

# MELHORAMENTO E BIOTECNOLOGIA

## MAPEAMENTO GENÉTICO PARA RESISTÊNCIA À CLOROSE VARIEGADA DOS CITROS

ROBERTO PEDROSO DE OLIVEIRA<sup>1</sup>, MARIÂNGELA CRISTOFANI<sup>2</sup>  
e MARCOS A. MACHADO<sup>2</sup>

### RESUMO

O mapeamento genético tem sido uma ferramenta importante no melhoramento de citros, proporcionando o entendimento da herança e a identificação de regiões genômicas relacionadas à dormência, juvenilidade, vigor, porte das plantas, acidez dos frutos, resistência ao vírus da tristeza, tolerância à salinidade e ao frio. O objetivo deste trabalho consiste em discutir as principais estratégias, os resultados e as perspectivas futuras do mapeamento genético da resistência à CVC desenvolvido pelo programa de melhoramento genético de citros do Centro APTA Citros 'Sylvio Moreira' (CAPTACSM-IAC). Uma população de 94 híbridos entre tangerina 'Cravo' (*Citrus reticulata* Blanco) e laranja 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] foi selecionada por meio de marcadores morfológicos e RAPD. Os híbridos foram multiplicados e inoculados com *Xylella fastidiosa*, utilizando-se dois métodos: enxertia de tecido contaminado e aplicação de suspensão bacteriana em

---

<sup>1</sup> Embrapa Clima Temperado, Caixa Postal 403, 96001-970 Pelotas (RS). E-mail: rpedroso@cpact.embrapa.br

<sup>2</sup> Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Caixa Postal 4, 13490-970 Cordeirópolis (SP). E-mail: marcos@centrodecitricultura.br

ferimentos. A partir de análises da segregação de marcadores RAPD na progênie, construíram-se mapas genéticos de ligação dos parentais. Os resultados são importantes para o entendimento da herança e identificação de regiões genômicas relacionadas à resistência à CVC e de outras características genéticas dos citros de importância agrônômica.

**Termos de indexação:** CVC, laranja ‘Pêra’, RAPD, tangerina ‘Cravo’, *Xylella fastidiosa*.

## SUMMARY

### GENETIC MAPPING FOR CITRUS VARIEGATED CHLOROSIS RESISTANCE

Genetic mapping has been used as an important tool in citrus breeding, allowing the understanding of the inheritance and the identification of genomic regions related to dormancy, juvenility, vigor, plant size, fruit acidity, tristeza virus resistance, salinity, and cold tolerance. The aim of this work is to discuss the main strategies, the results obtained and the future perspectives of genetic mapping for CVC resistance in the breeding program conducted at the Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” (CAPTACSM-IAC). Ninety-four hybrids between Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) and ‘Pêra’ sweet orange [*C. sinensis* (L.) Osbeck] were identified by morphological and RAPD markers. The hybrids were propagated and inoculated with *Xylella fastidiosa*, using two methodologies: grafting of infected tissue and application of bacterial suspension in injured tissue. Genetic linkage maps of the parents were constructed by RAPD markers segregation data in the hybrid progeny. The results obtained are important to the understanding of the inheritance and to the identification of genomic regions related to CVC resistance and others citrus genetic traits of agronomic importance.

**Index terms:** Rangpur lime, CVC, ‘Pêra’ sweet orange, RAPD, *Xylella fastidiosa*

## 1. INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das principais atividades agrícolas do Brasil, o maior produtor de citros, responsável por, aproximadamente, um terço da produção mundial (FAO, 1999). As exportações de suco concentrado congelado de laranja e de seus subprodutos geram uma receita anual ao País em torno de 1,5 bilhão de dólares (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, 2000). No entanto, diversas pragas e doenças vêm prejudicando a atividade citrícola, que possui características de uma monocultura no Estado de São Paulo e está baseada em um número pequeno de variedades de copa e de porta-enxerto.

A clorose variegada dos citros (CVC) é uma das principais doenças da cultura, causando prejuízos anuais da ordem de 270 milhões de dólares. Essa moléstia, descoberta em 1987, no município de Macaúbal, no Estado de São Paulo (ROSSETTI & DE NEGRI, 1990), é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* (CHANG et al., 1993; LEE et al., 1993). A bactéria, transmitida por cigarrinhas, coloniza e, conseqüentemente, promove a obstrução parcial dos vasos do xilema, comprometendo o desenvolvimento das plantas e a produção de frutos. Diversas práticas fitotécnicas, como o plantio de mudas sadias, a poda dos ramos afetados, adubação equilibrada, irrigação, controle dos vetores e das plantas daninhas hospedeiras, têm sido adotadas visando à convivência com a CVC (FUNDECITRUS, 2000).

A mais econômica forma e menos danosa ao meio ambiente de promover o controle de qualquer doença consiste na utilização de variedades resistentes. As espécies de citros apresentam grande variabilidade quanto ao nível de resistência/suscetibilidade à CVC (LI, 1997), sendo as laranjas-doces, que compõem a maioria dos plantios de citros brasileiros, as mais suscetíveis à doença. Essa conjuntura ressalta a importância do melhoramento genético dos citros, visando à obtenção de variedades com genes de resistência. Como a doença se encontra distribuída somente na América do Sul (TIMMER et al., 2000), a maioria das ações de melhoramento devem ser realizadas no País.

O melhoramento de citros é mais complexo do que o de muitas outras espécies, em razão de limitações biológicas relacionadas à eleva-

da heterozigiosidade, natureza poliembrionica, longo ciclo reprodutivo, esterilidade, incompatibilidade e depressão por endogamia (GROSSER & GMITTER JR., 1990). Além disso, no momento, não existem informações sobre a natureza e o modo de herança genética das principais características de importância agrônômica, inclusive em relação à resistência à CVC.

O mapeamento genético consiste em uma das estratégias mais eficazes para a realização de estudos avançados de genética, podendo possibilitar o entendimento da herança, a identificação e o isolamento de genes (ROOSE et al., 2000). Uma vez isolados, os genes podem ser clonados e transferidos para variedades comerciais por meio de transformação genética, superando as barreiras biológicas existentes nas espécies de citros (GMITTER JR. et al., 1996).

Este trabalho tem por objetivo discutir as principais estratégias, os resultados parciais obtidos e as perspectivas futuras do programa de melhoramento genético de citros desenvolvido no Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” (CAPTACSM-IAC), no que se refere ao mapeamento genético visando à resistência à CVC.

## **2. ESTRATÉGIAS E PROCEDIMENTOS DO MAPEAMENTO GENÉTICO**

As espécies do gênero *Citrus* reúnem características bastante favoráveis à construção de mapas genéticos. São diplóides, com pequeno número haplóide de cromossomos ( $n = 9$ ) (SOOST & CAMERON, 1975), altamente polimórficos, possibilitam a produção de híbridos interespecíficos e intergenéricos com facilidade (BARRETT, 1985) e apresentam genoma pequeno ( $1C = 0,62$  pg) (GUERRA, 1984).

Dessa forma, diversos trabalhos de mapeamento vêm sendo realizados com sucesso em citros, buscando-se genes e/ou caracteres de locos quantitativos (QTLs) de resistência/tolerância a saís e ao frio (MOORE et al., 2000), ao vírus da tristeza (CRISTOFANI, 1997), dormência, juvenildade e vigor (ROOSE et al., 1992), porte das plantas e acidez dos frutos (GMITTER JR. et al., 1996).

Os requisitos fundamentais para o mapeamento genético são os seguintes: a) Escolha de parentais com comportamento fenotípico contrastante em relação à característica de interesse; b) Reprodução sexuada controlada entre os parentais com produção de uma progênie com tamanho representativo de eventos meióticos; e c) Disponibilidade de técnicas para obtenção de centenas de marcadores com comportamento mendeliano.

A diversidade genética também é um fator importante na escolha dos parentais: sendo pequena, dificultará a obtenção de marcadores, enquanto, sendo demasiadamente elevada, como pode ocorrer em alguns cruzamentos intergenéricos, pode provocar erros no cálculo das distâncias e na ordem dos marcadores nos grupos de ligação. Tais erros seriam em função de distorções na segregação das marcas em vista de problemas no pareamento dos cromossomos ou a processos de seleção pré ou pós-zigótica resultantes da manifestação de genes deletérios recessivos.

Quanto maior o tamanho da progênie, mais precisa será a estimativa da frequência de recombinação genética entre os marcadores, porém mais trabalhosa a pesquisa. Estima-se que, no mínimo, deva-se utilizar uma amostra em torno de cem indivíduos para a identificação de genes ou regiões genômicas de interesse (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

O mapeamento de espécies perenes teve um grande impulso com o trabalho de GRATTAPAGLIA & SEDEROFF (1994), que propuseram a utilização da estratégia *pseudo-testcross*. Por meio dessa estratégia, a configuração do cruzamento não precisa ser planejada *a priori*, como em um cruzamento teste clássico, mas pode ser inferida *a posteriori*, após a análise de segregação dos marcadores na progênie. Por isso, é de grande aplicação no mapeamento de espécies perenes altamente heterozigotas como os *Citrus*. A eficiência da estratégia *pseudo-testcross* é diretamente proporcional ao nível de heterozigose e à distância genética dos indivíduos cruzados (CARLSON et al., 1991). Ao contrário dos mapas integrados anteriormente construídos, são gerados dois mapas de ligação, um para cada progenitor em função das marcas que se encontravam em heterozigose em um parental e homozigose no outro.

A população híbrida deve ser genotipada para algumas centenas de marcadores, inicialmente selecionados por serem polimórficos entre os parentais. Atualmente, mapas genéticos de ligação de várias espécies estão sendo construídos com relativa facilidade pela disponibilidade de diferentes tipos de marcadores moleculares (GEBHARDT et al., 1989; GRATTAPAGLIA & SEDEROFF, 1994). Marcadores, como os RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), microssatélites e outros, permitem a detecção de polimorfismos genéticos em número praticamente ilimitado diretamente do DNA. Os marcadores são obtidos por meio de procedimentos relativamente simples, em qualquer fase da planta, sem interferência ambiental e de forma a representar praticamente todo o genoma. Os marcadores morfológicos e bioquímicos (isoenzimáticos), anteriormente empregados, não apresentam essas vantagens, porém também podem ser utilizados conjuntamente na construção de mapas de ligação (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os mapas de ligação são obtidos a partir dos dados de segregação das marcas na população híbrida. A construção dos mapas pode ser feita pelo procedimento clássico denominado de mapeamento de três pontos, onde os marcadores são ordenados seqüencialmente com base nas distâncias dois a dois. Utilizando-se aplicativos específicos, como o Linkage1 (SUITER et al., 1983), MapMaker (LANDER et al., 1987), GMendel (LIU & KNAPP, 1992) e JoinMap (STAM, 1993), em função da frequência de recombinação genética (*crossing over*), pode-se dispor os marcadores em grupos de ligação e ordená-los em cada grupo, estimando-se a distância entre eles em porcentagem de recombinação ou unidades de centiMorgan. Os aplicativos citados utilizam diversas funções de mapeamento para o cálculo das distâncias entre os marcadores, como a de HALDANE (1919), KOSAMBI (1944) e CROW (1990). Basicamente, a distância de mapa é a razão entre o número observado de indivíduos com genótipos recombinantes e o número total de indivíduos genotipados. A correlação entre a distância física (número de pares de bases) e distância entre genes (frequência de recombinação) não é alta

em todo o genoma, pois existem regiões cromossômicas onde há probabilidade alta de recombinação e regiões onde a recombinação é suprimida, tais como telômeros e centrômeros (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A construção de um mapa genético gera ainda grande número de informações básicas sobre a estrutura e a organização do genoma das espécies estudadas, tais como padrões de distorção de segregação mendeliana de segmentos cromossômicos ou a presença de inversões, translocações e duplicações de segmentos de DNA (TANKSLEY et al., 1992).

A grande maioria das características herdáveis de importância econômica resultam da ação conjunta de vários genes. Essas características são conhecidas como poligênicas, quantitativas ou de herança complexa, sendo denominados de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) os locos que controlam os fenótipos resultantes. Supõe-se que a resistência à CVC também seja de caráter quantitativo.

Segundo FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998), por meio de marcadores moleculares, pode-se mapear QTLs e entender a arquitetura de características quantitativas, ou seja, o número, posição, ação gênica, magnitude de efeito e interações. Se determinado marcador estiver fisicamente ligado a um gene que controla um caráter de interesse agrônômico, a seleção do marcador implica a seleção indireta do gene de interesse. A capacidade de detectar um QTL depende da magnitude do seu efeito sobre a característica, do tamanho da população segregante, da frequência de recombinação entre o marcador e o QTL e da herdabilidade da característica. Conforme os mesmos autores, o principal problema na identificação de QTLs refere-se à expressão final do fenótipo, a qual sofre a ação de vários fatores genéticos e ambientais.

Para o entendimento da herança e identificação dos QTLs de resistência a qualquer agente biótico, a população segregante e os parentais devem ser submetidos a uma pressão de inóculo do patógeno. Quando os fenótipos observados segregam de acordo com as proporções esperadas pelas leis de Mendel, a característica de resistência pode ser tratada como se fosse outro marcador. Podem ocorrer, porém, variações na penetrância

do loco controlador da resistência ou proporções de segregação diferentes, evidenciando a participação de mais de um loco no processo ou interações epistáticas, dificultando a avaliação dos fenótipos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

### 3. PESQUISAS NO CENTRO APTA CITROS “SYLVIO MOREIRA”

Uma das linhas de pesquisa do programa de melhoramento do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” (CAPTACSM-IAC), em Cordeirópolis (SP), consiste no mapeamento genético de citros visando à resistência à CVC.

As variedades tangerina ‘Cravo’ (*Citrus reticulata* Blanco), parental feminino, e laranja ‘Pêra’ [*C. sinensis* (L.) Osbeck], parental masculino, foram dois dos parentais escolhidos para as análises de mapeamento. A ‘Pêra’, principal variedade copa utilizada no Brasil, é altamente suscetível à CVC, enquanto a tangerina ‘Cravo’ tem-se mostrado resistente, embora a bactéria consiga se multiplicar em seus tecidos quando inoculada (MACHADO et al., 1993). Os parentais foram escolhidos em função do comportamento diferencial em relação à resistência à CVC. Por meio de análises RAPD, verificou-se uma similaridade genética elevada entre os parentais (74,5%), o que explica a dificuldade de obter polimorfismos de DNA em relação a cruzamentos intergenéricos.

As sementes resultantes dos cruzamentos controlados entre tangerina ‘Cravo’ e laranja ‘Pêra’ deram origem a milhares de plantas nucelares e zigóticas. Os parentais e os híbridos apresentaram características morfológicas bastante semelhantes. Por isso, utilizaram-se marcadores RAPD conjuntamente com marcadores morfológicos (largura e comprimento das folhas, comprimento e tipo de asa do pecíolo) para a seleção de plântulas zigóticas (OLIVEIRA et al., 2000). Dessa forma, relacionou-se uma progênie composta por 143 híbridos. A porcentagem de plântulas zigóticas foi de 5,6% e 19,4%, respectivamente, ao serem cultivadas adensadas em canteiros e de forma isolada em tubetes.

Os híbridos obtidos foram transplantados em sacos de polietileno de 5 L, contendo substrato comercial à base de perlita, e cultivados em casa de vegetação. Após um ano de cultivo, apenas 94 híbridos sobreviveram. Provavelmente, a expressão de genes deletérios recessivos em homozigose comprometesse o desenvolvimento dos demais híbridos.

Os híbridos foram multiplicados vegetativamente, sendo enxertados em porta-enxertos de limão 'Cravo'. Essas plantas foram divididas para avaliação do nível de resistência de cada híbrido à CVC e do potencial agrônômico, acreditando-se, nesse caso, na possibilidade de obter material de valor comercial. Após oito meses da enxertia, realizou-se a inoculação de plantas híbridas com *Xylella fastidiosa*, comparando-se os seguintes métodos: a) Enxertia de tecidos de ramos com sintomas de CVC; b) Aplicação de suspensão de *Xylella fastidiosa* em ferimento das plantas.

A enxertia de ramos com sintomas de CVC foi feita, empregando-se dois tipos de tecidos (segmento de ramo e pecíolo), realizando-se duas inoculações em um intervalo de 30 dias. Em cada inoculação, enxertou-se um segmento de ramo com diâmetro médio de 3-4 mm e comprimento de 3-4 cm e um pecíolo por planta, coletados de ramos com, pelo menos, 15% de sintomas de CVC nas folhas, segundo a escala diagramática proposta por AMORIM et al. (1993). Na primeira enxertia, empregaram-se tecidos de plantas com três anos de idade cultivadas em casa de vegetação e diagnosticadas por PCR para a presença de *Xylella fastidiosa*. Na segunda enxertia, usaram-se tecidos de plantas com dez anos de idade, desenvolvidas em pomar comercial, as quais apresentavam sintomas visuais de CVC. Plantas-controle foram estabelecidas, fazendo-se a enxertia com tecidos de plantas saudáveis.

A bactéria foi assepticamente multiplicada em placas de Petri contendo meio de cultura semi-sólido PW (DAVIS et al., 1981), por cinco subcultivos de dez dias. Para a inoculação das plantas com suspensão de *Xylella fastidiosa*, utilizou-se a linhagem 9a5c, isolada de plantas de vinca (*Catharanthus roseus* L.). Para a inoculação, utilizou-se suspensão bacteriana em região de poda das plantas 15 cm acima do ponto de enxertia da variedade/híbrido. Na região do corte da poda, efetuaram-se, a cada 30 minutos, cinco aplicações de 10 µL de suspensão de bactérias diluídas

em solução PBS (LEE et al., 1993), pH 7,0, com concentração aproximada de  $10^8$  células/mL, estimada em câmara de Newbauer. Nesse caso, estabeleceram-se plantas-controle, aplicando-se solução PBS sem bactérias.

As plantas inoculadas estão sendo observadas com relação à incidência e intensidade de sintomas da doença. Até doze meses após a inoculação, não houve o desenvolvimento de sintomas.

Para as análises de mapeamento, extraiu-se DNA de folhas dos híbridos, utilizando o método CTAB proposto por MURRAY & THOMPSON (1980) e adaptado por CRISTOFANI (1997). As reações de RAPD foram feitas com 97 *primers* decâmeros de seqüência arbitrária da Operon Technologies. Os marcadores RAPD foram utilizados em virtude da fácil implementação, baixo custo, necessidade de pequenas quantidades de DNA genômico, rápida obtenção dos marcadores e elevado polimorfismo representativo de todo o genoma (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

As análises de ligação entre os marcadores foram realizadas com o aplicativo MAPMAKER 3.0 (LANDER et al., 1987), adotando-se a estratégia *pseudo-testcross*, a função Kosambi,  $LOD \geq 6,0$  e uma frequência máxima de recombinação ( $\theta$ ) de 0,25. Utilizaram-se somente marcadores com a configuração Aa x aa e aa x Aa, ou seja, com bandas presentes em um parental (Aa) e ausentes no outro (aa), de forma a se obter um mapa de ligação específico para cada progenitor.

O mapa genético de ligação de laranja 'Pêra' contém 117 marcas, dispostas em 12 grupos de ligação, totalizando 612,1 cM, com distância entre os marcadores variando de 0 a 25,4 cM. O mapa de tangerina 'Cravo' contém 51 marcas, dispostas em 12 grupos de ligação, totalizando 353,3 cM, com distância entre os marcadores variando de 0 a 25,4 cM.

Uma característica interessante dos mapas obtidos consistiu na concentração de marcas em determinadas regiões dos grupos de ligação. Isso pode ser explicado pelo fato de os cromossomos de *Citrus* possuírem grande quantidade de heterocromatina e em posições variáveis (GUERRA, 1993), havendo, nesses locais, menor ocorrência de recombinação genética (TANKSLEY et al., 1992). A concentração dos

marcadores nas regiões de eucromatina representa um fator favorável, pois a maioria dos genes que se expressam se encontram nessas regiões. Para a determinação de QTLs, PATERSON et al. (1988) recomendam uma distância média máxima entre marcadores de 20 cM. Nos mapas de laranja 'Pêra' e tangerina 'Cravo', as distâncias médias entre marcadores foram de 5,2 e 6,9 cM respectivamente.

#### 4. PERSPECTIVAS FUTURAS

A associação da incidência e intensidade de sintomas provocados pela *Xylella fastidiosa* na população híbrida gerada com os marcadores moleculares dos mapas genéticos de ligação de laranja 'Pêra' e tangerina 'Cravo' certamente proporcionará melhor entendimento da genética de resistência dos citros à CVC. Um estudo mais detalhado do(s) gene(s) ou QTLs envolvidos, incluindo seqüenciamento e clonagem, permitirá a sua transferência, por meio de transformação genética, para as variedades de citros suscetíveis à CVC. Isso é ainda mais interessante em função de serem estudados genes de resistência existentes dentro do próprio gênero *Citrus*, passíveis de serem transferidos por processos naturais de hibridação, já que as espécies se cruzam entre si. Essa estratégia de melhoramento é importante por haver menores riscos de impacto ambiental, sendo, conseqüentemente, mais simples o processo de liberação de nova variedade para o plantio comercial.

Se, por um lado, as características genéticas e biológicas dos citros dificultam o melhoramento genético clássico por cruzamentos controlados, por outro favorecem a obtenção de mapas genéticos de ligação. Essa facilidade, associada à atual disponibilidade de técnicas moleculares, as quais possibilitam a obtenção de um número praticamente ilimitado de marcadores, e a existência de técnicos especializados está possibilitando uma série de pesquisas relacionadas ao entendimento da herança e identificação de regiões genômicas relacionadas à resistência/tolerância a inúmeros agentes bióticos e abióticos.

Os mapas genéticos de ligação obtidos de laranja ‘Pêra’ e tangerina ‘Cravo’ podem ser utilizados para análise genética de outras características de interesse agrônomo, além da resistência à CVC, bastando-se analisar o comportamento da população híbrida em relação ao caráter a ser estudado. Como exemplo, pode-se citar o estudo da resistência ao cancro cítrico, uma vez que também existe comportamento diferencial dos parentais quanto ao nível de resistência a essa doença. Em razão desses aspectos, atualmente, também estão sendo desenvolvidas pesquisas de mapeamento genético relacionadas à resistência à gomose, leprose e vírus da tristeza no Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”. Dessa forma, acredita-se que grandes avanços serão alcançados no mapeamento genético dos citros nos próximos anos em relação à CVC e a vários outros fatores determinantes na produção de citros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; PALAZZO, D.A.; BASSANEZI, R.B.; GODOY, C.V. & TORRES, G.A.M. Clorose variegada dos citros: uma escala diagramática para avaliação da severidade da doença. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, p.174-180, 1993.
- BARRETT, H.C. Hybridization of *Citrus* and related genera. **Fruit Varieties Journal**, University Park, v.39, p.11-16, 1985.
- CARLSON, J.E.; TULSIERAM, L.K.; GALUBITZ, J.C.; LUK, V.W.K.; KAUFFELDT, C. & RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F<sub>1</sub> progeny of conifers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.83, p.194-200, 1991.
- CHANG, C.J.; GARNER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V. & BOVÉ, J.M. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, New York, v.27, p.137-142, 1993.
- CRISTOFANI, M. **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.** 1997. 140p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoria de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz/USP, Piracicaba.
- CROW, J.F. Mapping functions. **Genetics**, Oxford, v.125, p.669-671, 1990.
- DAVIS, M.J.; FRENCH, W.J. & SCHAAD, N.W. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. **Current microbiology**, New York, v.6, p.309-314, 1981.
- FAO QUARTERLY BULLETIM OF STATISTICS. Rome, v.12, n.3/4, 1999. 152p.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Manual de CVC: como obter sucesso no manejo da doença.** 4. ed. Araraquara : FUNDECITRUS, 2000. 16p.
- GEBHARDT, C.; RITTER, E.; DEBENER, T.; SCHACHTSCHABEL, U.; WALKEMEIER, B.; UHRIG, H. & SALAMINI, F. RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.78, p.65-75, 1989.
- GMITTER JR., F.G.; XIAO, S.Y.; HUANG, S.; HU, X.L.; GARNSEY, S.M. & DENG, Z. A localized linkage map of the virus tristeza virus resistance gene region. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.92, p.688-695, 1996.
- GRATTAPAGLIA, D. & SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross; mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, Oxford, v.137, p.1121-1137, 1994.
- GROSSER, J.W. & GMITTER JR., F.G. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. **HortScience**, Alexandria, v.25, p.147-151, 1990.
- GUERRA, M.S. Cytogenetics of Rutaceae. II. Nuclear DNA content. **Caryologia**, Firenze, v.37, p.219-226, 1984.
- GUERRA, M.S. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. **Heredity**, Oxford, v.71, p.234-241, 1993.

- HALDANE, J.B.S. The combination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linked factors. **Journal of Genetics**, v.8, p.299-309, 1919.
- KOSAMBI, D.D. The estimation of map distance from recombination values. **Ann. Eugenet.**, v.12, p.172-175, 1944.
- LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, S.E. & NEWBURG, L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v.1, p.174-181, 1987.
- LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; HARTUNG, J.H.; HOOKER, M.E. & DERRICK, K.S. Citrus variegated chlorosis; confirmation of a *Xylella fastidiosa* as the causal agent. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.19, p.123-125, 1993.
- LI, W.B. **Avaliação do comportamento de variedades de copas e porta-enxertos à clorose variegada dos citros**. 1997. 97p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Jaboticabal.
- LIU, B.H. & KNAPP, S.J. **GMENDEL 2.0: a software for gene mapping**. Oregon State University, 1992 (Software).
- MACHADO, M.A.; SILVERIO, J.L.; BAPTISTA, C.R.; LARANJEIRA, F.F. & BERETTA, M.J.G. Avaliação de transmissão e seleção de variedades à clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.14, n.1, p.167-176, 1993.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. **Mapeamento da fruticultura brasileira**. Brasília, 2000. 110p.
- MOORE, G.A.; TOZLU, I.; WEBER, C.A. & GUY, C.L. Mapping quantitative trait loci for salt tolerance and cold tolerance in *Citrus grandis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. hybrid populations. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.535, p.37-45, 2000.
- MURRAY, M.G. & THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v.8, p.4321-4325, 1980.
- OLIVEIRA, R.P.; NOVELLI, V.M. & MACHADO, M.A. Frequência de híbridos em cruzamento entre tangerina 'Cravo' e laranja 'Pêra': análise de marcadores morfológicos e RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.9, p.1895-1903, 2000.

- PATERSON, A.H.; LANDER, E.S.; HEWITT, J.D.; PETERSON, S.; LINCOLN, S.E. & TANKSLEY, S.D. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. **Nature**, London, v.335, p.721-726, 1988.
- ROOSE, M.L.; FANG, D.; CHENG, F.S.; TAYYAR, R.I.; FEDERICI, C.T. & KUPPER, R.S. Mapping the *Citrus* genome. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.535, p.25-32, 2000.
- ROOSE, M.L.; JARRELL, D.C. & KUPPER, R.S. Genetic mapping in a *Citrus* x *Poncirus* F<sub>2</sub> population. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7., 1992. Acireale. **Proceedings...** Acireale, 1992. v.1, p.210-213.
- ROSSETTI, V. & DE NEGRI, D. Clorose variegada dos citros: revisão. **Laranja**, Cordeirópolis, v.11, n.1, p.1-14, 1990.
- SOOST, R.K. & CAMERON, J.W. *Citrus*. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Eds.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p.507-540.
- STAM, P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. **The Plant Journal**, v.3, p.739-744, 1993.
- SUITER, K.A.; WENDELL, J.F. & CASE, J.S. Linkage1; a PASCAL computer program for the detection and analysis of genetic linkage. **The Journal of Heredity**, Oxford, v.74, p.203-204, 1983.
- TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W.; PRINCE, J.P.; DE VICENTE, 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**, Oxford, v.132, p.1141-1160, 1992.
- TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M. & GRAHAM, J.H. **Compendium of citrus diseases**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2.ed., 2000. 92p.