubidoux’ apresentavam o vírus da tristeza assim como os citranges ‘Carrizo’ e ‘Rusk’. Os cultivares de *Poncirus trifoliata* analisados (‘Flying Dragon’, ‘Kryder 15-3’ e ‘Davis A’) não apresentavam o vírus. Os cidrandarins provavelmente não irão desenvolver sintomas mas podem multiplicar o vírus da tristeza pois as tangerinas, em geral, apresentam alta tolerância a tristeza dos citros (MÜLLER & COSTA, 1991).

Para os marcadores mapeados mais distantes do gene *Ctv* como OPAV11\_1430, OPE16\_510, OPAT07\_400 (Figura 15), a probabilidade de ocorrer

recombinação entre estes marcadores e o gene é maior. Estes marcadores estão ligados em repulsão ao gene *Ctv* em 'Rubidoux'.

Os trifoliatas "Flying Dragon" e "Kryder 15-3" por não apresentarem resposta positiva à presença do vírus da tristeza na análise "Western Blot" devem possuir o gene que confere imunidade ao CTV. Não foi possível saber se o gene está em homozigose ou heterozigose nos dois trifoliatas pois não foram obtidas progênies a partir desses cultivares que possibilitariam estudar a segregação do gene. Entretanto, no trabalho realizado por GMITTER Jr. *et al.* (1996) em uma progênie em que se utilizou o trifoliata "Kryder" como um dos progenitores, foi possível constatar que o gene não segregou na população e, portanto, o trifoliata "Kryder" é homozigoto para este gene.

HERRERO *et al.* (1996) descrevem a possível origem do trifoliata 'Flying Dragon' por auto-fecundação o que explicaria o aparecimento de vários locos em homozigose.

A existência de dois marcadores flanqueando o gene de resistência aumenta a probabilidade de se estar selecionando corretamente. Assim sendo, no presente trabalho, a distância do marcador OPN15\_1630 foi de 23,1 cM, ou seja, a probabilidade de ocorrer uma recombinação é de aproximadamente 23,1% ; para o outro marcador mais próximo ao gene *Ctv*, isto é, o marcador OPAV12\_470 (Figura 12), ligado a 17,8 cM, a probabilidade de ocorrer uma recombinação é de aproximadamente 17,8%. Quando os dois marcadores são utilizados ao mesmo tempo, a probabilidade de ocorrer recombinação dupla entre os três locos é de aproximadamente 4,20% ( $0,23 \times 0,18$ ), ou seja, bem menor do que quando se considera apenas um loco marcador. É evidente que locos mais próximos irão fornecer maior segurança ao processo de seleção. Este trabalho deve ter continuidade para seleção de

outros “primers” visando localizar marcadores mais próximos ao gene de resistência ao vírus da tristeza dos citros.

Considerando os marcadores OPAV12\_470 e OPN15\_1630, que estão mais próximos ao gene Ctv, pode ser observada grande coerência na co-segregação destes marcadores e o gene nos resultados obtidos, com exceção dos citrangs ‘Carrizo’ e ‘Rusk’ (Tabela 10) que apresentaram o vírus e possuem pelo menos um destes marcadores.

Um resultado não esperado foi observado no presente trabalho. Apesar de GARNSEY *et al.* (1987) terem relatado que ensaios utilizando ELISA não detectaram o vírus da tristeza no citrange ‘Carrizo’ e de GMITTER Jr *et al.* (1996) terem encontrado marcadores universais para o gene de resistência ao CTV no citrange ‘Carrizo’, no presente trabalho, o vírus foi detectado neste citrange. Uma análise com o marcador universal OPW18\_450, localizado a uma distância aproximada de 3,2 cM do gene Ctv (GMITTER Jr. *et al.*, 1996), revelou que o citrange ‘Carrizo’ (CV 387) do banco de germoplasma do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC também possui este marcador (Figura 16). A seleção de plantas resistentes ao CTV, com base somente neste marcador, não será precisa.

Uma hipótese para explicar o fato de ter sido observada a multiplicação do vírus da tristeza no citrange ‘Carrizo’ CV 387, poderia ser a de que estes citrangs não sejam o mesmo clone. Recombinações podem ter ocorrido entre os marcadores e o gene Ctv no clone que deu origem ao citrange ‘Carrizo’ CV 387, de forma que este citrange não apresenta imunidade ao CTV.

Como as plantas foram introduzidas através de sementes é possível que o embrião zigótico tenha se desenvolvido, tenha sido considerado um embrião nucelar e mantido como um clone do citrange ‘Carrizo’ proveniente dos Estados Unidos. Neste caso, estudos comparando os dois genomas seriam indicados.



As frequências de recombinação dos marcadores encontrados no trabalho de GMITTER Jr. *et al.* (1996) foram diferentes entre as famílias estudadas. Frequências de recombinações variáveis em diferentes “backgrounds” genéticos têm sido relatadas entre indivíduos dentro da mesma família (FATMI *et al.*, 1993). Frequências de recombinações variáveis (e segregações distorcidas) aumentam a importância de serem utilizadas várias famílias para identificar marcadores ligados a um gene por BSA, especialmente, se este marcador for utilizado em programas de melhoramento visando à seleção assistida por marcadores moleculares (GMITTER Jr *et al.*, 1996).

Dois marcadores OPA04\_480 (Figuras 5 e 14) e OPE16\_510 (Figuras 5 e 13) presentes no grupo de ligação I, no presente trabalho, foram também encontrados nos grupos de ligação em que foram localizados o gene de resistência ao vírus da tristeza nos mapas construídos por CAI *et al.* (1994) e por ROOSE *et al.* (1996), respectivamente, revelando assim homologia entre o grupo de ligação I nos três mapas desenvolvidos independentemente.

Um mapa consenso foi estabelecido por GMITTER Jr. *et al.* (1996) na região em que foram mapeados o gene de resistência a tristeza (Ctv) e oito marcadores ligados a ele, em mapas construídos com a progênie do cruzamento de ‘Thong Dee’ (*Citrus grandis* L.) x (‘Thong Dee’ x *Poncirus trifoliata* cv. Pomeroy) e dados acumulados de híbridos provenientes de quatro outras famílias. A comparação dos mapas revelou que embora as distâncias de mapa variassem, a ordem dos marcadores e o gene Ctv foi idêntica nos dois mapas. DURHAM *et al.* (1992) trabalhando com híbridos de duas famílias ( *Citrus reticulata* Blanco cv ‘Clementina’) x (*Citrus paradisi* Macf cv ‘Duncan’ x *Citrus reticulata* Blanco cv ‘Clementina’) e *Citrus grandis* (L.) Osb. cv. ‘Thong Dee’ x [*Poncirus trifoliata* cv. (L.) Raf. cv. Pomeroy x *Citrus grandis*] observaram que a ordem dos locos RFLP e

isoenzimáticos apresentava-se altamente conservada nos dois mapas. Isto é encorajador pois as informações obtidas em diferentes projetos de mapeamento podem ser reunidas e correlacionadas visando conhecer melhor as regiões que codificam características de importância agrônômica. O progressivo acúmulo de informações de mapas individuais, com um subconjunto de marcadores em comum, tornará claras as relações de ligação nos diferentes mapas. Isto levará a um mapa unificado onde regiões associadas com a expressão da característica poderão ser identificadas (GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994).

O potencial do germoplasma atualmente existente no Brasil e a necessidade de ampliação da base genética utilizada permitem inferir que com o auxílio de métodos de seleção precoce, como marcadores moleculares, um grande impulso deverá ser dado ao melhoramento via hibridação sexual. Os Bancos Ativos de Germoplasma existentes no Brasil e em outros países apresentam altíssima variabilidade com centenas de variedades e clones, que se não podem ser aproveitados diretamente em plantios comerciais, devem ser melhor avaliados e aproveitados para os trabalhos de melhoramento dos citros (MACHADO *et al.*, 1996a).

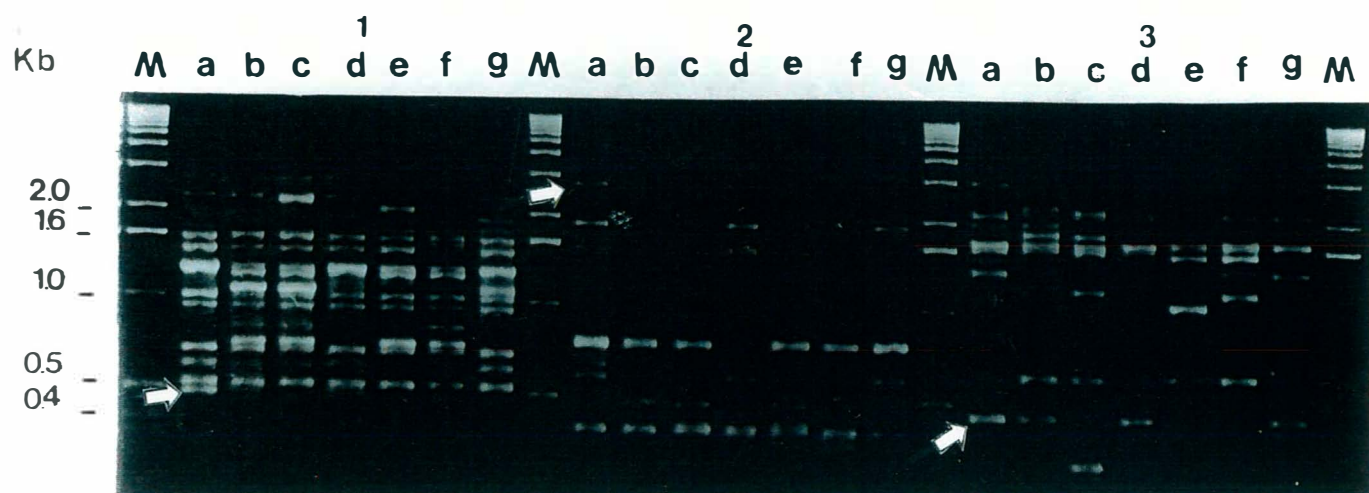


Figura 14. Padrões de amplificação do DNA de cultivares e híbridos de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (1) marcador OPA04\_480, (2) marcador OPN08\_2750 e (3) marcador OPAV12\_470. (a) 'Flying Dragon', (b) 'Carrizo', (c) 'Rusk', (d) 'Kryder', (e) 'Cleopatra' x 'Rubidoux', (f) 'Sunki' x 'English Large' e (g) 'Davis a'. M = marcador de peso molecular (1-Kb Ladder).

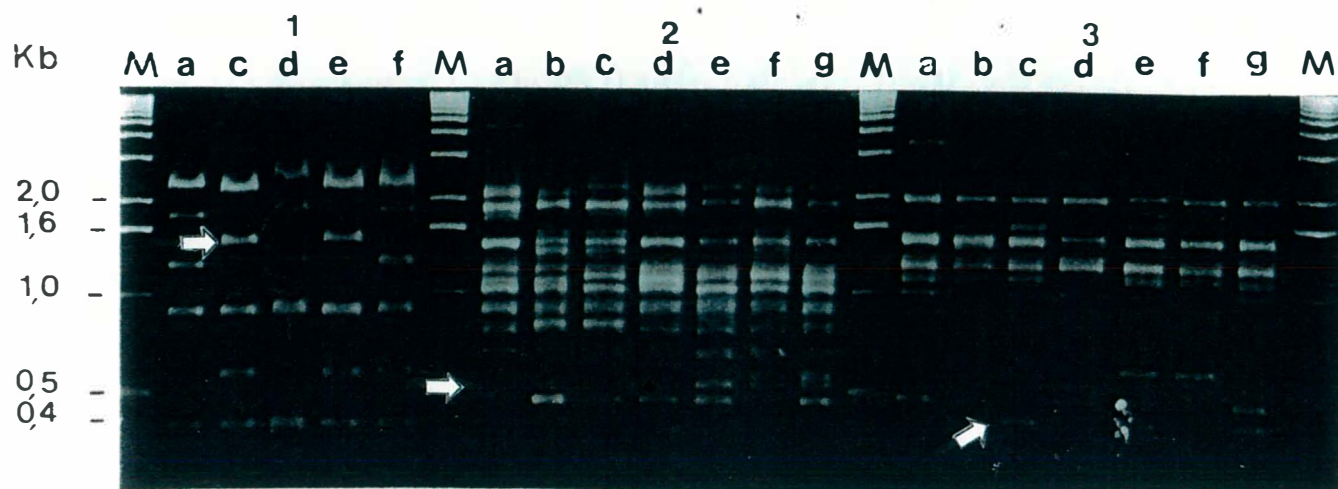


Figura 15. Padrões de amplificação do DNA de cultivares e híbridos de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (1) marcador OPAV11\_1430, (2) marcador OPE16\_510 e (3) marcador OPAT07\_400. (a) 'Flying Dragon', (b) 'Carrizo', (c) 'Rusk', (d) 'Kryder', (e) 'Cleopatra' x 'Rubidoux', (f) 'Sunki' x 'English Large' e (g) 'Davis a'. M = marcador de peso molecular (1-Kb Ladder).

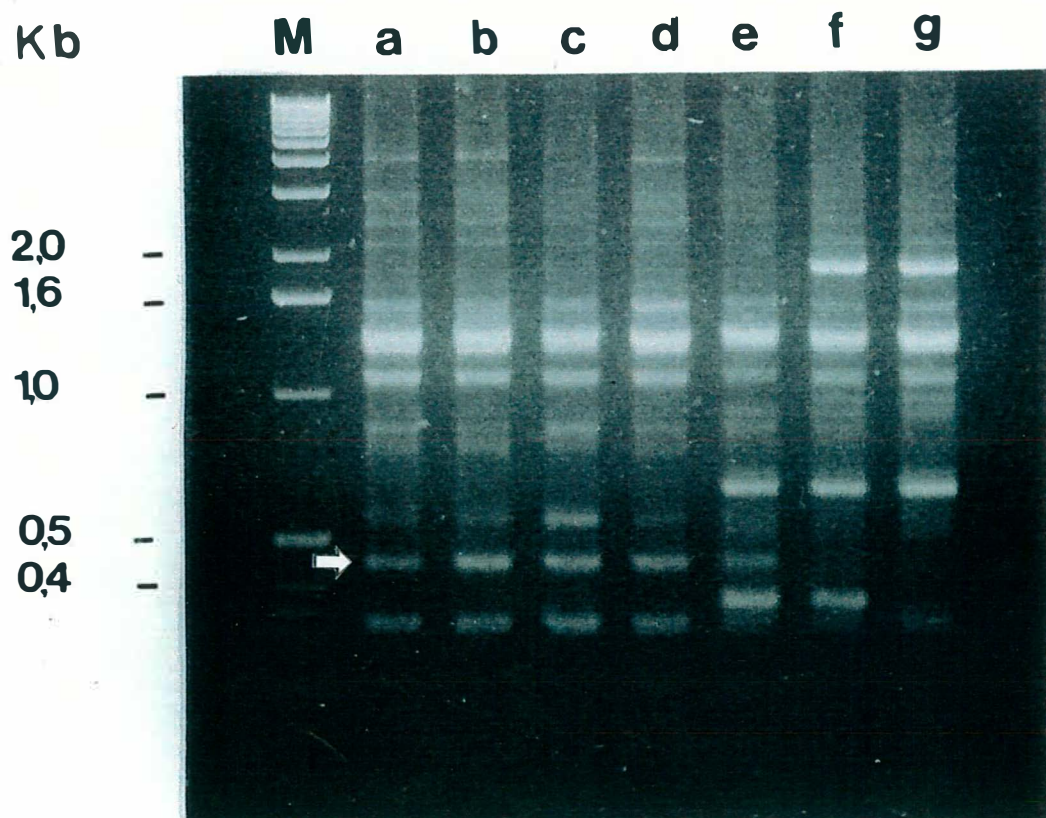


Figura 16. Padrões de amplificação do DNA de cultivares e híbridos de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. com o “primer” OPW18. (a) ‘Rubidoux’, (b) ‘Kryder 15-3’, (c) ‘Davis A’, (d) ‘Flying Dragon’, (e) citrange ‘Carrizo’, (f) citrange ‘Rusk’ e (g) citrandarin ‘Cleopatra’ x ‘Rubidoux’. A seta indica marcador OPW18\_450. M = marcador de peso molecular.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições em que foi realizado o presente trabalho permitem as seguintes conclusões:

(a) O emprego da técnica RAPD possibilitou a identificação de embriões zigóticos e nucelares em progênies com grande número de indivíduos em curto espaço de tempo;

(b) Foram obtidos 314 novos híbridos F1 do cruzamento entre *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux, 17 híbridos do cruzamento entre laranja ‘Caipira’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e laranja ‘Azeda’ (*Citrus aurantium* L.) e 8 híbridos do cruzamento entre laranja ‘Caipira’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck);

(c) Noventa e nove por cento das plantas obtidas no cruzamento entre *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux foram zigóticas e a análise das sementes de frutos da planta de tangerina ‘Sunki’ utilizada nos cruzamentos revelou a existência de apenas um embrião por semente, sugerindo que esta planta é monoembriônica;

(d) A utilização da estratégia “pseudo-testcross” e marcadores RAPD se mostrou eficiente para a construção dos mapas de ligação de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux;

(e) Os genomas de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux e *Citrus sunki* apresentam graus de heterozigosidade similares, pois foram detectados 82 marcadores provenientes de ‘Rubidoux’ e 86 de ‘Sunki’;

(f) Foram encontrados dois marcadores (OPA04\_480 e OPE16\_510) presentes no grupo de ligação I do mapa de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux, no presente trabalho, e presentes também nos mapas estabelecidos para a região do gene de resistência ao CTV por CAI *et al.* (1994), GMITTER *et al.* (1996) e ROOSE *et al.* (1996), indicando que existe homologia entre os grupos de ligação nos mapas desenvolvidos independentemente e que as informações obtidas em diferentes projetos de mapeamento podem ser reunidas;

(g) A herança do gene de resistência ao vírus da tristeza é controlada por um loco de grande efeito que foi localizado no grupo de ligação I do mapa de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux;

(h) Foi possível classificar a maioria das plantas da progênie utilizada para a construção dos mapas de ligação como plantas que multiplicavam o vírus e plantas que não o multiplicavam através da infecção com borbulhas contaminadas e avaliações com “Western Blot” e “DIBA”;

(i) Os melhores resultados para a avaliação de CTV foram obtidos no período da primavera, quando a multiplicação do vírus é mais intensa acompanhando o desenvolvimento vegetativo das plantas;

(j) O citrange ‘Carrizo’ (CV-387) do banco de germoplasma do Centro Citricultura Sylvio Moreira/IAC não é imune ao CTV, pois as análises com “Western blot” e “DIBA” detectaram a presença do vírus da tristeza na planta;

(k) Marcadores ligados ao gene Ctv detectados por BSA foram mapeados a distâncias que permitem altas frequências de recombinação entre estes o gene Ctv. Entretanto, os marcadores OPN15\_1630 e OPAV12\_470, localizados a uma distância de 23,0 cM (LODscore = 2,75) e 17,8 cM (LODscore = 6,69), respectivamente, encontram-se flanqueando o gene e a utilização conjunta dos dois marcadores pode ser aplicada em ensaios visando à seleção indireta. Evidentemente, locos mais próximos irão fornecer maior



segurança ao processo de seleção. Este trabalho deve ter continuidade com a seleção de outros “primers” visando localizar marcadores mais próximos ao gene de resistência ao vírus da tristeza dos citros;

(1) A correlação entre a capacidade de multiplicação *in vitro* e o enraizamento de estacas *in vivo* de 100 plantas da progênie do cruzamento entre *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux e *Citrus sunki* foi baixa ( $R = 0,04467$ ).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM-BLONDON, A I.; SEVIGNAC, M.; BANNEROT, H.; DRON, M. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (*Are*) conferring resistance to anthracnose in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 88: 865-870, 1994.
- AGARWAL, P.K. Cytogenetical investigations in Rutaceae I. Meiotic studies in four *Citrus* species of hybrid origin. **Cytologia**, 52: 753-756, 1987.
- AGARWAL, P.K. Cytogenetical investigations in Rutaceae. V. Cytomorphology of three intergeneric hybrids of *Citrus* and *Poncirus*. **Cytologia**, 54:705-8, 1989.
- AGARWAL, P.K. Cytomorphology of nine species of *Citrus*. VII. International Citrus Congress, Acireale, Italy, March 8-13, 1992.
- AL-JANABI, S. M.; HONEYCUTT, R.J.; McCLELLAND, M.; SOBRAL, B.W.S. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. "SES 208". **Genetics**, 134: 1249-1260, 1993.
- ANDERSON, C.M.; CASTLE, W.S.; MOORE, G.A. Isozymic identification of zygotic seedlings in Swingle citrumelo *Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata* nursery and field populations. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, 116 (2): 322-326, 1991.

- BAIRD, E.; COOPER - BLAND, S.; WAUGH, R.; DEMAINE, M.; POWEL, W. Molecular characterization of inter - and - intra - specific somatic hybrids of potato using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Molecular General Genetics** , 233: 469-475, 1992.
- BAPTISTA, C. R.; VEGA, J., STACH-MACHADO, D.R., TARGON, M.L.P.N., MACHADO, M. A . Método simplificado de purificação do vírus da tristeza dos citros e obtenção de anti-soro de alta especificidade. **Summa Phytopathologica**, in press.
- BAR-JOSEPH, M.; MARCUS, R.; LEE, R. F. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. **Annual Review of Phytopathology**, 27: 291-316, 1989.
- BARRETT, H.C. & HUTCHISON, D.J. Occurrence of a spontaneous octoploid in apomitic seedlings of a tetraploid citrus hybrid. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, 29-30, Japan, 1981.
- BARRETT, H.C. & RHODES, A.M. A numerical study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. **Systematic botany**, 1:105-36, 1976.
- BASTIANEL, M. Técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) na identificação de híbridos e nucleares de tangerinas e na caracterização de germoplasma de citros. Relatório de estágio curricular. Agosto, 1995.
- BERETTA, M.J.G.; ROSSETTI, V.; TEIXEIRA, A.R.R.; SEMPIONATO, O. Aplicação dos testes diagnósticos para declínio em plantas cítricas submetidas à transmissão por enxertia de aproximação de raízes. **Revista Laranja**, (2): 347-359, 1989.
- BOAVENTURA, Y.M.S. & PIO, R.M. Análise citogenética em três cultivares de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. **Revista Brasileira de Genética**, (1291):117-26, 1989.
- BOWAMAN, K.; GMITTER JR., F.G. & HU, X.. Relationships of seed size and shape with polyembryony and the zygotic or nucellar origin of *Citrus* spp. seedlings. **HortScience**, 30(6):1279-82, 1995.

- CAI, Q.; GUY, C.L.; MOORE, G.A. Extension of the linkage map in *Citrus* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. **Theoretical and Applied Genetics**, 89:606-14, 1994.
- CAI-QINYIN, GUY-C.L.; MOORE, G. A ; CAI-QY. Detection of cytosine methylation and mapping of a gene influencing cytosine methylation in the genome of *Citrus*. **Genome**, 39 (2): 235-242, 1996.
- CAMERON, J. W. & SOOST, R.K. Sexual and nucellar embryony in F1 hybrids and advanced crosses of *Citrus* with *Poncirus*. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, 104 (3): 408-10, 1979.
- CAMERON, J.W. & FROST, H.B. Genetics, breeding, and nucellar embryony. In W. REUTHER, & L.D. BATCHELOR & H.J. WEBBER (eds). **The Citrus Industry**. Vol. II - University of California, pp. 325-70, 1968.
- CARLSON, J.E.; TULSIERAM, L.K.; GALUBITZ, J.C.; LUK, V.W.K; KAUFFELDT, C. & RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. **Theoretical and Applied Genetics**, 83:194-200, 1991.
- CHAPARRO, J.X.; WERNER, D.J.; O'MALLEY, D.M.; SEDEROFF, R. Targeted mapping and linkage analysis of morphological , isozyme and RAPD markers in peach. **Theoretical and Applied Genetics**, 87: 805-815, 1994.
- CHUNWONGSE, J.; BUNN, T. B.; CROSSMAN, C.; JIANG, T.; TANKSLEY, S.D. Chromosomal localization and molecular - marker tagging of the powdery mildew resistance gene (Lv) in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, 89: 76-79, 1994.
- COOPER, C.; CHAPOT, H. Fruit production with special emphasis on fruit processing. In: *Citrus Science and Tecnology*, vol.2, p.1-27. Ed. S. NAGY, P.E. SHOW, M.K. VELDHUIS. The Avi Publishing Company Inc. West Point, Connecticut, 1977.

- CRISTOFANI, M.; TARGON, M.L.P.N.; COLLETA FILHO, H. D.; MACHADO, M. A .  
Identification of zygotic and nucellar embryos of polyembryonic varieties of citrus  
using RAPD markers. **Brazilian Journal of Genetics**, 19 (3): 231, 1996. Abstract.
- CROW, J.F. Mapping functions. **Genetics**, 125: 669-671, 1990.
- DAVIES, F. & ALBRIGO, L.G. Taxonomy, cultivars and breeding. In: GMITTER Jr., F.  
G.; GROSSER, J.W. & MOORE, G. A (Eds). Citrus. Wallingford: Cab International,  
1994.
- DAVIS, T.M.; YU, H.; HAIGIS, K.M.; McGWAN, P.J. Template mixing: a method of  
enhancing detection and interpretation of codominant RAPD markers. **Theoretical and  
Applied Genetics**, 91: 582-588, 1995.
- DEVOS, K.M. & GALE, M.D. The use of random amplified polymorphic DNA markers in  
wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, 84: 567-572, 1992.
- DICE, L.R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, 26:  
297-302, 1945.
- DRAUGROIS, J.H. ; GRIVET, L.; ROQUES, P.; HOARAU, J.Y.; LOMBARD, H.;  
GLAZMANN, J.C.; D'HONT, A . A putative major gene for rust resistance linked  
with a RFLP marker in sugarcane cultivar 'R570'. **Theoretical and Applied  
Genetics**, 92: 1059-1064, 1996.
- DULIEU, P & BAR-JOSEPH, M. *In vitro* translation of the citrus tristeza coat protein from  
a 0,8 Kp double-stranded RNA segment. **Journal of General Virology**, 71: 443-447,  
1990.
- DURHAM, R & KORBAN, S.S. Evidence of gene introgression in apple using RAPD  
markers. **Euphytica**, 79: 109-114, 1994.
- DURHAM, R.E. Mapping genes involved in freezing tolerance in a backcross of *Citrus* and  
*Poncirus* using a linkage map of isozymes and restriction fragment length  
polymorphisms. PhD Dissertation - University of Florida. 1990.

- DURHAM, R.E.; LIOU, P. C.; GMITTER JR., F.G.; MOORE, G.A. Linkage of restriction fragment length polymorphism and isozymes in *Citrus*. **Theoretical and Applied Genetics**, 84: 39-48. 1992.
- ELISEEV, V.A. & GVASALIYA, G.B. Effect of temperature on the course of meiosis in forms of Yuzu orange. *Nauchno Tekhnichskii Byulleten. Vsesoyuznogo Ordena Lenina i Ordena Drusbhy Narodov Nauchno-Issledovatel skogo Instituta Rasteniievodstva Imeni N.I. Vavilova n.º 178*, 33-7, VIR, Leningrad, USSR. Abstract. 1988.
- ESPINOSA, M.A G. Production of transgenic citrus plants expressing the citrus tristeza virus coat protein gene. Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy. University of Florida, 1995.
- FAO Production Yearbook. Rome, v. 48, 1994.
- FATMI, A ; PONELEIT, C. G.; PFEIFFER, T. W. Variability of recombination frequencies in the Iowa Stiff Stalk Synthetic (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 86: 859-866, 1993.
- FEICHTENBERGER, E. Doenças induzidas por fungos do gênero *Phytophthora* em citros e seu controle. **Revista Laranja**, (2): 359-379, 1989.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. EMBRAPA-CENARGEN. Brasília. pp-220, 1995.
- FROST, H.B. & SOOST, R.K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D., ed. **The Citrus Industry**. Berkeley, Univ. Calif. Press, v.2, p.290-324. 1968.
- FROST, H.B. Genetics and Breeding. In: E.J. Webber & L.D. Batchelor (eds.). **The Citrus Industry**, Berkeley, University of California , p.817-913. 1943.
- FROST, H.B. Polyembryony, heterozygosis and chimeras in citrus. **Hilgardia**, 1(16): 365-402, 1926.

FROST, H.B. The genetics and cytology of citrus. **Current Science**, p. 24-27, 1938.

GARNSEY, S.M. & CAMBRA, M. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens. In: Roistacher, C.N. (ed). Graft-transmissible diseases of citrus- Handbook for detection and diagnosis. International Organization of Citrus Virologists, FAO, Rome, 1991.

GARNSEY, S.M.; BARRETT, H.C. & HUTCHINSON, D.J. Identification of citrus tristeza virus resistance in citrus relatives and its potential application. **Phytophylactica**, 19:187-91, 1987.

GMITTER Jr., F.G.; XIAO, S.Y.; HUANG, S.; HU, X.L.; GARNSEY, S.M. & DENG, Z. A localized linkage map of the citrus virus resistance gene region. **Theoretical and Applied Genetics**, 92: 688-695, 1996.

GONSALVES, D. & GARNSEY, S.M. Cross-protection techniques for control of plant virus diseases in tropics. **Plant Disease**, 73 : 592-597, 1989.

GRATTAPAGLIA, D. & SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, 137: 1121-37, 1994.

GREEN, R. M.; VARDI, A; GALUN, E. The plastome of *Citrus*. Physical map, variation among *Citrus* cultivars and species and comparison with related genera. **Theoretical and Applied Genetics**, 72: 170-177, 1986.

GROSSER, J.W. & GMITTER Jr., F.G. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germoplasm enhancement and cultivar development. **HortScience**, Alexandria, 25: 147-51. 1990.

GUERRI, J.; MORENO, P.; LEE, R.F. Identification of citrus tristeza virus strains by peptide maps of virion coat protein. **Phytopathology**, 80: 692-698, 1990.

HALDANE, J. The combination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linked factors. **Journal of Genetics**, 8: 299-309, 1919.

- HANDA, T., ISHIZAWA, Y. & OOGAKI, C. Phylogenetic study of fraction I protein in the genus *Citrus* and its close related genera. **Japan Journal of Genetics**, 61: 15-24. 1986.
- HARTL, L.; WEISS, H.; STEPHAN, U.; ZELLER, F.J; JAHOR, A . Molecular identification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 90: 601-606, 1995.
- HEARN, C.J. Citrus scion improvement program. **Fruit Varieties Journal**, 39 : 34 - 37, 1985.
- HEARN, C.J.; GARNSEY, M. G.; BARRETT, H.C. Transmission of citrus tristeza virus resistance from citrus breeding line US119. **HortScience**, 28(5):483, 1993
- HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; SCHAEFER, A; NIENHUIS, J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphism. **Theoretical and Applied Genetic**, 72: 761-769, 1986.
- HELENTJARIS, T.; WEBER, D.; WRIGHT, S. Identification of the genomic locations of duplicate nucleotide sequences in maize by analysis of restriction fragment length polymorphisms. **Genetics**, 118: 353-363, 1988.
- HEMMAT, M.; WEEDEN, N.F.; MANGANARIS, A.G. & D.M. LAWSON. Molecular marker linkage map for apple. **Journal of Heredity**, 85:4-11, 1994.
- HERRERO, R.; ASINS, M.J.; CARBONELL, E.A. & NAVARRO, L. Genetic diversity in the orange subfamily *Aurantioideae*. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. **Theoretical and Applied Genetics**, 92:599-609, 1996.
- HODGSON, R.W. Horticultural varieties of *Citrus*. In: W. Reuther & L.D. Batchelor & H.J. Webber (eds.). **The Citrus Industry**, Berkeley, University of California, pp. 431-591. 1967.



- HORMAZA, J.I.; DOLLO, L.; POLITO, V.S. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, 89 (1): 9-13, 1994.
- HUTCHINSON, D.J. Rootstock development screening and selection for disease tolerance and horticultural characteristics. **Fruit Varieties Journal**, 39: 21-25, 1985.
- IGLESIAS, L.; LIMA, H.; SIMON, J.P. (1974). Isozyme identification of zygotic and nucellar seedlings . I n: *Citrus Journal of Heredity*, Washington, v. 65, p . 81-84, 1974.
- IWAMASA, M. & IWASARI, I. On the sterility phenome non caused by low temperatures in the Mexican lime (*C. aurantifolia*). **Bul. Hort. Div. TSKAI - Kunki Agr. Expt. Sta.**, 2:37-41, 1963.
- IWAMASA, M. & NITO, N. Cytogenetics and the evolution of modern cultivated citrus. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, 1: 265-75, 1988.
- IWAMASA, M. Studies of the sterility in genus *Citrus* with special reference of seedlessness. *Bulletim of Horticultural Research Station Japan. Ser B.* 6: 1-77, 1966.
- JARREL, D.C.; ROOSE, M.L.; TRAUGH, S.N. & KUPPER, R.S. A genetic map of citrus based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross. **Theoretical and Applied Genetics**, 84:49-56. 1992.
- JOHNSON, E.; MIKLAS, P.N.; STAVEY, J.R.; MARTINEZ-CRUZADO, J.C. Coupling and repulsion phase RAPD for marker-assisted selection of PI 181996 rust resistance in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 90: 659-664, 1995.
- KOSAMBI, D.D. The estimation of map distance from recombination values. **Ann Eugen.**, 12: 172-175, 1944.
- LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M.J.; E.E. LINCOLN & NEWBURG, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, 1:174-81. 1987.

- LANDRY, B.S.; HUBERT, N.; CRETE, R.; CHANG, M.S.; ETOH, T. A genetic map for *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes of race 2 of *Plasmodiophora brassicae* (Woronin). **Genome**, 35: 409-420, 1992.
- LANDRY, B.S.; KESSELI, R. V.; LEUNG, H.; MICHELMORE, R.W. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphisms, isozymes, disease resistance, and morphological markers. **Genetics**, 116: 331-337, 1987.
- LEE, R. F.; CALVERT, L. A.; NAGEL, J.; HUBBARD, J.D. Citrus tristeza virus: characterization of coat proteins. **Phytopathology**, 78: 1221-1226, 1988.
- LEE, R.; BERETTA, M. J.; DERRICK, K. Clorose variegada dos citros: uma nova e destrutiva doença dos citros no Brasil. **Revista Laranja**, (2): 365-381, 1991.
- LEE, R.F. & CALVERT, L.A. Polypeptide mapping of citrus tristeza virus strains. **Phytophylactica**, 19: 205-210, 1987.
- LEE, R.F.; BAKER, P.S.; ROCHA-PEÑA. The citrus tristeza virus (CTV). International Institute of Biological Control. CAB International, 1994, 197p.
- LEYSER, H.M.O.; LINCOLN, C.A.; TIMPTE, C.; LAMMBER, D.; TURNER, J.; ESTELLE, M. Arabidopsis auxin-resistance gene AXR 4 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. **Nature**, 364: 161-164, 1993.
- LIU, P. C. A molecular study of the citrus genome through restriction fragment length polymorphism and isozyme mapping. PhD Dissertation - University of Florida, 1990.
- LIU, B.H. & KNAPP, S.J. GMENDEL, a program for Mendelian segregation and linkage analysis of individual or multiple progeny populations using log-likelihood ratios. **Journal of Heredity**, 8: 407, 1992.
- LURO, F., LAIGRET, F. & BOVE, J.M. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to *Citrus* genetic and taxonomy. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, 1992.

- LURO, F.; LORIEUX, M.; BOVE, J.M. & OLLIBRAULT, P. Genetic Mapping of an Intergeneric *Citrus* Hybrid using Molecular Markers. **Fruits**, 49:5-6, 1994.
- MACHADO, M. A; TARGON, M.L.N.; CRISTOFANI, M.; COLETTA FILHO, H.D. Melhoria de citros e o uso de marcadores moleculares. In: TORRES, A C. & CALDAS, L.S. (Eds). Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA - CNPH, 1996a (em impressão).
- MACHADO, M. A; COLETTA FILHO, H. D.; TARGON, M.L.P.N.; POMPEU Jr., J. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica**, 92: 321-326, 1996b.
- MAISONNEUVE, B.; BELLEC, Y.; ANDERSON, P.; MICHELMORE, R.W. Rapid mapping of two genes for resistance to downy mildew from *Lactuca serriola* to existing clusters of resistance genes. **Theoretical and Applied Genetics**, 89: 96-104, 1994.
- MARTIN, G.B.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CHUNWONGSE, J.; FRARY, A.; GANAL, M.W.; SPIVEY, R.; WU, T.; EARLY, E.D.; TANKSLEY, S.D. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science**, 262: 1432-1436, 1993.
- MATSUYAMA, T.; MOTOHASHI, R.; AKIHAMA, T.; OMURA, M. DNA fingerprinting in *Citrus* cultivars. **Japanese Journal of Breeding**, 42: 155-159, 1992.
- McCLEAN, A.P.D. The Tristeza virus complex. Proc. 6<sup>th</sup> Conf. Int. Org. Vitrus Virologists, pp 59-66, Univ. Calif. Richmond, CA. 1974.
- MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGNON, R.; BALLVE, R.M.L. & W.J. SIQUEIRA. Genetic Proof of the occurrence of mono and dizygotic Hybrid Twins in *Citrus* rootstocks. **Revista Brasileira de Genética**, 16(3):703-11, 1993.

- MEDINA-FILHO, H.P.; BORDIGNON, R.; BALLVÉ, R.M.L. & SIQUEIRA, W.J. Sunkifolia: Sexual hybrids of *Citrus sunki* x *Severinia buxifolia*. VII International Citrus Congress - Italy, p.4, 1992.
- MESSEGUER, R.; VIRUEL, M.A; de VICENTE, M. C.; GARCIA-MAS, J.; FERNANDEZ - BUSQUETS, X.; VARGAS, F.; PUIGDOMENECH, P.P.; ARUS, P. Construction of a genetic map with molecular markers in almond. Plant Genome II: 2nd Int. Conf. Plant Genome, January 24-27, San Diego, California, Conference Program and Abstracts Guide, p 51. 1994.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN, I. & KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88:9828-32, 1991.
- MONTENEGRO, H.W.S. Curso Avançado de Citricultura. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Piracicaba, 241 p., 1958.
- MOORE, G. A & CASTLE, W.S. Morphological and isozymic analysis open - pollinated *Citrus* rootstock population. **Journal of Heredity**, (79): 59-63, 1988.
- MOORE, G.A. In vitro propagation of citrus rootstocks. **HortScience**, Alexandria, 21(2): 300-1, 1986.
- MOORE, J.N. & JANICK, J. (EDS), Methods in fruit breeding. Purdue University Press, West Lafayette, Indiana, 1983.
- MOREIRA, C. & MOREIRA, S. História da Citricultura no Brasil. In: O. RODRIGUEZ, F. VIÉGAS, J. POMPEU JR.; A.S. AMARO (ed). Citricultura Brasileira. Campinas, SP, Fundação Cargill, 1991. p. 1-22.

- MOREIRA, C.S. & PIO, R.M. Melhoramento de Citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU Jr.; AMARO, A.S. 2.<sup>a</sup> ed. Campinas, SP, Fundação Cargill, p.116-52.1991.
- MOREIRA, S. & GURGEL, J.T.A. A fertilidade do pólen e número de sementes, em espécies e formas do gênero *Citrus*. **Bragantia**, 1: 669-711, 1941.
- MOTOHASHI, R.; MATSUYAMA, T.; OKIHAMA, T. & OMURA, M. DNA fingerprinting in citrus cultivars. **Proceedings of the Internacional Society of Citriculture**, 221-4, 1992.
- MUDGE, J.; ANDERSEN, W.R.; KEHER, R.L.; FAIRBANKS, D.J. A RAPD genetic map of *Saccharum officinarum*. **Crop Science**, 36: 1362-1366, 1996.
- MÜLLER, G.W. & COSTA, A.S. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: O. RODRIGUEZ, F. VIÉGAS, J. POMPEU JR.; A.S. AMARO (ed). Citricultura Brasileira. campinas, SP, Fundação Cargill, 1991. p. 735-763.
- MÜLLER, G.W. & COSTA, A.S. Doenças causadas por virus, viróides e similares em citros. Ed. Rosseti V, Müller GW, Costa AS. Fundação Cargill, Campinas - SP. pp 55-84. 1993.
- MURASHIGE, T. & TUCKER, D.P.H. Growth factor requirements of citrus tissue culture. In: International Citrus Symposium, 1, Riverside, V3, p. 1155-66. 1969.
- MURRAY, M.G. & THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, 8:4321-4325, 1980.
- NAKAMURA, M. Cytological and ecological studies on the genus *Citrus* with special reference to the occurrence of sterile pollen grains. **Mem. Fac. Sci. Agr. Taihoku Univ.**, 27:53-159, 1943.

- NELSON, C.D.; NANCE, W.L.; DOUDRICK, R.L. A partial genetic linkage map of slash pine (*Pinus elliotti* engelm. var. *elliottii*) based on random amplified polymorphic DNAs. **Theoretical and Applied Genetics**, 87: 145-151, 1993.
- NEVES, E. M. **Agroanalysis**. Fundação Getúlio Vargas, 16(6): 20-24, 1996.
- OH, B.J.; FREDERIKSEN, R. A; MAGILL, C. W. Identification of molecular markers linked to head smut resistance gene (Shs) in sorghum by RFLP and RAPD analyses. **Phytopathology**, 84: 830-833, 1994.
- OLSON, E.O. Responses of lime and sour orange seedlings and four scionrootstock combinations to infections by strains of the Tristeza virus. **Phytopathology**, 48: 454-9. 1958.
- PAILLARD, M.; LASHERMES, P. & PETIARD, V. Construction of a Molecular linkage map in coffee. **Theoretical and Applied Genetics**, 93: 41-7, 1996.
- PAPU, H.R., PAPU,S.S.; LEE,R.F.; NIBLET, C.L. Identification of the antigenic determinant recognized by the cirus tristeza virus-specific monoclonal antibody 3DF1. **Phytopathology**, 84: 1105, 1994. Abstract.
- PARAN, I. & MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, 85: 985-993, 1993.
- PARAN, I.; KESSEL, R; MICHELMORE, R. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. **Genome**, 14: 1021-1027, 1991.
- PASSOS, O.S.; CUNHA SOBRINHO, A.P. DA; SOARES FILHO, W. DO S. A comparison among *Citrus aurantium* L., *Citrus paradisi* Macf. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. as pollen grain sources to obtain nucellar lines in citrus. In: International Citrus Congress 6, Tel Aviv. Proceedings, 1988. p. 257-265.

- PENNER, G.A; CHONG, J.; WIGHT, C.P., MOLNAR, S.J.; FEDAK, G. Identification of RAPD marker for the crown rust resistance gene Pc68 in oats. **Genome**, 36: 818-820, 1993.
- PIO, R.M. A utilização do trifoliata na citricultura. **Revista Laranja**, Cordeirópolis, 14(2) 581-610, 1993.
- POMPEU JR., J. **Agroanalysis**. Fundação Getúlio Vargas., 16(6): 1-4, 1996.
- POMPEU Jr., J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU Jr.; AMARO, A.S. (Eds). Citricultura Brasileira. Campinas, SP, Fundação Cargill, p.116-52.1991.
- POULSEN, D.M.E.; HENRY, R.J.; JOHNSTON, R.P.; IRWIN, J. A G.; REES, R.G. The use of bulk segregant analysis to identify a rapd marker linked to leaf rust resistance in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, 1995.
- PRATES, H.S. Poliembrionia em citros. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral - CATI, 1977. 41p.
- PRINCE, J.; POCHARD, E.; TANKSLEY, S.D. Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with with tomato. **Genome**, 36: 404-417, 1993.
- RAFALSKI, J.A & TINGEY, S.V. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPD, microsatellites and machines. **TIG.**, 9(8): 275-280.
- RAGHUVANSHI, S.S. Cytogenetical studies in genus *Citrus*. IV. Evolution in genus *Citrus*. **Cytologia**, 27: 172-88, 1962.
- RAJAPAKSE, S.; BELTHOFF, L.E.; HE, G.; ESTAGER, A.E.; SCORZA, R.; VERDE, I.; BALLARD, R.E.; BAIRD, W.V.; CALLAHAN, A.; MONET, A. & ABBOTT, A.G. Genetic linkage mapping in peach using morphological, RFLP and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 90:503-10, 1995.

- REUTHER, W. (ed). The Citrus industry. Berkeley, Univer. California Press, 1973. V3. 528 p.
- REVISTA DO FUNDECITRUS. Órgão Informativo do Fundo Paulista de Defesa da Citricultura. Número 78, setembro/outubro, 1996.
- RITTER, E.; GEBHARDT, C.; SALAMINI F. Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. **Genetics**, 125: 645-654, 1990.
- ROCHA - PEÑA, M.A ; LEE, R.F. Serological techniques for detection of citrus tristeza virus. **Journal of Virological Methods**, 34 (3): 311-331, 1991.
- ROHLF, F.J. Numerical Taxonomy and Multivariate Analyses System (version 1.70). State University of New York. 1992.
- ROOSE, M.L. Isozyme and DNA restriction fragment length polymorphism in *Citrus* breeding and systematics. VI. International Citrus Congress, Acireale, Italy, March 8-13, 1992.
- ROOSE, M.L. Isozyme and DNA restriction fragment length polymorphisms in *Citrus* breeding and systematics. **Proceedings of the International Society of Citriculture**. 1988.
- ROOSE, M.L., JARREL, D.C., KUPPER, R.S. Genetic mapping in a *Citrus x Poncirus* F2 population. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, 210-213, 1992.
- ROOSE, M.L.; CHENG, F.; FANG, D. Identification of molecular markers linked to various citrus gene using bulked segregant analysis. VIII Congress of the International Society of Citriculture, South Africa, 1996. P. 100. Abstract.
- ROOSE, M.L.; CHENG, F.S.; FEDERICI, C.T. Origin, inheritance and effects of a dwarfing gene from the citrus rootstock *Poncirus trifoliata* “ Flying Dragon” . **Hortscience**, 29: 482, 1994.



- ROSSETTI, V, NEGRI, J.D. De. Clorose Variegada dos Citros - Revisão. **Revista Laranja**, Cordeirópolis, 11(1): 1-14, 1990.
- ROWLAND, L. J. & LEVI, A. RAPD - based genetic linkage map of blueberry derived from a cross between diploid species (*Vaccinium darrowi* and *V. elliottii*). **Theoretical and Applied Genetics**, 87: 863-868, 1994.
- SABBAH, S.M.; GROSSER, J.W.; CHANDLER, J.L.; LOUZADA, E.S. The effect of growth regulators on the rooting of stem cuttings of *Citrus*, related genera and intergeneric somatic hybrids. **Proc. Fla. State Hort. Soc.**, 104: 188-191, 1991.
- SAIKI, R.K. ; GELFAND, D.H.; STOFFELS, S.; SCHARF, S. ; HIGUCHI, R.H.; HORN, G. T., MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer - directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, 239: 487-491, 1988.
- SALIBE, A.A. Importância do porta-enxerto na citricultura. V Encontro Nacional de Citricultura, Rio de Janeiro, PESAGRO-RIO, S.B.F., 14p., 1978.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York. 1989.
- SCHAFFER & SEDEROFF. **Annal. Biochem.** 115, 113-122, 1989.
- SCHNEIDER, H. The anatomy of Tristeza virus infected citrus. In: *Citrus virus diseases*. JM Wallace, ed. Division of agricultural science, University of California, pp 73-83. 1959.
- SCORA, R. W. Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated citrus. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, 1, 277-289, 1988.
- SCORA, R.W & KUMAMOTO, J. Chemotaxonomy of genus *Citrus*. In: Waterman P. G. & Grundon M.F. (eds). *Chemistry and Chemical taxonomy of the rutales*. Academic Press. London. pp. 343-351, 1983.

- SEKIYA, M. E., LAWRENCE, S.D., McCAFFEREY, M.; CLINE, K. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Journal of General Virology**, 72: 1013-1020, 1991.
- SHANNON, L.M.; FROLICH, E.F.; CAMERON, S.H. Characteristics of *Poncirus trifoliata* selections. *Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society*, 14: 108-117, 1960.
- SHIN, J.S.; CHAO, S.; CORPUZ, L.; BLAKE, T. A partial map of barley genome incorporating restriction fragment length polymorphism, polymerase chain reaction isozyme, and morphological marker loci. **Genome**, 35: 803-810, 1990.
- SHULZ, B.; WESTPHAL, L.; WRICKE, G. Linkage groups isozymes, RFLP and RAPD markers in carrot (*Dacus carota* L. sativus). **Euphytica**, 74: 67-76, 1994.
- SNEATH, P.H.A & SOKAL, R.R. Numerical Taxonomy. Freeman. San Francisco. 573 pp. 1973.
- SOARES FILHO, W. DOS S.; ARAUJO, J.E.V.; CUNHA, M.A.P. DA; CUNHA SOBRINHO, A.P. DA; PASSOS, O.S. Degree of polyembryony, size and survival of the zygotic embryo in citrus. **Proceeding of Internacional Society of Citriculture**, 1: 135-138, 1992.
- SOARES FILHO, W.S.; ARAÚJO, J.E.V.; CUNHA, M.A.P.; CUNHA SOBRINHO, A.P. & PASSOS, O.S. Variabilidade Genética em "Limão Cravo". **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, 13(3):267-72, 1991.
- SOOST, R.K. & CAMERON, J.W. 'Oroblanco', a triploid pomelo - grapefruit hybrid. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Japan, 59-60, 1981.
- SOOST, R.K. Self-incompatibility in *Citrus grandis* (L.) Osbeck. **Proceedings of American Society of Horticultural Science**, 84: 137-140, 1964.
- SPIEGEL-ROY, R.; VARDI, A. Induced mutation in *Citrus*. Proc. 6th. International Congress SABRAO: 773-775, 1989.

- STAM, P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JOINMAP. **The Plant Journal**, 3: 739-744, 1993.
- SUITER, K.A.; WENDEL, J.F.; CASE, J.S. Linkage-1: a PASCAL computer program for detection and analysis for genetic linkage. **Journal of Heredity**, 74: 203-204, 1983.
- SUZUKI, D.T.; GRIFFITHS, A.J.F. ; LEWONTIN, R.C. Introduction to genetic analysis. Freeman, San Francisco, 1981, 911p.
- SWINGLE, W.T. & REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: W. Reuther, H.J. Webber & L.D. Batchelor (eds) **The Citrus industry**, Berkeley, University of California. pp. 190-430, 1967.
- SWINGLE, W.T. The botany of *Citrus* and its Wild Relatives of the Orange Subfamily. In: E.J. Webber & L.D. Batchelor (eds). **The Citrus Industry**, Berkeley, University of California , p.129-474. 1943.
- TANAKA,T. Species problem in *Citrus*. Japanese Society for the Promotion of Science. Tokyo. 155 p., 1954.
- TANKSLEY , S.D.; GANAL, M.W.; MARTIN, G.B. Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plant species with large genomes. **Trends of Genetics**, 11: 63-68, 1995.
- TANKSLEY, S.D. Molecular markers in plant breeding. **Plant Molecular Biology Report**, 1: 3-8, 1983.
- TANKSLEY, S.D., GANAL, M. W., PRINCE, J.P. ; de VINCENTE, M. C., BONIERBALE, M.W., BROUN, P.; FULTON, T.M., GIOVANNONI, J. J., GRANDILLO, S., MARTIN, G.B.; MESSEGUER, R.; MILLER, J.C.; MILLER, L.; PATERSON, A.H., PINEDA, O.; RODER, M.S.; WING, R.A.; WU, W; YOUNG, N.D. High-density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, 132: 1141-1160, 1992.

- TANKSLEY, S.D.; MEDINA-FILHO, H. RICK, C.M. The effect of isozyme selection on metric characteres in an interespecific backcross of tomato-basis of an early screening procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, 60: 291-296, 1981.
- TANKSLEY, S.D.; YOUNG, N.D.; PATERSON, A.H.; BONIERBALE, M.W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Bio/ technology**, 7: 257-264, 1989.
- TEÓFILO SOBRINHO, J. Variedades copas e porta-enxertos para os citros. In: MENTEN, J. O M. (ed). Curso intensivo de citricultura. Piracicaba, ESALQ, Ceres. 1991, p 25-36.
- TEOFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JR., J.; CAETANO, A.A.; BARBIN, D.; DEMETRIO, C.G.B. Estudo comparativo de cinco densidades de plantio para laranja Valência enxertada em trifoliata Limeira. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 7, Florianópolis, 1984. Anais. Florianópolis, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1984. V. 2, p. 612-62.
- TEOFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JR., J.; FIGUEIREDO, J.O.; JACON, J.R. Porta-enxertos para laranjeira 'Pera', clone premunizado - resultados de 10 anos de produção. **Revista Laranja**, Cordeirópolis, SP, Brasil, 2(10): 269-281, 1989.
- TORRES, A.M. Fruit trees. In: TANKSLEY, S.D., ORTON, T.J. (eds). Isozymes in plant genetics and breeding, part 1B. Elsevier, Amsterdam, pp 401-421., 1983.
- TORRES, A.M.; SOOST, R.K.; DIEDENHOFEN, U. Leaf isozymes as genetic markers in citrus. **American Journal of Botany**, 65: 869-81. 1978.
- TORRES, A.M.; SOOST, R.K.; MAU-LASTOVICKA, R.M. Citrus isozymes: genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedlings. **Journal of Heredity**, 73:335-9. 1982.
- TORRES, A.M.; T. MAU-KASTOVKA; T.E. WILLIAMS & R.L. SOOST. Segregation distortion and linkage of *Citrus* and *Poncirus* isozyme genes. **The Journal of Heredity**, 76:289-94, 1985.

- VARDI, A . Conventional and novel approaches to citrus breeding. **Proceeding of International Society of Citriculture**, pp. 39 - 43, Italy, 1992.
- VARDI, A. & SPIEGEL-ROY, P. Gene-controlled meiosis in *Citrus reticulata*. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, p. 26-27, 1981.
- WALLACE, J.M. Tristeza and seedlings yellows. In: Indexing Procedures for 15 virus diseases of citrus tree. Agriculture Handbook n° 333, Agricultural Research Service, US. Dep. of Agriculture, p. 20-27, 1968.
- WALLACE, J.M. Virus and virus like disease. W. Reuther, C. Calavan, GE Carman, eds. **The Citrus Industry**, Berkeley , University of California. pp 67-184. 1978.
- WEEDEN, N. F. Application of isozymes in plant breeding. In: JANICK, J. (ed). Plant Breeding Reviews, 1989.
- WELSH, J.; & McCLELLAND, M. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and matrix of pairwise combinations of primers. **Nucleic Acids Research**, 19:5275-9. 1991.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18:6531-5. 1990.
- WILLIAMS, J.G.K.; REITER, R.S.; YOUNG, R.M.; SCOLNIK, P.A . Genome mapping by phenotypic pool analysis with RAPD markers. **Nucleic Acids Research**, 21: 2697-2702, 1993.
- WU, D.Y.; UGOZZOLI, L.; BIJAI, K.P.; WALLACE, R.B. Allele-specific enzymatic amplification of b-globin DNA for diagnosis of sickle cell anemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 86: 2757-2760, 1989.
- XIANG, C. & ROOSE, M.L. Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in 12 citrus rootstocks. **Science Horticultural**, (37) : 47-59, 1988.

- YANG, H. & KORBAN, S.S. Screening apples for OPD 20/600 using sequence - specific primers. **Theoretical and Applied Genetics**, 92: 263-266, 1996.
- YANG, H. Y. & KRUGER, J. Identification of RAPD marker linked to Vf gene for scab resistance in apples. **Plant Breed**, 112: 323-329, 1994.
- YOSHIDA, T. Inheritance of immunity to citrus tristeza virus of trifoliolate orange in some citrus intergeneric hybrids (em japonês com sumário em inglês). **Bulletim of Fruit Tree Research Station**, 25: 33-43, 1993.
- YOSHIDA, T. Inheritance of susceptibility to Citrus Tristeza virus in trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). **Bulletim of Fruit Tree Research Station**, 12:17-25. 1985.
- ZAMIR, D. & TADMOR, Y. Unequal segregation of nuclear genes in plants. **Botanic Gazzete**, 147: 355-358, 1986.

## **APÊNDICE**

Apêndice 1. Quadro da análise de variância do número médio de plantas por estaca de 100 híbridos do cruzamento entre *Citrus sunki* Hort. ex Tan e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux.

CV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	110	5.06389	0.0460	1.3850*
Resíduo	333	11.0682	0.0332	
Total	443	16.1321		
Média	1.0207			
CV (%)	17.8615			

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade





