

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

LAYANNE BATISTA SOUZA

Mapeamento genético de híbridos intraespecíficos de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], obtidos por cruzamentos controlados

**Piracicaba
2010**

LAYANNE BATISTA SOUZA

Mapeamento genético de híbridos intraespecíficos de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], obtidos por cruzamentos controlados

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rocha Latado

**Piracicaba
2010**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Souza, Layanne Batista

Mapeamento genético de híbridos intraespecíficos de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], obtidos por cruzamentos controlados / Layanne Batista Souza; orientador Rodrigo Rocha Latado. - - Piracicaba, 2010.

66 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Marcador molecular 2. Melhoramento genético vegetal 3. Polimorfismo 4. SSR
5. TRAP I. Título

CDU 634.31:575.116.4

Aos meus pais Lucia e Luis e
meu irmão Leonardo,
Pelo amor e apoio

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

Ao pesquisador e orientador Dr. Rodrigo Rocha Latado, pela oportunidade, ensinamentos, orientação e apoio.

À pesquisadora Dra. Mariângela Cristofani-Yali pelos ensinamentos e por sua importante contribuição no desenvolvimento e análises de mapeamento.

Ao Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira, pela disponibilidade do laboratório.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida para a realização do curso.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) e ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC pela oportunidade oferecida de grande aprendizado.

À bibliotecária chefe Marília Ribeiro Garcia Henyei pela disponibilidade e ajuda.

Aos técnicos do LAMP Eduardo Fonseca, Myrian Raquel e Wlamir Godoy cujas funções ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Melhoramento de Plantas Aline Harissis, Ângela Sanche, Deborah Nishimura, Gildemberg Leal, Ilse Ferrari, João Bortoleto, João F. Nebó, Juliana Deganello, Laura Possignolo, Maria Lorena, Mariana Belotti, Paula Yamamoto, Renato Ferreira, Tais Tomazini e Thaísa Pinheiro pela troca de experiências, apoio e agradável convívio durante esses anos. Em especial ao amigo Cláudio Lopes pelos esclarecimentos e ajuda na construção dos mapas e aos amigos de salinha: Danielle Scotton, Eduardo Bressan, Gabriela de Gaspari e Onildo Nunes pelo incentivo e amizade.

Aos técnicos, pesquisadores e colegas do Centro de Citricultura.

Às amigas do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC que tanto me ajudaram e me apoiaram, Joice Garbin, Mariela Thim, Tatiane Cunha e em especial a Salete Rocha, sem a qual eu não teria conseguido finalizar os meus inúmeros géis.

Agradeço a minha família: minha mãe, Lucia, meu pai, Luis e meu irmão, Leonardo, pelo apoio, incentivo, confiança e amor em todos os momentos da minha vida.

Aos meus avós, tios e primos, por todas as palavras carinhosas e incentivos durante esta caminhada.

Às minhas queridas amigas e companheiras nessa jornada: Elisa Matos, Fabiana Mingossi e Vívian Carvalho por estarem comigo em todos os momentos, pelo incentivo, ajuda, distração e por serem a minha família aqui.

Às amigas que o mestrado me proporcionou e tornaram meus dias mais felizes: Alice Cassetari, Bruna Gonçalves, Gisele Nunes, Giselle Gomes, Joze Correa, Ligia Hansen, Mylenne Pinheiro, Nara Gustinelli e Thaís Paula. E também aos amigos: Adriano Lucheta, André Mazzetto, Geraldo Junior e João Luís.

Ao René, pelo amor, incentivo, pelos puxões de orelha quando era necessário, pelo companheirismo e pela ajuda em todos os momentos até a conclusão deste trabalho. E também a sua família pelo incentivo e pela acolhida.

Aos meus amigos da Bahia, BH e Alfenas que sempre se fizeram presentes, entenderam a minha ausência e me incentivaram nessa caminhada.

E a todos não citados que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

Agradeço de coração.

RESUMO

SOUZA, L. B. **Mapeamento genético de híbridos intraespecíficos de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], obtidos por cruzamentos controlados.** 2010. 66 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Apesar do destaque do setor citrícola paulista e brasileiro, existe uma séria vulnerabilidade para o cultivo da laranja, que está pautada no uso de poucas variedades comerciais. A instalação de programas de melhoramento de laranjeiras com uso de cruzamentos controlados é dificultada principalmente pelos problemas de poliembrionia nas sementes e pela presença de ciclo juvenil longo nas plantas, o que ocasiona a dificuldade em obter plantas híbridas via cruzamentos controlados e o tempo muito longo para a conclusão de um ciclo de recombinação e seleção. O objetivo deste estudo foi a construção de um mapa de ligação utilizando uma população de 144 híbridos oriunda do cruzamento entre a laranjeira Tobias (CN 1392 e CN 1393), que apresenta ciclo juvenil curto, e laranjeira Pêra-de-Abril, variedade com sementes monoembriônicas. O mapa de ligação foi construído com base em marcadores moleculares SSR e TRAP através de dois *softwares* (JoinMap e Onemap). O mapa genético construído pelo JoinMap conteve 85 (61%) marcas dispostas em 13 grupos de ligação, totalizando 634 cM, com distância entre os marcadores adjacentes variando de 0 a 29 cM. Os tamanhos individuais dos grupos de ligação variaram de 8 a 85 cM e um total de 55 (39%) marcadores não se ligou ao mapa. Com o *software* OneMap 87 (62%) marcadores se ligaram em 16 grupos de ligação, totalizando 1.100 cM, com distância entre marcadores adjacentes variando de 0 a 36 cM. Os tamanhos individuais dos grupos de ligação variaram de 8 a 205 cM. Um total de 53 (38%) marcadores não se ligaram no mapa. A marca que constitui o caráter fenotípico de interesse ‘florescimento precoce’ foi incluída no mapa quando utilizado o *software* OneMap. Houve similaridade entre os mapas de ligação de híbridos intraespecíficos de laranja doce construídos com os aplicativos JoinMap e OneMap. A distinção encontrada ocorreu, principalmente, devido aos marcadores com segregação distorcida.

Palavras-chave: Mapeamento genético. Marcador molecular. Polimorfismo. SSR. TRAP.

ABSTRACT

SOUZA, L. B. **Genetic mapping of intraspecific hybrids of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], obtained by controlled breeding**. 2010. 66 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Despite the prominence of the citrus sector in São Paulo and Brazil, there is a serious vulnerability for the cultivation of orange, which is guided by the use of a few commercial varieties. Orange breeding programs that make use of controlled breeding are hampered mainly by the problems of polyembryony and the presence of long juvenile cycle, which impair the obtainment of hybrid plants through controlled crossings as well as taking a long time for the conclusion of a cycle of recombination and selection. The goal of this study was the construction of a linkage map using a population of 144 hybrids from crosses between Tobias sweet orange (CN 1392 and CN 1393), which present short juvenile cycle, and Pêra-de-Abril sweet orange, variety with monoembryonic seeds. The linkage map was constructed based on molecular markers SSR and TRAP using two softwares (JoinMap and Onemap). The genetic map obtained by JoinMap showed 85 (61%) markers arranged in 13 linkage groups totalizing 634cM, with the distance between adjacent markers ranging from 0 to 29 cM. The sizes of individual linkage groups ranged from 8-85 cM and a total of 55 (39%) markers could not be linked to the map. With the software OneMap 87 (62%) markers were linked in 16 linkage groups, totalizing 1.100 cM, with the distances between adjacent markers ranging from 0 to 36 cM. The sizes of individual linkage groups ranged from 8-205 cM. A total of 53 (38%) markers could not be linked on the map. The mark related to 'flowering', which is the phenotypic character of interest, was found using the software OneMap. There was similarity between the linkage maps of intraspecific hybrids of sweet orange built with JoinMap and OneMap softwares. The distinction found was mainly due to the markers with segregation distortion.

Keywords: Genetic mapping. Molecular marker. Polymorphism. SSR. TRAP.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1 Aspectos Gerais e Importância Econômica dos Citros no Brasil..... | 15 |
| 2.2 Genética e Melhoramento de Citros | 15 |
| 2.3 Mapeamento genético | 19 |
| 2.4 Mapeamento Genético em Citros..... | 25 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 3.1 Material vegetal..... | 31 |
| 3.2 Coleta de dados de marcadores moleculares nas plantas da população..... | 32 |
| 3.2.1 Extração do DNA genômico | 32 |
| 3.2.3 Marcadores Moleculares Microssatélites (SSR)..... | 32 |
| 3.2.4 Marcadores Moleculares TRAPs | 33 |
| 3.3 Tratamento dos dados e construção dos mapas de ligação | 36 |
| 3.3.1 Construção do mapa genético com uso do <i>software</i> JoinMap..... | 36 |
| 3.3.2 Construção do mapa genético com uso do <i>software</i> OneMap..... | 37 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 39 |
| 4.1 Mapas de Ligação..... | 40 |
| 4.1.1 Marcadores moleculares | 40 |
| 4.1.2 Análise de ligação..... | 45 |
| 5 CONCLUSÕES | 55 |
| REFERÊNCIAS | 57 |

1 INTRODUÇÃO

O melhoramento de citros tem avançado nas últimas décadas, principalmente devido à possibilidade de utilização e incorporação de ferramentas de biotecnologia aos programas tradicionais de melhoramento. Um exemplo seria a utilização de marcadores moleculares para a seleção precoce de plantas híbridas obtidas de cruzamentos controlados, o que possibilitou a seleção de um número elevado de novas combinações e, conseqüentemente, o estabelecimento de várias populações híbridas, utilizadas para estudos genéticos e para a seleção de novas variedades com características agronômicas desejáveis.

Existem várias fontes genéticas de resistência à fatores bióticos e abióticos em *Citrus* e gêneros próximos, que podem ser transferidas para variedades ou espécies de maior valor comercial.

Algumas limitações fazem das laranjeiras doces [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] um desafio para os estudos genéticos, especialmente sua alta heterozigosidade genética, longo tempo de geração necessário para cada ciclo de recombinação e seleção, assim como a poliembrião nucelar adventícia.

Com relação à juvenilidade, o problema é o período de tempo desde a semeadura até o início da fase reprodutiva, das plantas propagadas via sementes que pode durar entre 6 e 20 anos (ENDO et al., 2005). Devido a esta longa juvenilidade, nos primeiros anos de cultivo as plantas originadas de sementes geralmente são bastante vigorosas, com espinhos e folhagem abundantes e não produzem flores e nem frutos. Somente após uma década as plantas alcançam produções satisfatórias, sendo então aptas às análises de perspectivas agronômicas e econômicas, por meio de avaliações das suas características horticulturais e de produtividade.

A poliembrião, muito encontrada em laranjeiras, consiste na existência de sementes contendo mais de um embrião, o que resulta na formação de mais de uma planta em cada semente germinada. Geralmente, um embrião é originado sexualmente (embrião zigótico) e os outros, denominados de embriões nucleares, são desenvolvidos a partir de células do tecido nucelar da planta mãe. Como os embriões nucleares estão em maior número e geralmente são mais vigorosos, a probabilidade de se obter híbridos em sementes extraídas de frutos de variedades poliembriônicas de citros é baixa.

Em se tratando de uma abordagem metodológica, uma das formas mais eficientes de associar características fenotípicas com características genéticas é por meio de mapas genéticos de ligação, no qual essas características são ordenadas sequencialmente correspondendo de modo aproximado a posição dos genes nos cromossomos (ROOSE, 2003). Mapas de ligação têm contribuído de maneira significativa para programas de melhoramento e pesquisa genética, sendo uma das mais eficientes estratégias para condução de estudos genéticos avançados facilitando a seleção de plantas, o entendimento de herança genética, da estrutura e organização do genoma.

O gênero *Citrus* possui características favoráveis que auxiliam a construção de mapas genéticos, dentre elas, possuir espécies predominantemente diplóides ($2n = 18$), com genoma pequeno, nível alto de polimorfismo entre espécies e a possibilidade de se obter híbridos férteis entre espécies (OLIVEIRA et al., 2005).

O programa de melhoramento de Citros do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC já produziu milhares de novas plantas híbridas, obtidas de cruzamentos interespecíficas e intergenéricas. O mapeamento genético destas populações resultou em seis mapas de ligação, desenvolvidos em híbridos de laranja doce cv Pêra x tangerina Cravo (OLIVEIRA et al., 2004b, 2005), tangerina Sunki x *P. trifoliata* cv Rubidoux (CRISTOFANI et al., 1999, 2000) e laranja doce cv Pêra x tangor Murcott (OLIVEIRA et al., 2000). Regiões genômicas associadas às características quantitativas e qualitativas foram localizadas nestes mapas tais como: resistência/tolerância ao CTV, CVC, gomose de *Phytophthora*, leprose, mancha de alternaria e apomixia (CRISTOFANI et al., 1999; SIVIERO et al., 2006; BASTIANEL et al., 2006).

O material vegetal empregado no presente estudo era constituído de plantas híbridas intraespecíficas de laranja doce resultantes do cruzamento de laranjeiras Tobias (CN 1392) e Tobias T (CN 1393), que possuem ciclo juvenil curto, com a laranjeira Pêra-de-Abril (CV148), usada como genitora materna e que apresenta sementes monoembriônicas. Este trabalho é pioneiro por não se encontrar relatos da existência de populações de plantas híbridas intraespecíficas de laranjeira doce e nem mapas genéticos construídos a partir de tais populações.

Este estudo teve como objetivos a construção de mapas genéticos de laranjeira doce, utilizando uma população de híbridos intraespecíficos entre laranjeiras Pêra de abril e Tobias, utilizando-se marcadores moleculares SSR e TRAP, visando à característica de ciclo juvenil curto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Gerais e Importância Econômica dos Citros no Brasil

Na safra de 2006/07 o Brasil foi o maior produtor e consumidor de laranja, detendo 33,7% da produção mundial deste fruto e 62,1% da produção de suco (AGRAFNP, 2009). Em 2009, a colheita de laranja na safra foi estimada em 18,5 milhões de toneladas, o que representa um forte impacto na economia do país (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2009). A citricultura brasileira destaca-se como a de maior expressão em nível mundial, com um total aproximado de 270 milhões de plantas, distribuídas numa área superior a 900 mil hectares. O Estado de São Paulo é o maior produtor brasileiro de laranjas, com um total de 18 milhões de toneladas, o que corresponde a 80,4% da produção total deste fruto no país (FAO, 2010). Esse notável desenvolvimento deve-se à adoção de novas tecnologias na condução dos pomares, na utilização de mudas de melhor qualidade e novos materiais genéticos, resultando assim em maiores índices de produtividade.

No Brasil, a citricultura é uma atividade agrícola que apresenta boa rentabilidade aos agricultores. Segundo Neves e Lopes (2005), a cultura da laranja no Brasil é uma das que apresenta maior faturamento por área plantada, atingindo um valor médio de R\$ 4.652,00/ha, em 2002. As exportações citrícolas, compostas principalmente por suco de laranja concentrado congelado e subprodutos, perfizeram um total de 4,5% das exportações do agronegócio brasileiro em 2003 (NEVES; LOPES, 2005), e resultando num faturamento próximo de 2,25 bilhões de dólares no ano de 2007 (AGRAFNP, 2009).

2.2 Genética e Melhoramento de Citros

O gênero *Citrus* caracteriza-se por apresentar plantas de porte médio (arbóreo/arbustivo), flores brancas e aromáticas e frutos tipo baga. O sistema de classificação mais utilizado foi o

proposto por SWINGLE (1943), que reconheceu 16 espécies de citros e as classificou entre os seis gêneros que compunham o grupo subtribal denominado "árvores de citros verdadeiros" ("true citrus fruit trees"), subtribo Citrinae, tribo Citreae, subfamília Aurantioideae da família Rutaceae (SWINGLE; REECE, 1967).

Segundo Guerra et al. (2000), a subfamília Aurantioideae pode ser caracterizada por espécies diplóides, sendo que de suas 60 espécies estudadas até então, a grande maioria é $2n = 2x = 18$ e, ocasionalmente, ocorrem autopoliplóides intraespecíficos ($3x$ e $4x$). Poliplóides comprovadamente estabilizados são raramente encontrados.

As espécies do gênero *Citrus* reproduzem-se sexuadamente por autopolinização ou por polinização cruzada, assexuadamente por meio de apomixia nucelar adventícia em sementes e agronomicamente, por meio de propagação vegetativa. Já foi demonstrada a existência de compatibilidade genética entre as espécies de *Citrus* e outras de gêneros correlacionados, tais como o *Poncirus* e *Fortunella*, com a produção de híbridos férteis de interesse para o melhoramento.

O melhoramento de plantas é uma das mais valiosas estratégias para o aumento da produtividade vegetal de forma sustentável e ecologicamente equilibrada. (BORÉM, 1997). Em geral, os programas de melhoramento têm sido conduzidos com os seguintes objetivos específicos: aumento de produtividade, maior resistência às doenças e pragas e melhor qualidade de grãos e frutos, porém, quaisquer outros objetivos também podem ser almejados (exemplos: alteração da altura de plantas; resistência à seca e à salinidade; ausência de pelos ou sementes em frutos, etc.).

Os citros são plantas perenes e de ciclo vegetativo longo, isto é, levam muitos anos para iniciarem a produção, o que torna o melhoramento genético para essas espécies um processo longo e trabalhoso. Por outro lado, a grande vulnerabilidade genética da cultura, devido às poucas variedades que constituem os plantios comerciais, frente a fatores adversos como as pragas e doenças, têm se tornado uma preocupação constante no melhoramento dos citros. O sistema de cultivo basicamente monoclonal, com uso de variedades com base genética estreita e em grandes extensões de terra, vem fazendo com que várias doenças apareçam e tornem muitas vezes limitantes o seu cultivo (CARLOS et al., 2000; GIMENES-FERNANDES; BASSANEZI, 2001).

Apesar do melhoramento genético via hibridação controlada ser uma das principais formas de se obter e manipular a variabilidade, nos citros existem duas grandes barreiras

biológicas que dificultam os cruzamentos, a ocorrência de poliembrião nas sementes e o longo período juvenil de plantas provenientes de sementes (FROST; SOOST, 1968). A maioria dos citros apresenta estas características e as laranjeiras doces [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] não são diferentes.

A poliembrião consiste na existência de sementes contendo mais de um embrião, o que resulta na formação de mais de uma planta em cada semente germinada. Geralmente, um embrião é originado sexualmente (embrião zigótico) e os outros, denominados de embriões nucelares, são desenvolvidos a partir de células do tecido nucelar da planta mãe. Salvo eventuais mutações, os embriões nucelares apresentam a mesma constituição genética da planta mãe (FROST; SOOST, 1968). Já os embriões zigóticos, originados a partir da fecundação dos gametas produzidos pelos parentais masculinos e femininos, apresentam constituição genética híbrida.

Assim, a principal desvantagem de variedades com sementes poliembriônicas se refere à dificuldade de obtenção e detecção de híbridos zigóticos nas plantas originadas de sementes germinadas, já que os embriões nucelares, geralmente em maior número e mais vigorosos, competem com o embrião zigótico podendo impedir o seu desenvolvimento e resultando na sua morte (FROST; SOOST, 1968).

Com relação à juvenilidade, o problema é o período de tempo desde a semente até o início da fase reprodutiva das plantas propagadas via sementes. Devido a esta longa juvenilidade, nos primeiros anos de cultivo, as plantas originadas de sementes geralmente são bastante vigorosas, com espinhos e folhagem abundantes e não produzem flores e nem frutos. As plantas jovens de citros quase sempre precisam de mais uma década para envelhecer e alcançar produções satisfatórias, sendo então aptas às análises de perspectivas agronômicas e econômicas, com a avaliação das suas características hortícolas e de produtividade (CAMERON; FROST, 1968).

Essas e outras características biológicas das laranjas limitam a realização de programas de melhoramento tradicional de laranjas doces por meio de cruzamentos controlados. Provavelmente por isto não há relatos na literatura de programas contínuos deste tipo no melhoramento de laranjas, no Brasil e em outros países. Este paradigma, no entanto, pode e deve ser modificado. Como pode ser verificado em espécies vegetais que também apresentam longo ciclo agrícola, em laranjas doces, programas de melhoramento por cruzamento também podem ser realizados, bastando para isto que sejam utilizadas variedades monoembriônicas (com apenas um embrião zigótico por

semente), seguido de um método eficiente de identificação de embriões zigóticos. Além disto, seria altamente desejável a utilização de parentais que apresentem ciclo juvenil curto, por possibilitar a redução de tempo, de trabalho e de custo de manutenção das plantas, para a realização de cada ciclo de recombinação e seleção.

O Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC apresenta um extenso Programa de Melhoramento Genético de Citros, sendo que duas importantes linhas de pesquisa em andamento são a caracterização dos acessos do Banco de Germoplasma (BAG-Citros) e o Melhoramento de Laranjeiras por meio de cruzamentos controlados.

A laranjeira Tobias, variedade inicialmente descrita por Dornelles (1977), tem como característica principal o fato de apresentar período juvenil curto, pois plantas desta variedade propagadas por semente apresentam florescimento a partir do primeiro ano de cultivo. Além disto, a variedade apresenta como outras características interessantes, o florescimento em várias épocas do ano e plantas com um porte mais baixo, devido à emissão de uma flor na posição terminal de cada ramo desenvolvido, o que resulta em ramos não muito longos (DORNELLES, 1977). O BAG-Citros do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC possui dois acessos semelhantes, chamados de Laranjeira Tobias (CN 1392) e Tobias T (CN 1393), sendo que não se têm informações se estas possuem outras características distintas entre si.

A laranjeira Pêra-de-Abril demonstrou ser uma variedade que produz frutos com sementes monoembriônicas, característica descrita inicialmente por Domingues et al. (2000) e confirmada por Gonzaga et al. (2006). Desde o ano de 2005, esta variedade tem sido utilizada no Programa de Melhoramento de Citros como genitor feminino em cruzamentos intraespecíficos com outras variedades de laranjas doces e em cruzamentos interespecíficos com tangerinas, tangores e outras espécies e híbridos do gênero *Citrus*.

No ano de 2006 foram obtidas duas populações de plantas resultantes do cruzamento intraespecífico das laranjas Tobias (CN 1392 e CN 1393 – com ciclo juvenil curto) e laranja Pêra-de-abril (CN 148 – com sementes monoembriônicas), formadas originalmente por 115 e 75 plantas, respectivamente. Estes cruzamentos foram planejados com o objetivo de se obter plantas híbridas de laranjeiras contendo as duas características (monoembrionia e período juvenil curto), que servirão como população base para seleção de materiais superiores (novas variedades de laranjeira) ou como genitores femininos para novos ciclos de hibridação e seleção.

Numa avaliação inicial foi possível verificar que a maioria das plantas das duas populações apresentavam características morfológicas distintas em relação ao genitor feminino, a laranjeira Pêra-de-Abril, demonstrando que possivelmente eram híbridas.

2.3 Mapeamento genético

As primeiras idéias sobre mapeamento genético surgiram com trabalhos do grupo formado por Thomas Hunt Morgan e seus colaboradores no início do século XX. Esses pesquisadores sugeriram a utilização da frequência de recombinantes como uma medida da distância entre dois genes, permitindo então a construção de mapas, nos quais a posição relativa dos genes de um determinado organismo poderia ser representada. Estas idéias se desenvolveram ao longo das décadas de 20, 30 e 40 com a participação de diversos pesquisadores como D.D. Kosambi, J.B.S. Haldane e A.R.G. Owen. Na primeira metade do século XX estes mapas, baseados em marcadores citológicos e morfológicos, foram bastante úteis, porém seu uso em programas de melhoramento de plantas foi bastante restrito. Isso se justifica pelo baixo número de genes marcadores que estavam disponíveis para a maioria das espécies de interesse, e mesmo pelo fato de que mapas relativamente completos só haviam sido construídos para espécies muito bem estudadas geneticamente como o milho (CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

No início da década de 60, as isoenzimas foram descobertas e passaram a ser usadas como marcadores bioquímicos, permitindo a construção de mapas genéticos em todas as espécies de planta. Como o número de locos detectados por esse tipo de marcador é baixo, é difícil obter uma ampla cobertura do genoma. Foi somente a partir da década de 80, com o surgimento das técnicas de análise molecular ao nível de DNA, que o número de marcadores disponíveis para realizar o mapeamento genético se tornou efetivamente grande para todas as espécies, permitindo que uma verdadeira revolução na construção de mapas genéticos para as mais variadas espécies pudesse ser realizada (CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

O método bastante usado de mapeamento utiliza a frequência de recombinação para determinar a distância relativa entre duas características ligadas. O princípio do mapeamento genético é que a frequência de quiasmas entre dois genes ligados é de certa forma proporcional a

distância física entre ambos. A unidade de centiMorgan equivale a aproximadamente 1% de recombinação quando os marcadores estão bastante próximos, ou podem diferir da porcentagem de recombinação quando estão mais distantes em vista da ocorrência de *crossing-over* duplo, triplo, etc. Diversas funções de mapeamento tem sido utilizadas na correção das distâncias calculadas em porcentagem de recombinação para a distância em centiMorgan (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Com base na frequência de recombinação pode ser realizada uma análise para distribuição independente entre os locos segregantes para identificar pares de características ligadas. Após essa 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 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 empregados para a construção de mapas com maior precisão. Existem disponíveis diversos programas computacionais com base no método da máxima verossimilhança, tais com Linkage 1 (SUITER et al., 1983), Mapmaker (LANDER et al., 1987), GMendel (LIU; KNAPP, 1992), Joinmap (STAM, 1993), OneMap (MARGARIDO; SOUZA; GARCIA, 2007) entre outros.

O *software* JoinMap v 3.0 é utilizado para gerar mapas genéticos de ligação em populações experimentais de espécies diplóides, este programa permite a análise conjunta de marcadores segregando nas proporções 1:1, 3:1, 1:2:1 e 1:1:1:1 (VAN OOIJEN; VOORRIPS, 2001) e utiliza as frequências de recombinação média e um combinado de LOD *scores* para calcular o mapa.

O OneMap é um programa computacional desenvolvido para análises de mapas de ligação em espécies com progênes F_1 segregantes, gerando um mapa integrado. Este programa baseia-se em algoritmos propostos por Wu et al. (2002), que estima simultaneamente as distâncias e as fases de ligação dos marcadores. O agrupamento das marcas é realizado através de testes de dois pontos entre marcas com conversão pelo algoritmo EM (*expectation maximization algorithm*) para o cálculo das frações de recombinação. A ordenação das marcas se dá através de abordagem multiponto com verossimilhança pelo modelo markoviano oculto (LHMM ou *Likelihood Hidden Markov Model*).

Para a construção dos mapas genéticos alguns requisitos são necessários, como a escolha dos genitores e a determinação do tipo de cruzamento. Os genitores escolhidos para gerar a população de mapeamento devem ser contrastantes já que o número de marcas no mapa representa o número de caracteres contrastantes nos genitores. Em casos cujo polimorfismo é baixo pode-se realizar cruzamentos interespecíficos para se obter maior número de locos informativos (TANKSLEY et al., 1992). Além disso, deve-se levar em consideração o tipo de marcador genético. É necessário que este se apresente polimórfico, com grande número de locos detectados e tenham alto conteúdo informativo. Neste último aspecto, os marcadores codominantes levam vantagem em relação aos marcadores dominantes (CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

Os mapas genéticos são úteis em muitas áreas - localização e o mapeamento de QTLs, melhoramento por meio da seleção assistida por marcadores (SAM), estudos de sintenia e clonagem de genes com base em mapas genéticos - e passaram a representar complementos importantes a serem considerados em programas de melhoramento (LEE, 1995).

O mapeamento comparativo constitui outra importante aplicação dos mapas genéticos (FEUILLET; KELLER, 2002). A comparação das estruturas genômicas de diferentes espécies, do ponto de vista de homologia de genes e conservação de distâncias e da ordem de ligação nos cromossomos, permite melhor compreensão da evolução dos genomas. Outra utilização do mapeamento comparativo é como estratégia de obtenção de um mapa único de referência para a maioria das espécies vegetais cultivadas, pelo menos ao nível de famílias taxonômicas (CARNEIRO; VIEIRA, 2002).

Desse modo, um mapa genético saturado do genoma passou a ser a base para estudos avançados de genética, incluindo a identificação e isolamento de genes e estudos da estrutura, expressão e função desses genes, como enfatizam Oliveira et al. (2005) em seus trabalhos. Altas resoluções em regiões específicas (próximas a genes de interesse) são fundamentais para a identificação, isolamento e clonagem de genes, que vem se tornando uma realidade em espécies com mapas genéticos bem definidos (ROOSE et al., 2000).

O mapeamento genético se tornou mais frequente principalmente após o advento da tecnologia de sequenciamento de alta velocidade, que tem gerado informações abundantes sobre sequências de DNA para os genomas de muitas espécies de plantas. Com exemplo, as *Expressed Sequence Tags* (ESTs) de importantes espécies cultivadas têm sido geradas, e ferramentas

poderosas de bioinformática têm anotado milhares de sequências como genes funcionais putativos. Neste contexto, marcadores moleculares representam a tarefa de relacionar estas informações geradas de sequências de DNA com fenótipos particulares. Conseqüentemente, há uma forte demanda em melhorar técnicas de marcadores para se melhor utilizar a informação de sequências disponíveis.

Os mapas genéticos também têm importância quanto a clonagem de genes pois eles indicam seu efeito e sua posição cromossômica, permitindo a identificação de marcadores próximos à região de interesse. Com o desenvolvimento dos projetos genoma, é possível associar marcas mapeadas à genes através do sequenciamento dos fragmentos mapeados, os quais servem como ponto de partida para a comparação com sequências depositadas nos bancos, facilitando a identificação e clonagem desses genes. Além disso, os fragmentos mapeados em cada um dos grupos de ligação podem servir como sondas em ensaios de hibridação *in situ*, possibilitando a atribuição dos grupos de ligação aos cromossomos das espécies em estudo.

Vários tipos de marcadores podem ser utilizados na construção de mapas, diferindo em alguns aspectos: número de locos que pode ser detectado, graus de polimorfismo entre e dentro de acessos e características de dominância (JOSHI et al., 1999).

Dentro de marcadores chamados de dominantes têm sido utilizados principalmente o RAPD - *Random amplified polymorphic DNA* (WILLIAMS et al., 1990) e o AFLPs - *Amplified fragment length polymorphism* (VOS et al., 1995), que embora apresentem especificidade de população e sejam mais difíceis de serem aplicados em outras populações por serem bialélicos, têm como vantagens produzir grande número de bandas (muitos locos) por gel e não demandar o desenvolvimento prévio de *primers* específicos para as espécies (os marcadores gerados são distribuídos aleatoriamente no genoma).

A técnica de marcadores moleculares RAPD ajudou na construção de mapas genéticos em diversas culturas. Em citros, Oliveira et al. (2004b) obtiveram mapas genéticos de ligação de laranja Pêra e tangerina Cravo utilizando esse marcador. Em outro estudo esse marcador associado a outro marcador dominante, o AFLP, possibilitou o desenvolvimento do primeiro mapa genético para noz pecã (BEEDANAGARI et al., 2005).

Os marcadores moleculares AFLP apresentam eficiência e têm sido utilizados para determinar a localização cromossomal de fenótipos mutantes, por meio de uma estratégia de mapeamento de todo o genoma (PETERS et al., 2004). Em estudo recente, Kepiro e Roose

(2010) utilizaram o marcador AFLP para gerar marcas ligadas ao gene que controla a embrionia nuclear em um cruzamento de *Citrus maxima* e *Poncirus trifoliata*.

Outra classe de marcadores moleculares dominantes são os TRAPs - *Target region amplification polymorphism* (HU; VICK, 2003). Estes marcadores são baseados em PCR e avaliam polimorfismos de DNA próximos de regiões alvo utilizando dois *primers* de 18 nucleotídeos. Um *primer* chamado de fixo, desenhado a partir de uma sequência expressa, gerada de bancos de dados de ESTs, amplificando sequências parciais do gene candidato e um segundo *primer*, o arbitrário, formado por uma sequência arbitrária rica em AT ou GC para anelar com um *intron* ou *exon*, amplificando as demais regiões prováveis do gene candidato. A reação de amplificação por PCR geralmente produz fragmentos de DNA com aproximadamente 50-900 pb que devem ser separados por eletroforese em géis de poliacrilamida.

Esta técnica tem sido utilizada tendo como alvos genes que governam características agronômicas de interesse e apresenta grande potencial, por agregar as seguintes vantagens: alta reprodutibilidade, a simplicidade dos marcadores RAPD e a capacidade de produzir padrão de bandas semelhantes ao da técnica de AFLP (HU; VICK, 2003). Hu et al. (2003) ressaltaram que essa técnica é útil para a genotipagem de coleções de germoplasma e genes responsáveis por características agronômicas desejáveis em plantas cultiváveis. Esses autores, estudando uma hortaliça (*Lactuca sativa* L.), verificaram que a técnica TRAP além de discriminar todas as cultivares, também revelou o relacionamento evolutivo das espécies, sendo consistente com resultados anteriores obtidos por outras técnicas, como RFLPs (HU et al., 2005).

Alwala et al. (2008) utilizaram o marcador TRAP associado aos marcadores AFLP e SRAP para gerar um mapa genético em cana de açúcar. O estudo revelou que o marcador TRAP pode ser útil para o mapeamento de QTL devido a seu alvo ser regiões gênicas.

Um mapa cobrindo todo o genoma de trigo foi desenvolvido usando uma combinação de marcadores TRAP e marcadores microssatélites. O estudo obteve também marcadores TRAP baseados em regiões teloméricas, o que possibilitou a extensão de vários grupos de ligação até o fim do cromossomo (CHU et al., 2008).

Os marcadores microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR) são marcadores codominantes, multialélicos, altamente informativos, constituídos por sequências curtas de DNA repetitivo, em tandem, que são encontradas em todos os genomas eucariotos (ZHAO; KOCHERT, 1993). Segundo Li et al. (2002), os microssatélites estão distribuídos tanto em

regiões codificantes como em não-codificantes do genoma, sendo que a distribuição não-aleatória desses marcadores nos organismos é enfatizada nos trabalhos de Li et al. (2004), o que pode ser bastante interessante em trabalhos de mapeamento (FALCÃO et al., 2004).

A identificação e desenvolvimento de marcadores microssatélites têm permitido aumentar significativamente a densidade dos mapas de ligação obtidos com outros marcadores, além de possibilitar estudos de filogenia e evolução de diferentes espécies. Falcão et al. (2004) enfatizam que a vantagem adicional do desenvolvimento de microssatélites a partir de ESTs é o fato de que, ao se utilizar estes marcadores microssatélites, automaticamente regiões gênicas poderão estar sendo mapeadas. Assim, é possível que alguns destes genes mapeados possam se constituir em potenciais candidatos para funções importantes devido à sua co-localização com QTLs para características fenotípicas de importância econômica.

A utilização de marcadores codominantes na construção e saturação de mapas de ligação é de fundamental importância pois esses também permitem resolver as ambigüidades existentes na correlação entre as evidências citogenéticas e as características dos diferentes grupos de ligação (distribuição dos marcadores dentro do grupo). Estes marcadores podem ser usados como âncoras para combinar mapas de ligação obtidos em diferentes laboratórios ou com diferentes populações, gerando assim mapas genéticos que melhor representem a estrutura e organização dos diferentes grupos de ligação (KIJAS et al., 1997; SANKAR; MOORE, 2001).

O primeiro estudo a desenvolver e caracterizar um grande número de marcadores SSRs para laranja doce foi realizado por Novelli et al. (2006). Esses marcadores foram obtidos a partir de biblioteca genômica de citros, com o objetivo de avaliar a variabilidade intraespecífica para a identificação e caracterização de acessos de laranjas doces, além de comparar os padrões de diversidade genética entre eles. Quatro marcadores polimórficos foram capazes de distinguir variedades, sendo, portanto, útil para a certificação e também para a identificação de plantas zigóticas.

Pakull et al. (2009) desenvolveram o primeiro mapa genético para álamo (*Populus tremuloides* Michx.) contendo marcadores SSR. Havia apenas mapas contendo marcadores SSR para outras espécies de *Populus* e esse novo mapa permitiu comparações com o mapa genético consenso do gênero *Populus*. Em outro estudo, realizado por Celton et al. (2009), foi construído um denso mapa genético para porta-enxertos de maçã utilizando marcadores SSR. Marcadores

microssatélites foram utilizados também para identificação e mapeamento do gene *Tu* (Tuberculate fruit) em pepino (ZHANG et. al., 2010).

2.4 Mapeamento Genético em Citros

Os citros possuem características favoráveis que auxiliam a construção de mapas genéticos, quais sejam: apresentam várias espécies, todas diplóides ($2n = 9$), é possível obter híbridos interespecíficos férteis, observa-se um alto nível de polimorfismo entre espécies, em geral as plantas possuem alta heterozigosidade e genoma pequeno (OLIVEIRA et al., 2005).

Na maioria das vezes somente progênies do cruzamento entre dois genitores com certa heterozigosidade encontram-se disponíveis para estruturação de mapas de ligação. Para superar problemas dessa natureza, Grattapaglia e Sederoff (1994) propuseram a utilização de uma estratégia denominada de *pseudo-testcross*, que permite a construção de mapas de ligação com base em progênie F_1 de genitores altamente heterozigotos. Nessa abordagem, 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.

Os primeiros mapas genéticos em citros foram baseados em marcadores isoenzimáticos e RFLP. Durham et al. (1992) utilizaram duas populações segregantes (uma derivada do cruzamento intergenérico de *Citrus grandis* e *Poncirus trifoliata* e a outra, a partir do cruzamento intraespecífico entre *C. reticulata* e *C. paradisi*) para gerar o primeiro mapa de espécies frutíferas e demonstrar o potencial de combinação entre as técnicas de isoenzimas e RLFP na geração desses mapas. No mesmo ano Jarrel et al. (1992) utilizaram a mesma combinação de técnicas – isoenzimas e RFLP – para obter um mapa genético de um cruzamento entre citrumelo Sacaton (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) e citrange Troyer (*C. sinensis* x *P. trifoliata*), frequentemente usados como porta-enxerto.

Em 1994, com o advento da técnica de RAPD foi possível avançar no mapeamento de citros conseguindo-se assim uma extensão dos grupos de ligação. Uma progênie do cruzamento entre *C. grandis*. e (*C. grandis* x *P. trifoliata*) deu origem a um mapa de ligação que consistia de nove grupos de ligação contendo 109 marcas de RAPD perfazendo um comprimento total de

1.192 cM de mapa. Além da relativa saturação do mapa genético, que foi conseguida devido à associação dos marcadores RAPD com os marcadores RFLP obtidos por Durham et al. (1992), esse estudo também iniciou a identificação do QTL para tolerância ao frio e a salinidade em citros (CAI et al., 1994).

Cristofani et al. (1999) demonstraram a aplicação potencial do *pseudo-testcross* e dos marcadores RAPD para a construção de mapas de ligação em espécies de *Citrus* e gêneros relacionados. Neste trabalho foram gerados mapas para *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*, perfazendo um comprimento total de mapas de 732,32 cM e 866,88 cM, respectivamente. Como o tamanho do genoma do *Citrus* foi estimado em 1.500 a 1.700 cM, esse estudo cobriu entre 43,07 a 48,82% e 50,99 a 57,79% dos genomas de *C. sunki* e *P. trifoliata*, respectivamente. Consequentemente esses mapas necessitam de mais saturação. Além disso, foi determinado também o loco de resistência a CTV no grupo de ligação I de *Poncirus trifoliata*.

Oliveira et al. (2004b) elaboraram mapas genéticos de ligação de laranja Pêra e tangerina Cravo utilizando marcadores RAPD e a estratégia de *pseudo-testcross*. O mapa de ligação de laranja apresentou 117 marcadores distribuídos em 12 grupos de ligação, totalizando 612,1 cM e o mapa de ligação de tangerina 'Cravo' apresentou 51 marcadores distribuídos em 12 grupos de ligação, totalizando 353,3 cM. A elaboração de mapas de ligação dessas cultivares visava futuros estudos da herança da resistência à CVC, cancro cítrico e leprose. No ano seguinte, Oliveira et al. (2005) construíram um mapa genético integrado utilizando marcadores RAPD com dois tipos diferentes de segregação e a mesma população de híbridos. Como resultado, foram definidos 15 grupos de ligação no mapa, que cobriam 527 cM.

A progênie F₁ derivada do cruzamento *P. trifoliata* cv. Rubidoux e *C. sunki* foi utilizada em estudos por Siviero et al. (2002), que detectaram um QTL associado à frutificação e outro ao número de sementes por fruto no mapa de *P. trifoliata*. Essa mesma progênie foi utilizada também para a identificação de QTLs relacionados à resistência de citros a *Phytophthora gummosis*. Dois QTLs foram detectados nos grupos 1 e 5 de *P. trifoliata* e um QTL foi ligado ao grupo dois do mapa de *C. Sunki* (SIVIERO et al., 2006).

A maioria das populações usadas para o desenvolvimento de mapas genéticos era de cruzamentos envolvendo *Poncirus trifoliata* devido ao interesse em seus genes exclusivos (FANG et al., 1998; DENG et al., 2001) e na tentativa de comparação com genomas relacionados (CRISTOFANI et al., 1999; RUIZ; ASINS, 2003).

A utilização de muitos marcadores para a construção dos mapas genéticos possibilitou o mapeamento do gene de resistência à tristeza e características como nanismo, acidez do fruto, número de sementes, apomixia e resistência à salinidade (FANG; ROOSE, 1997; CRISTOFANI et al., 1999; GARCIA et al., 2000).

Os mapas genéticos de citros cobrindo todo o genoma ou genes específicos têm sido desenvolvidos ao longo das últimas décadas. Muitos desses mapas foram cobertos por uma maioria de marcadores RAPD, AFLP e/ou ISSR e por um número limitado de marcadores RFLP, SSR, SCAR, CAPS, STS ou SNP. O primeiro grupo de marcadores, usualmente dominantes, pode facilmente ser desenvolvido para uma rápida descoberta de ligação de genes específicos/QTLs ou para a construção do mapa genômico, mas eles tendem a ser interespecíficos e difíceis de aplicar a outras populações para comparação. O último grupo de marcadores (RFLP, SSR, SCAR, CAPS, STS e SNP), com alguns marcadores codominantes mais informativos, pode ser transferível entre as populações mas ainda não são pouco utilizados (CHEN et al., 2008).

Novelli et al. (2006) desenvolveram e avaliaram 279 pares de *primers* microssatélites a partir de biblioteca genômica de laranjeira doce e definiram 113 pares que apresentaram melhor padrão de bandamento. Os dados obtidos com os microssatélites podem ser úteis como ferramentas na seleção de plantas zigóticas e nucelares para vários dos cultivares de citros. Já PALMIERI et al. (2007) desenvolveram e validaram 68 *primers* de microssatélites a partir de 65.000 sequências de ESTs, obtidas do projeto anterior, chamado CitEST.

Chen et al. (2006) desenvolveram 56 marcadores EST-SSRs a partir de 2.295 sequências ESTs para mapear uma família intergenérica F_1 de *C. sinensis* e *P. trifoliata*. Comparando os microssatélites gênicos e genômicos, Varshney et al. (2005) verificaram que para uma avaliação de diversidade os SSRs genômicos são mais indicados, devido ao maior polimorfismo. A escolha do sistema mais adequado dependerá de muitos fatores, incluindo a disponibilidade de plataformas tecnológicas, custos do desenvolvimento do marcador, a capacidade de transferência entre espécies e informações de conteúdo e facilidade de documentação.

Kijas et al. (1995) estudaram a capacidade dos marcadores SSRs mostrando que há grande variação de tamanho nos locos SSRs em espécies de citros. Neste trabalho foram avaliados acessos provenientes de um cruzamento intergenérico entre limão cravo e *Poncirus trifoliata*. Dois locos SSRs foram analisados quanto à variação e herança alélica, a partir da amplificação e hibridização com a sonda TAA. Demonstrou-se com este estudo que todas as plantas da progênie

avaliada apresentaram o SSR (TAA) indicando assim, que a região flanqueadora é conservada nos diferentes genomas testados.

Outro estudo realizado pelo mesmo grupo incorporou, pela primeira vez, marcadores microssatélites aos mapas que continham apenas marcadores isoenzimáticos e RFLP. A população utilizada consistia de um cruzamento de *Citrus* com o gênero relacionado *Poncirus*. Quatorze marcadores microssatélites foram desenvolvidos e testados para serem agregados ao mapa de citros, o que ocorreu de uma forma bem sucedida demonstrando a utilidade desse tipo de marcador para análises genéticas dentro cruzamentos intergenéricos (KIJAS et al. 1997).

Em estudo desenvolvido por Chen et al. (2008) foi construído um mapa comparativo entre *Citrus sinensis* e *Poncirus trifoliata* utilizando marcadores EST-SSR. A maioria dos locos era heterozigoto para a laranja e homozigoto para *Poncirus*, fato que dificultou a cobertura de ambos os genomas igualmente. Para o genoma de *C. sinensis* houve uma cobertura de 775,8 cM enquanto que para *Poncirus* a cobertura foi de apenas 425,7 cM. Para uma maior cobertura seria necessário o desenvolvimento de mais marcadores EST-SSRs para que um número maior de locos segregantes fizesse parte do mapa de *Poncirus*.

Mais recentemente, Gulsen et al. (2010) mapearam uma população F₁ de 164 indivíduos derivada de um cruzamento entre tangerina Clementina e tangelo Orlando. Um total de 609 marcas, incluindo 385 SRAP, 97 RAPD, 95 SSR, 18 ISSR, 12 POGP e 2 RGA foram utilizados para a análise de ligação. O mapa de ligação de tangerina Clementina teve 215 marcas distribuídas em nove grupos de ligação, este mapa cobriu 858 cM com uma distância média entre as marcas adjacentes de 3,5 cM. O mapa de ligação de tangelo Orlando teve 189 marcas em nove grupos de ligação e cobriu 886 cM com uma distância média de 3,9 cM. A combinação de diferentes marcadores nos mapas de ligação conferiu uma melhor cobertura do genoma e conseqüentemente menos *gaps* nos grupos de ligação.

De acordo com Ruiz e Asins (2003) 14 mapas genéticos de *Citrus* foram publicados até o ano de 2003. Mais recentemente grupos de pesquisas do mundo inteiro desenvolveram novos mapas chegando a pouco mais de 20 até o momento. Todavia, nenhum ainda representa efetivamente todo o gênero. É difícil correlacionar e integrar os grupos de ligação identificados nesses mapas devido ao pequeno número de marcadores em comum (RUIZ; ASINS, 2003). Para que se consiga uma comparação e combinação de mapas diferentes seria necessário o desenvolvimento de um mapa de referência para um genótipo modelo, o qual deve incluir um

conjunto de marcadores altamente polimórficos que possam ser mapeados em diversas populações. O desenvolvimento desse mapa permitiria futuramente a obtenção do genoma completo da espécie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades experimentais foram desenvolvidas no Laboratório de Melhoramento de Plantas, Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), Piracicaba/SP e no Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis/SP.

3.1 Material vegetal

O material vegetal empregado no experimento foi composto por plantas das variedades parentais: laranjeira Tobias (CN 1392), laranjeira Tobias T (CN 1393) e laranjeira Pêra-de-Abril (CV148), além de duas populações de plantas F₁ resultantes de cruzamentos intraespecíficos entre a laranjeira Tobias (CN 1392 e CN 1393), que apresenta ciclo juvenil curto, e a laranjeira Pêra-de-Abril (CV 148), variedade com sementes monoembriônicas (Tabela 1). A população um constituiu-se de 87 plantas e a população dois, 59 plantas. Para as análises de mapeamento as populações foram analisadas conjuntamente totalizando 144 indivíduos.

A progênie derivada dos cruzamentos foi plantada na Fazenda Oriçanga (Grupo Fisher) no município de Mogi Guaçu, SP. As avaliações para a característica do ciclo juvenil curto foram realizadas visualizando-se o aparecimento de flor ou botões florais em cada indivíduo das populações até o mês de julho de 2010, o que perfazia o período de 36-38 meses, desde a semeadura das sementes.

Tabela 1- Número de sementes, número de sementes germinadas, número de plantas obtidas, taxa de germinação (%) e taxa de poliembrionia na germinação (%), resultantes dos cruzamentos do ano de 2006.

| <i>Cruzamentos (Pai X Mãe)</i> | <i>Nº sementes Obtidas</i> | <i>Nº Sementes Germinadas</i> | <i>Nº Plantas Obtidas</i> | <i>Taxa Germinação (%)</i> | <i>Taxa poliembrionia (%)</i> |
|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| a) CN 1392 x CV 148 | 174 | 107 | 115 | 61 | 3,0 |
| b) CN 1393 x CV 148 | 108 | 75 | 75 | 69 | 0,0 |

3.2 Coleta de dados de marcadores moleculares nas plantas da população

3.2.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de folhas frescas das plantas parentais e das plantas híbridas F₁ de acordo com a metodologia descrita por Murray e Thompson (1980), com adaptações introduzidas por Machado et al. (1996).

As folhas jovens, porém completamente desenvolvidas foram destacadas das plantas e a seguir foram lavadas e secas. Cerca de 50 mg deste tecido foram triturados em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Em seguida foram adicionados 600µL de tampão de extração (1% CTAB; 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,7M NaCl; 2% sarcosil; 2% mercaptoetanol) e foram incubados à 60°C por 30 minutos. Após o resfriamento foi adicionado ao extrato o mesmo volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), os tubos foram misturados gentilmente por 1 minuto, em seguida, centrifugados por 8 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo e homogeneizado com o mesmo volume de tampão de extração e clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), sendo novamente centrifugado por 8 minutos a 12000 rpm. Do sobrenadante resultante transferiu-se 550 µL para um novo tubo e a ele foi adicionado igual volume de isopropanol misturado gentilmente, permanecendo 30 min em repouso e, posteriormente, centrifugado por 5 min a 12000 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ao sedimentado (*pellet*) formado foi adicionado 300 µL de etanol 70%, sendo posteriormente centrifugado por 5 min a 12000 rpm.

O DNA obtido foi dissolvido em 50 µl de H₂O MiliQ contendo 10 µg/µl de RNase. As amostras de DNA foram quantificadas em fluorômetro Hoefer DyNA Quant 200.

3.2.3 Marcadores Moleculares Microssatélites (SSR)

Neste estudo foram utilizados *primers* de microssatélites de DNA genômicos desenvolvidos por Novelli et al. (2006), e *primers* de sequências de ESTs, citados por Palmieri et al. (2007). Numa primeira etapa, um total de 80 *primers* SSR, sendo 40 de origem de sequências de EST e 40 outros, de DNA genômico, foram testados e validados com DNA das plantas controle.

Dentre estes, foram escolhidos 11 pares de *primers* EST-SSR para a construção dos mapas genéticos, pois estes amplificaram padrão de bandamento nítido e com repetibilidade. Alguns *primers* de DNA genômico testados não apresentaram padrão de amplificação nítido e/ou com repetibilidade, sendo que outros apresentaram padrão monomórfico para laranja doce.

As reações de amplificação foram preparadas para volume final de 25 µl contendo 50 ng de DNA, 1,5 U de Taq DNA polimerase, tampão da reação 10X, MgCl₂ 1,0-2,0 mM, dNTP (0,2 mM) e 0,1 µM de cada “primer”. A amplificação foi conduzida em termocicladores *Applied System 9700*, programados para 30 ciclos de 94°C por 30s, 65-56°C por 30s e 72°C por 5s. A temperatura de anelamento se iniciou a 65°C, decrescendo até 0,3°C a cada ciclo seguido por 3 ciclos de anelamento a 56°C.

O tampão de carregamento contendo “Sybr Gold nucleic acid gel stain” foi adicionado aos produtos do PCR antes da eletroforese, que realizada em gel de agarose 3%, sendo, posteriormente, as bandas visualizadas e fotografadas sob luz ultravioleta.

Após a eletroforese de cada progênie com um dado par de *primers* SSR, foi anotado o padrão de bandamento de cada amostra, determinando-se as plantas heterozigotas e as plantas homozigotas com banda superior ou com banda inferior. Estes dados foram armazenados em planilha eletrônica para posterior análise.

3.2.4 Marcadores Moleculares TRAPs

Os *primers* fixos de marcadores moleculares TRAPs utilizados foram desenhados a partir dos genes diferencialmente expressos detectados nos trabalhos com hibridização *in silico* a partir da identificação da sequência no CitEST (Citrus EST) (CRISTOFANI-YALI et al., 2007), cujas sequências estão citadas na Quadro 1.

Os *primers* arbitrários foram escolhidos de acordo com o citado por Li e Quiros (2001) (Quadro 2).

Quadro 1 - Sequências de *primers* fixos utilizados para amplificar marcadores TRAPs nos híbridos das duas populações e seus parentais.

| <i>Primers</i> | <i>Gene</i> | <i>Nomenclatura</i> | <i>Seqüência (5'→3')</i> |
|----------------------|---|---------------------|--------------------------|
| <i>Primers</i> Fixos | Cinnamoyl-CoA reductase | F1 | GCCCGTGCTGCCTGATGATT |
| | | R1 | TAATCGACATAAAAGGTCCTC |
| | Caffeic acid-O-methyltransferase | F2 | ACAGGGCCAAAGGTAAACACA |
| | | R2 | CCTTTGGCCCTGTAGATGGTC |
| | ACC Synthase | 01F | TCCCCGAGGCACAGCATC |
| | | 01R | TCGGGGAGTAGCATCAAA |
| | Caffeic acid O-methyltransferase | 02F | ACAGGGCCAAAGGTAAAC |
| | | 02R | AGCGCGTCCTGGTGATGC |
| | Sucrose Synthase | 03F | CAATCGTGGCTGTCGTGA |
| | | 03R | ATATACCCAGCCAATGT |
| | Ribulose 1,5-Biphosphate Carboxylase | 04F | AATGGGGGTTTCGGTTTGT |
| | | 04R | GATCATCATGGGGGTTAC |
| | NADP-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase | 05F | ACGCGTCCGCCACTCTCA |
| | | 05R | CCTTTCCCGGTGATACAG |
| | Chlorophyll a/b-binding protein | 06F | TGGCAGCATCGTCAACT |
| | | 06R | GGAGACGGCGGGCTTAGA |
| | SRG1 | 07F | GGCACCGCACTCACCATC |
| | | 07R | TGCTCTGGTTTCGGACAA |
| | Miraculin- like protein 2 | 08F | GTGGCGAATTTTGACTGT |
| | | 08R | CGCGCCATTAGTGAGAG |
| DNAJ | 09F | GGGCGGTGATCCTGAGAA | |
| | 09R | CGCATCCTCGCCGTATTG | |
| Ein3-like | 10F | CAGTTTCTTGTTGCTACG | |
| | 10R | TGGGGAAACTCACAGGTA | |

Quadro 2 -. Seqüências de *primers* arbitrários utilizados para amplificar marcadores TRAPs nos híbridos das duas populações e seus parentais.

| <i>Primers</i> | <i>Nomenclatura</i> | <i>Seqüência (5'→3')</i> |
|----------------------------|---------------------|--------------------------|
| <i>Primers</i> Arbitrários | P1 | GACTGCGTACGAATTAAT |
| | P2 | GACTGCGTACGAATTTGC |
| | P3 | GACTGCGTACGAATTGAC |
| | P4 | GACTGCGTACGAATTTGA |
| | P5 | GACTGCGTACGAATTAAC |
| | P6 | GACTGCGTACGAATTGCA |

Inicialmente foram testadas todas as combinações possíveis de pares de *primers* disponíveis no CCSM, 24 *primers* fixos e 6 *primers* aleatórios totalizando 144. Destas combinações, foram escolhidas 25 que apresentaram padrão de bandamento mais nítido e com repetibilidade, sendo 14 *primers* fixos e 6 *primers* aleatórios.

As reações de amplificação foram conduzidas a um volume final de 15 μ L com os seguintes componentes: 1 μ L da amostra de DNA (50 ng), 1,5 μ L do tampão de reação 10 X, 1,5 μ L de $MgCl_2$ (25 mM), 1 μ L de dNTPs (5 mM), 10 nmol dos *primers* arbitrários e 10 nmol dos *primers* fixos e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase. A reação de PCR foi realizada com temperatura de desnaturação do DNA a 94°C por 2 min. A seguir, 5 ciclos a 94°C por 45 s, 35°C por 45 s, e 72°C por 1 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 s, 50°C por 45 s, e 72°C por 1 min e uma etapa de extensão a 72°C por 7 min.

Para a eletroforese dos produtos amplificados primeiramente foi realizada a desnaturação da amostra com a adição de tampão de carregamento (mesmo volume), à amostra amplificada. O tampão de carregamento é composto de formamida (a 99,8%), 0,2% de EDTA 0,5M, pH8,0 e 0,05% azul de bromofenol. A desnaturação da amostra foi realizada em termociclador a 94°C, durante 4 minutos. Uma alíquota de 5 μ L foi aplicada no gel de sequenciamento (poliacrilamida 5%).

A eletroforese foi conduzida a 1.200 V por 2,5 h em cuba vertical para eletroforese de ácidos nucléicos, tipo Sequi-Gen System da Bio Rad, sendo o gel corado com nitrato de prata, de acordo com o método descrito por Creste et al. (2001).

Após a eletroforese de cada progênie com um dado par de *primers* TRAPS, foi anotado o padrão de bandamento de todas as amostras, determinando-se em cada locus as amostras (plantas) que apresentavam a banda e as amostras que não apresentavam a banda. Estes dados foram armazenados em planilha eletrônica para posterior análise.

3.3 Tratamento dos dados e construção dos mapas de ligação

Os dados de números de plantas que floresceram no campo com três anos de idade foram inicialmente analisados estatisticamente pelo teste de qui-quadrado para se determinar o número de genes que controlam o caráter florescimento precoce em plantas de laranjeira, testando-se para hipótese de controle monogênico ou digênico.

O teste *qui*-quadrado [χ^2 ($p \leq 0,05$, $GL=1$)] (STELL; TORRIE, 1980) foi utilizado também para testar as hipóteses de segregação Mendeliana 1:2:1, nos marcadores SSR, e segregação 3:1, nos marcadores TRAPs. Para o mapeamento foram utilizados 128 locos polimórficos resultantes do marcador TRAP e 11 locos, obtidos pelo marcador SSR.

Para a construção dos mapas de ligação dois *softwares* foram utilizados: JoinMap v.3.0 e OneMap.

3.3.1 Construção do mapa genético com uso do *software* JoinMap

As 140 marcas de marcadores foram classificadas de acordo com os tipos de segregação para uma população CP (*Cross Pollinators*), proveniente de genitores heterozigotos com fase de ligação dos locos originalmente desconhecida.

Os locos provenientes dos marcadores TRAPs foram denominados como <hkxhk>, onde a presença de banda foi considerada como h- e a ausência de banda foi considerada como kk. Os locos provenientes dos marcadores SSR foram denominados como <hkxhk>, onde o indivíduo contendo duas bandas no loco (heterozigoto) era representado por hk e os indivíduos homozigotos cujo fragmento migrou menos (apenas uma banda), era representado por hh e os indivíduos homozigotos cujo o fragmento migrou mais, era representado por kk.

A característica florescimento foi classifica como <lmxll>, sendo que as plantas da progênie que apresentaram florescimento precoce foram consideradas como sendo homozigotas para o caráter, representadas pelo genótipo ll, e as plantas da progênie que não floresceram precocemente foram consideradas como sendo heterozigotas e representadas por l-. As plantas parentais não foram utilizadas nas análises

A partir destes dados foi montada uma matriz de genotipagem que continha as informações genéticas de 144 indivíduos da progênie.

Os grupos de ligação foram formados e ordenados utilizando-se $LOD \geq 4,0$ e taxa de 40% de recombinação. As frequências de recombinação, estimadas em análises multiponto, foram convertidas em distância genética (centiMorgans) através da função de Kosambi.

O mapa final foi desenhado pelo programa MapChart 2.2 (VOORRIPS, 2002)

3.3.2 Construção do mapa genético com uso do *software* OneMap

As análises de ligação na população de mapeamento F_1 e a construção do mapa genético foram realizadas também no *software* OneMap (MARGARIDO; SOUZA; GARCIA, 2007).

Assim como para o programa JoinMap, foi montada uma matriz de genotipagem contendo, para cada loco marcador, a informação alélica dos 144 indivíduos.

As 140 marcas obtidas pelos marcadores TRAPs e SSR foram nomeadas de forma diferente da usada no programa JoinMap, seguindo a anotação de Wu et al. (2002). Desse modo, os locos provenientes dos marcadores TRAPs foram denominados como C.8, onde a presença de banda foi considerada como a, e a ausência de banda foi considerada como o-. Os locos provenientes dos marcadores SSR foram denominados como B3.7, onde o indivíduo contendo

duas bandas no loco (heterozigoto) era representado por ab, e os indivíduos homozigotos cujo o fragmento migrou menos (apenas uma banda), era representado por a, e os indivíduos homozigotos cujo o fragmento migrou mais, era representado por o.

A característica florescimento foi classificada como D1.13, sendo que as plantas da progênie que apresentaram florescimento precoce foram consideradas como sendo homozigotas para o caráter, representadas pelo genótipo o, e as plantas da progênie que não floresceram precocemente foram consideradas como sendo heterozigotas e representadas por a. As plantas parentais também não foram utilizadas nas análises.

Os critérios para estabelecer os grupos de ligação foram os mesmos utilizados para o programa Join Map. O $Lod\ score \geq 4$ e a fração de recombinação $\theta = 0,40$. A distância expressa em centiMorgans (cM) foi estimada usando a função Kosambi (1944).

Após a atribuição dos marcadores nos grupos de ligação, esses foram ordenados usando diferentes funções que variavam de acordo com o tamanho de cada grupo. De modo geral, nos grupos de ligação que possuíam até seis marcadores foi utilizado o comando 'COMPARE'. Já nos grupos com número de marcadores superior a seis, as marcas foram ordenadas usando os comandos 'RCD' e 'ORDER'. Um comando denominado *touchdown* o qual executa duas rodadas do comando 'TRY.SEQ' foi utilizado dentro do comando 'ORDER'. Neste caso, os resultados de cada algoritmo foram avaliados buscando-se encontrar aquele que fornecesse a melhor ordem.

Paralelamente, as matrizes gráficas das frações de recombinação e do LOD (*heatmaps*) foram utilizadas para se determinar a ordem final das marcas nos respectivos grupos de ligação.

O mapa final foi desenhado pelo programa MapChart 2.2 (VOORRIPS, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A característica fenotípica analisada no presente trabalho foi o ciclo juvenil curto. As avaliações realizadas em estufas e no campo durante os três anos demonstraram que 42 plantas (29%) apresentaram florescimento precoce, enquanto 102 (71%) plantas não apresentaram este caráter.

Como existem milhares de variedades de laranjeira doce que não florescem precocemente, a exceção é a laranjeira Tobias que possui plantas com ciclo juvenil curto, que florescem desde o segundo ano após a semeadura das sementes e que produzem uma flor terminal em cada ramo desenvolvido (Figura 1). Então, é razoável supor que provavelmente deve ter ocorrido alguma mutação genética nesta variedade, possivelmente se tratando de mutação de um alelo dominante para um recessivo. Assim, provavelmente as plantas normais seriam heterozigotas para o caráter e as plantas mutantes (com florescimento precoce), seriam homozigotas recessivas para o caráter. A questão ainda a definir seria quantos genes controlam este caráter, o florescimento precoce.

Se se supor que apenas um gene controla o caráter, teríamos então o cruzamento do genótipo Aa (Pêra de abril - heterozigoto) com o genótipo aa (Tobias – homozigoto recessivo) sendo esperado então na progênie a proporção de 1:1. Como a segregação observada foi de 102:42 (NF:F) esta hipótese foi rejeitada pelo teste do qui-quadrado.

Então, supondo-se a hipótese de que dois genes controlam o caráter, teríamos então o cruzamento do genótipo AaBb (Pêra de abril – duplo heterozigoto) com o genótipo aabb (Tobias – duplo homozigoto recessivo) sendo esperado então na progênie a proporção de 3:1. Como a segregação observada foi de 102:42 (NF:F) esta hipótese foi testada pelo teste do qui-quadrado. Como o valor encontrado para o teste de homogeneidade de $\chi^2 = 1,33$ é menor do que o valor tabelado $\chi^2 = 3,84$ ($p = 0,05$ e GL = 1), a hipótese nula ($H_0 =$ segregação 3:1) não é rejeitada. Assim sendo, pode se concluir que frequência observada corresponde a segregação mendeliana digênica.



Figura 1 - Plantas de laranja doce: a) Laranja Tobias que possui o fenótipo de florescimento precoce; b) Laranja Pêra-de-Abril que não possui a característica

4.1 Mapas de Ligação

4.1.1 Marcadores moleculares

Por intermédio da técnica TRAP (Figura 2) das 25 combinações de *primers* testadas uma não detectou polimorfismo na progênie e as outras 24 apresentaram polimorfismo. Foi gerado um total de 128 marcas e o número médio de marcadores por par de *primers* foi de 5,3 .

As 128 marcas foram testadas para a segregação mendeliana de 3:1 pelo teste do Qui-quadrado (χ^2 , $p < 0,05$). Uma frequência de 42% dos marcadores não apresentou segregação distorcida em relação às proporções mendelianas de segregação esperadas.

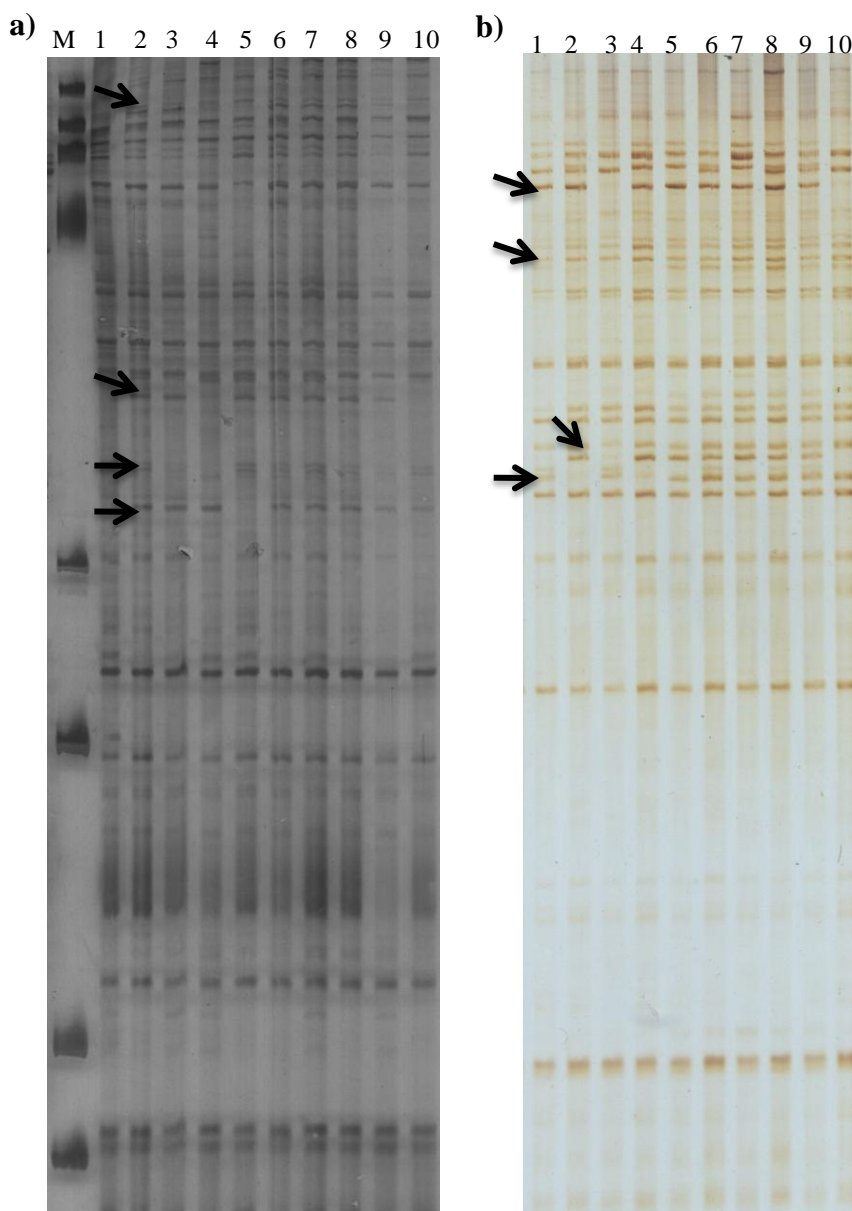


Figura 2 - Géis de poliacrilamida 5%. a) combinação dos *primers* 06R-P4, bandas polimórficas destacadas pela seta. M: Marcador molecular. 1: Laranja Pêra-de-Abril (CV148); 2: laranja Tobias (CN 1392); 3 a 10: Híbridos; b) combinação dos *primers* 01F-P2, bandas polimórficas destacadas pela seta. 1: Laranja Pêra-de-Abril (CV148); 2: laranja Tobias (CN 1392); 3 a 10: Híbridos

Miklas et al. (2006) estudaram a aplicação de marcadores TRAPs para mapeamento e localização de marcas associadas a genes de resistência a doenças em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Grande parte dos marcadores TRAPs desenvolvidos a partir de genes de resistência mapearam próximo ou dentro de *clusters* de genes relacionados à resistência a doenças. Outros, mapearam próximos a QTLs relacionados à resistência a doenças. Os autores encontraram de 1,3 a 20 marcadores TRAPs por PCR e atribuíram o alto nível de polimorfismo ao tipo de população de mapeamento. Os cruzamentos entre genitores mais distantes foram os que apresentaram maior polimorfismo para os TRAPs.

Desde que marcadores TRAP foram desenvolvidos por Hu e Vick (2003), suas aplicações foram direcionadas para acessar variabilidade genética entre girassóis (*Helianthus annuus* L.) (HU et al., 2003), em *fingerprint* em cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) (HU et al., 2005), em mapeamento de QTLs (LIU et al., 2005), entre outras. Além disso, a utilização da técnica permite o aproveitamento de informações sobre as seqüências parciais de genes candidatos para desenhar os *primers* fixos. Sendo, dessa maneira, muito relevante nas investigações de genômica vegetal. O advento do sequenciamento em larga escala gerou um montante de informações importantes de seqüências de muitos organismos. Com isso, essa é uma técnica rápida e eficiente, baseada em PCR, que utiliza ferramentas de bioinformática e base de dados de ESTs, gerando marcadores em torno de genes candidatos (HU et al., 2003).

Quanto aos marcadores microssatélites, foram avaliados 40 pares de *primers* obtidos de seqüências de ESTs e 40 obtidos a partir de DNA genômico, totalizando 80 pares, avaliados utilizando-se os dois genitores e uma amostra de sete indivíduos da progênie (Figura 3). A porcentagem de pares que apresentou polimorfismo na progênie, selecionados a partir dos SSR de bibliotecas de ESTs foi maior (55,0%) do que os selecionados das bibliotecas genômicas (20,0%). Estes *primers* genômicos não foram utilizados para o mapeamento por não apresentarem repetibilidade. Segundo a literatura, os SSR derivados de bibliotecas de ESTs têm se mostrado menos polimórficos que aqueles derivados de seqüências genômicas (SCOTT, 2001). Assim, era de se esperar maior polimorfismo de *primers* de bibliotecas genômicas. Entretanto, para o desenho dos *primers* a partir de seqüências ESTs do CitEST foi realizada uma seleção *in silico* de *primers* que apresentassem maior polimorfismo (PALMIERI et al., 2007). Para esta seleção, um PCR virtual foi simulado com varias espécies de citros; o *primer* sintetizado foi aquele polimórfico para uma ou mais espécies. *In silico* é uma expressão usada no

âmbito da simulação computacional e áreas correlatas para indicar algo ocorrido por intermédio de uma simulação computacional que modelam um processo natural ou de laboratório (DANCHIN et al., 1991). Esta seleção, provavelmente, contribuiu para o desenvolvimento de marcadores SSR mais polimórficos nas bibliotecas ESTs quando comparados aos das bibliotecas genômicas.

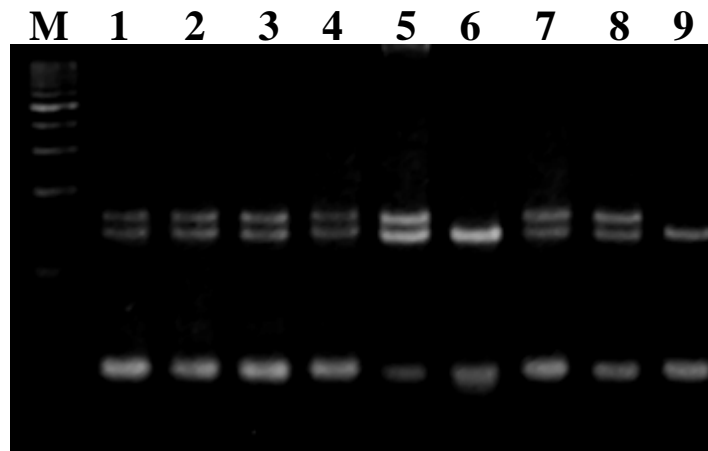


Figura 3 - Gel de agarose 3%. Amplificação de fragmentos de DNA utilizando microssatélite EST CCSM60. M: Marcador molecular. 1: Laranjeira Pêra-de-Abril (CV148); 2: laranjeira Tobias (CN 1392); 3 a 9: Híbridos

Apenas 11 *primers* SSR-EST foram selecionados com base no padrão heterozigoto dos genitores, o que resultava em polimorfismos na progênie. A maioria dos marcadores microssatélites derivados de sequências genômicas não detectou polimorfismo, sendo que o padrão de bandamento dos genitores e das plantas de progênie apresentava-se sempre homozigoto. Resultados similares foram observados por Novelli et al. (2006), os quais relataram uma grande dificuldade de obter marcadores para a caracterização de algumas cultivares de citros. Nesse estudo discutiu-se que a variabilidade genética dos citros é resultado de vários fatores, como hibridização, mutação e tipo de reprodução. A baixa diversidade intraespecífica encontrada nas espécies cultivadas de laranjeiras doces contrasta com a alta variabilidade de características agrônômicas de interesse, como a época de maturação, cor e tamanho dos frutos.

Devido a esses fatores e também a falta de marcadores moleculares em citros, a distinção entre as cultivares ainda é baseada em características morfológicas, principalmente nos frutos.

Os 11 pares de *primers* SSR e 24 pares TRAPs, além de uma marca fenotípica (florescimento) resultaram em 140 marcadores polimórficos (Tabelas 2 e 3), os quais foram avaliados em um total de 144 indivíduos da progênie. A matriz de dados foi gerada com as colunas representando os diferentes indivíduos da progênie e as linhas constituindo os marcadores moleculares para posterior construção do mapa de ligação.

Em análise reunindo os marcadores selecionados SSRs e TRAPs, a hipótese nula de segregação foi testada (χ^2 , $p < 0,05$) para as proporções mendelianas esperadas (1:2:1 e 3:1) com o teste de Qui-quadrado individualmente para todos os marcadores selecionados. Os marcadores TRAP segregaram na proporção 3:1 e os marcadores microssatélites na proporção 1:2:1. Uma frequência de 60% dos marcadores apresentou segregação distorcida em relação às proporções mendelianas de segregação esperadas. Resultado semelhante foi encontrado por Oliveira et al. (2005) que observaram 61,5% de desvio de segregação em marcadores de laranja ‘Pêra’, além de um desvio de 25,5% em tangerina ‘Cravo’, quando comparado com a segregação mendeliana esperada de 1:1 ($p < 0,05$), sendo que marcadores heterozigóticos em ambos os genitores mostraram 40% de desvio de segregação esperada de 3:1 ($p < 0,05$). Em *P.trifoliata* cv Rubidoux Ruiz e Asins (2003) encontraram 39,7% dos marcadores com desvio de segregação.

A literatura relata desvios de segregação em marcadores em mapas de ligação genética em vários níveis em híbridos intergenéricos e interespecíficos com valores entre 3,9% (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994) e 100% (NIENHUIS et al., 1987). Tanksley et al. (1992) sugeriram que rearranjos cromossômicos, seleção gamética, zigótica e/ou pós-zigótica podem causar desvios de segregação em varias espécies. Segundo Ruiz e Asins (2003), a presença de fatores letais recessivos e o favorecimento de alguns alelos na seleção gamética ou aborto do embrião, por exemplo, são possíveis causadores de segregação distorcida em citros em nível gamético e zigótico.

4.1.2 Análise de ligação

As relações de ligação dos marcadores segregantes foram estabelecidas utilizando-se os programas JoinMap e OneMap.

Neste trabalho, nenhum marcador com dados perdidos foi descartado. Uma vez que o tamanho da população estudada era grande, a presença de informação para 50% dos genótipos ainda era suficiente para realizar as análises de ligação. Um ponto favorável para o *software* OneMap é que a realização de análises multipontos através da cadeia de Markov oculta possibilita, entre outras vantagens, a recuperação da informação sobre dados perdidos.

O mapa genético de ligação construído para laranja doce com o JoinMap conteve 85 (61%) marcas dispostas em 13 grupos de ligação (Figura 4). Já com o *software* OneMap 87 (62%) marcadores se ligaram em 16 grupos de ligação (Figura 5). Um total de 55 (39%) marcadores para o JoinMap e 53 (38%) marcadores para o OneMap não se ligaram nos mapas.

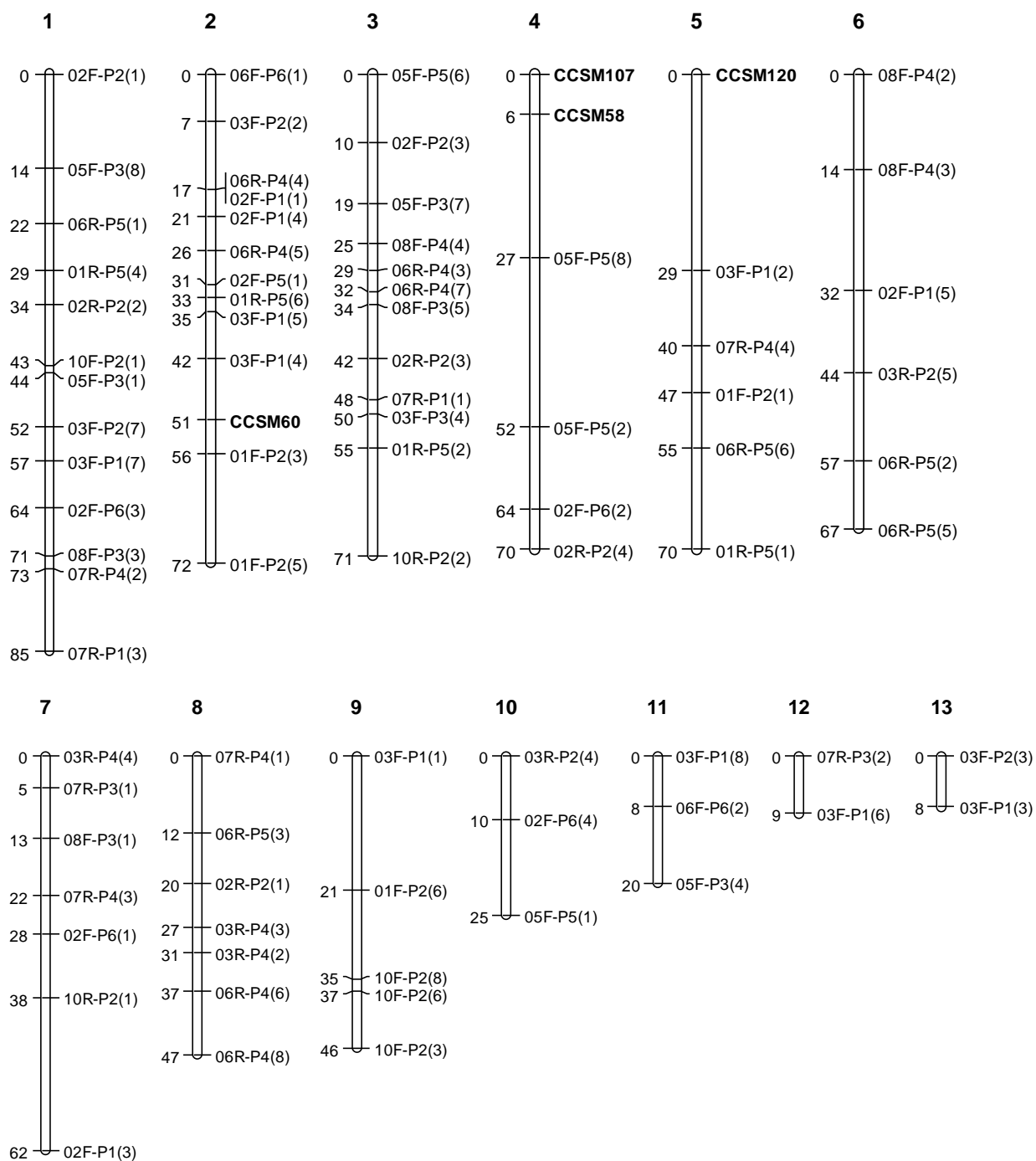


Figura 4 - Mapa de ligação de híbridos intraespecíficos de laranja doce construído pelo aplicativo JoinMap com 85 marcas dispostas em 13 grupos de ligação. Os esquemas não modificados são os TRAPs e, em negrito, são indicados os SSR

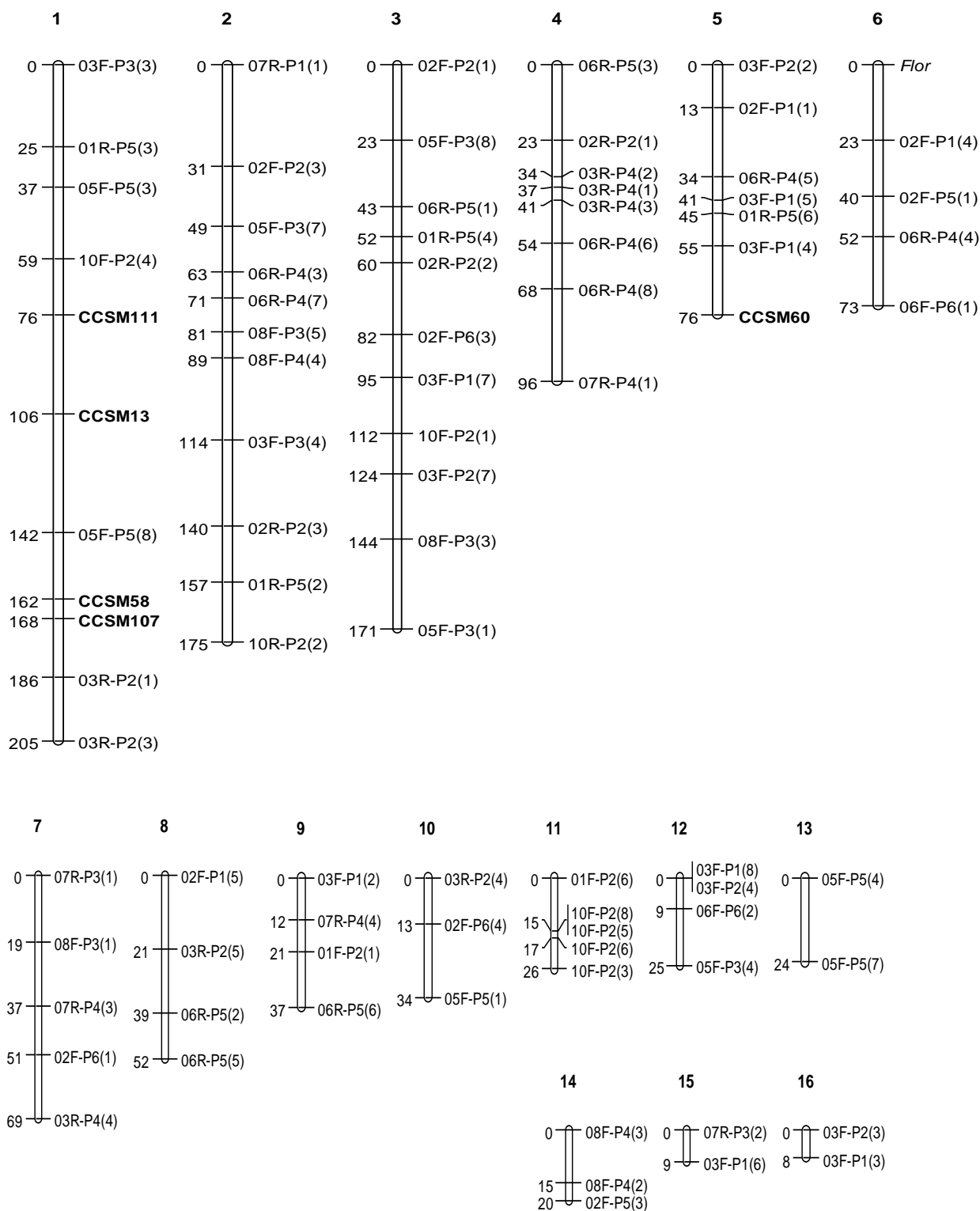


Figura 5 - Mapa de ligação de híbridos intraespecíficos de laranja doce construído pelo aplicativo OneMap com 87 marcas dispostas em 16 grupos de ligação. Os esquemas não modificados são os TRAPs; em negrito, são indicados os SSR e, em itálico, o caráter fenotípico

Tabela 2 - Número, tipo de marcadores e a distância em centimorgans (cM) de cada grupo de ligação do mapa de *Citrus sinensis* feito pelo programa JoinMap

| Grupos de ligação* | Número e tipo de marcadores | Distância cM |
|---------------------------|------------------------------------|---------------------|
| GL1 | 13 TRAP | 85 |
| GL2 | 12 TRAP e 1 SSR | 72 |
| GL3 | 12 TRAP | 71 |
| GL4 | 4 TRAP e 2 SSR | 70 |
| GL5 | 5 TRAP e 1 SSR | 70 |
| GL6 | 6 TRAP | 67 |
| GL7 | 7 TRAP | 62 |
| GL8 | 7 TRAP | 47 |
| GL9 | 5 TRAP | 28 |
| GL10 | 3 TRAP | 25 |
| GL11 | 3 TRAP | 20 |
| GL12 | 2 TRAP | 9 |
| GL13 | 2 TRAP | 8 |

*Os grupos de ligação foram numerados sequencialmente do maior para o menor.

Tabela 3 - Número, tipo de marcadores e a distância em centimorgans (cM) de cada grupo de ligação do mapa de *Citrus sinensis* feito pelo programa OneMap

| Grupos de ligação* | Número e tipo de marcadores | Distância cM |
|---------------------------|------------------------------------|---------------------|
| GL1 | 7 TRAP e 4 SSR | 205 |
| GL2 | 11 TRAP | 175 |
| GL3 | 11 TRAP | 171 |
| GL4 | 8 TRAP | 96 |
| GL5 | 6 TRAP e 1 SSR | 76 |
| GL6 | 4 TRAP e 1 FENOTÍPICO | 73 |
| GL7 | 5 TRAP | 69 |
| GL8 | 4 TRAP | 52 |
| GL9 | 4 TRAP | 37 |
| GL10 | 3 TRAP | 34 |
| GL11 | 5 TRAP | 26 |
| GL12 | 4 TRAP | 25 |
| GL13 | 2 TRAP | 24 |
| GL14 | 3 TRAP | 20 |
| GL15 | 2 TRAP | 9 |
| GL16 | 2 TRAP | 8 |

*Os grupos de ligação foram numerados sequencialmente do maior para o menor.

A distância entre os marcadores nos grupos de ligação variou de 0 (isto é, dois marcadores que co-segregam completamente ligados) a 29 cM para o programa JoinMap. Para o mapa do OneMap a distância entre marcadores foi de 0 a 36 cM. Os tamanhos individuais dos grupos de ligação variaram de 8 a 85 cM para o JoinMap e de 8 a 205 cM para o OneMap. O comprimento total dos mapas foi de 634 cM para o programa JoinMap (Tabela 5) e 1100 cM para o OneMap (Tabela 6).

O número de grupos de ligação obtido para os dois mapas com os diferentes programas foi superior ao número haplóide de cromossomos do gênero *Citrus* ($n=9$), ao se utilizar um $\text{LOD} \geq 4$ e $\theta = 0,40$. Este resultado era esperado em função dos mapas ainda não estarem saturados com marcadores. Segundo Tanksley et al. (1992), o número de grupos de ligação tende a se igualar ao número haplóide de cromossomos à medida que novos marcadores são adicionados aos mapas.

No presente trabalho, o mapa de ligação confeccionado pelo programa JoinMap apresentou um comprimento total inferior ao obtido pelo programa OneMap, utilizando os mesmos dados de segregação e critérios para o mapeamento. Proporcionalmente, o mesmo ocorreu em relação ao tamanho dos grupos de ligação. Enquanto o maior grupo com o JoinMap foi de 85 cM, com o aplicativo OneMap obteve-se um grupo de ligação de 205 cM. Oliveira (2001) comparando os *softwares* JoinMap e MapMaker, construiu mapas para laranja ‘Pêra’ e tangerina ‘Cravo’ e concluiu que eles tiveram menor comprimento com o aplicativo JoinMap. A redução do comprimento do mapa de laranja ‘Pêra’ foi de 39,2% e do mapa de tangerina ‘Cravo’ de 14,4% em relação aos mapas criados pelo programa MapMaker. As diferenças no comprimento ocorrem, principalmente, devido o JoinMap considerar a tendência de um “crossing over” prevenir a ocorrência de outros em uma mesma região do cromossomo (VAN OOIJEN; VOORRIPS, 2001), o que não é feito pelo MapMaker. Segundo Cai et al. (1994) o tamanho total de um grupo de ligação pode ser reduzido em até 50% usando o JoinMap, em vez do MapMaker. Isso foi constatado por Ruiz e Asins (2003), utilizando os dois aplicativos para comparar mapas de *Poncirus* e *Citrus*.

Três grupos de ligação obtidos pelos aplicativos JoinMap e OneMap apresentaram ordenação idêntica dos marcadores. Nos demais grupos de ligação verificou-se alguns casos com variação apenas na ordem de marcadores mapeados e outros em que ocorreram mudanças acentuadas em todo o grupo de ligação.

Os grupos de ligação com menor comprimento (8 a 34 cM e no máximo três marcadores) – GL 10, 12 e 13 do JoinMap e GL 10, 15 e 16 do OneMap – tiveram composição dos marcadores idênticos em ambos os programas. Os grupos de ligação compostos por apenas dois marcadores - GL 12 (JM) e 15 (OM); GL 13 (JM) e 16 (OM) - não apresentaram diferenças nas distâncias ao se utilizar os dois aplicativos. Um grupo de ligação de 24 cM (GL 13) com duas marcas foi exclusivo do programa OneMap. Esses grupos foram compostos por marcadores com segregação distorcida. De acordo com Oliveira et al. (2004a), em geral, os marcadores com segregação distorcida localizam-se nas extremidades dos grupos de ligação ou formando grupos inteiros, não provocando alterações significativas nas distâncias. Para o grupo de ligação 11 do JoinMap e GL 12 do OneMap encontrou-se também o mesmo perfil de marcas, porém o grupo de ligação do OneMap apresentou uma marca a mais (sem distorção) em relação aos grupos de ligação do JoinMap. O GL 9 do programa JoinMap teve correlação com o GL 11 do OneMap em quatro marcadores, uma marca exclusiva (com segregação distorcida) foi encontrada em cada um dos grupos.

Em relação aos demais grupos de ligação houve bastante semelhança entre as marcas mapeadas pelos dois *softwares*. O GL 1 do JoinMap, exceto por duas marcas exclusivas (sem distorção), se assemelha com o GL 3 do Onemap nas 11 marcas que constituem este grupo. Foi verificado correlação desde tipo também para os seguintes grupos de ligação: GL 7 do JoinMap com GL 7 do OneMap e GL 5 do JoinMap com o GL 9 do OneMap. O GL 3 confeccionado pelo JoinMap tem correlação com o GL 2 do OneMap diferindo apenas em uma marca a mais exclusiva (sem distorção). E a situação inversa ocorre com os grupos de ligação 8 (JoinMap) e 4 (OneMap), que são correlatos diferindo apenas em uma marca a mais (sem distorção) para o grupo de ligação construído pelo OneMap. As marcas do grupo 6 provenientes do programa JoinMap apareceram em dois grupos (GL 8 e 14) distintos no programa OneMap. Isso aconteceu também com o GL 2 confeccionado pelo JoinMap que teve suas marcas representadas em dois grupos distintos (GL 5 e 6) feitos pelo OneMap. Ambos os grupos confeccionados pelos dois programas tiveram marcas exclusivas, duas (com segregação distorcida) no GL 2 do JoinMap e uma marca (sem distorção) no GL 6 do OneMap.

Neste último grupo de ligação a marca distinta constituiu o caráter fenotípico florescimento. Para esta característica fenotípica aplicou-se o teste do qui-quadrado a fim de se testar a segregação desse caractere que foi de 3:1. Os demais marcadores que apareceram no GL

do caráter fenotípico podem ser utilizados para seleção precoce de híbridos que contenham a característica.

Por fim dois grupos de ligação foram bem distintos: GL 4 do JoinMap e GL 1 do OneMap. Eles apresentaram apenas três marcadores em comum e tiveram três marcas exclusivas no grupo feito pelo JoinMap e oito marcas diferentes foram encontradas no grupo do OneMap.

As diferenças na ordem dos marcadores observadas entre os mapas desenvolvidos pelo JoinMap e pelo OneMap podem ser devido às diferenças intrínsecas nos algoritmos usados para a ordenação dos marcadores. O JoinMap, um programa desenvolvido para gerar mapas genéticos de ligação em populações experimentais de espécies diplóides, utiliza as frequências de recombinação média e um combinado de LOD *scores* para calcular o mapa. A metodologia de WU et al. (2002) que é usada pelo OneMap tem um objetivo criterioso para distinguir as fases de ligação entre os marcadores com base na probabilidade posterior de cada fase de ligação. Assim, permite a estimativa simultânea da fração de recombinação e da fase de ligação, resolvendo diversas desvantagens estatísticas encontradas no JoinMap (GARCIA et al., 2006).

O tamanho do genoma de *Citrus* foi estimado entre 1.500 cM e 1.700 cM (JARREL et al., 1992), os mapas de ligação construídos no presente trabalho pelos *softwares* JoinMap e OneMap cobriram, respectivamente, de 37,3 a 42,3% e 64,7 a 73,3%.

Os dois mapas de ligação confeccionados para laranja doce tiveram o comprimento de 634 cM para o programa JoinMap e de 1100 cM para o OneMap. Oliveira et al. (2004b) relataram um mapa para laranja 'Pêra' contendo 12 grupos de ligação, totalizando 612,2 cM.

Tradicionalmente, a construção de mapas genéticos em populações F_1 tem sido conseguida usando a estratégia de pseudo-testcross, na qual a ocorrência de marcadores comuns aos dois genomas em um mesmo grupo de ligação dependerá da presença do mesmo marcador em ambos os genomas e do seu estado alélico. Enquanto ao nível interespecífico, a sobreposição é muito baixa, ao nível intraespecífico, irá aumentar à medida que indivíduos da mesma população sejam utilizados (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994). Marcadores segregando na proporção 1:1 são analisados com estatística tradicional e *softwares* como o MapMaker (LANDER et al., 1987). Entretanto estes não são apropriados para marcadores com diferentes padrões de segregação e tem a desvantagem de resultar em dois mapas de ligação separados, um para cada genitor (MARGARIDO; SOUZA; GARCIA, 2007).

Atualmente, o *software* amplamente disponível para o mapeamento em populações F_1 é o JoinMap. Esse programa encarrega-se das análises dos marcadores mostrando diferentes padrões de segregação em ambos os genitores. Entretanto, os métodos usados para ordenação das marcas nos grupos de ligação e para a estimativa da fração de recombinação são baseados em aproximações mínimas por estimativas de multipontos de distâncias e não pela abordagem de máxima verossimilhança (WU et al., 2002), que tem diversas vantagens (MARGARIDO; SOUZA; GARCIA, 2007).

Garcia et al. (2006) compararam o resultado de análises do JoinMap com a metodologia do OneMap para o mapeamento de cana de açúcar. Eles obtiveram através do OneMap, pela abordagem da verossimilhança, um mapa mais consistente cobrindo maior parte do genoma (2.602,4 cM em 131 grupos de ligação contra 1,340 cM em 98 grupos de ligação do JoinMap) com menos marcas não ligadas (no JoinMap 80,5% das marcas não se ligaram ao mapa e com o Onemap esse número caiu para 68%).

Um recurso implementado no OneMap é a análise por *heatmaps*, que teve papel importante para diagnosticar marcadores que apresentavam ligações espúrias, devido aos seus baixos valores de LOD *scores* e altas estimativas da fração de recombinação. Esses marcadores foram removidos dos respectivos grupos, resultando em melhores ordenações entre as marcas remanescentes. Isto ocorreu com os grupos de ligação 1, 7 e 9. Além disso, pelos *heatmaps* é possível visualizar a uniformidade dos grupos de ligação (Figura 6).

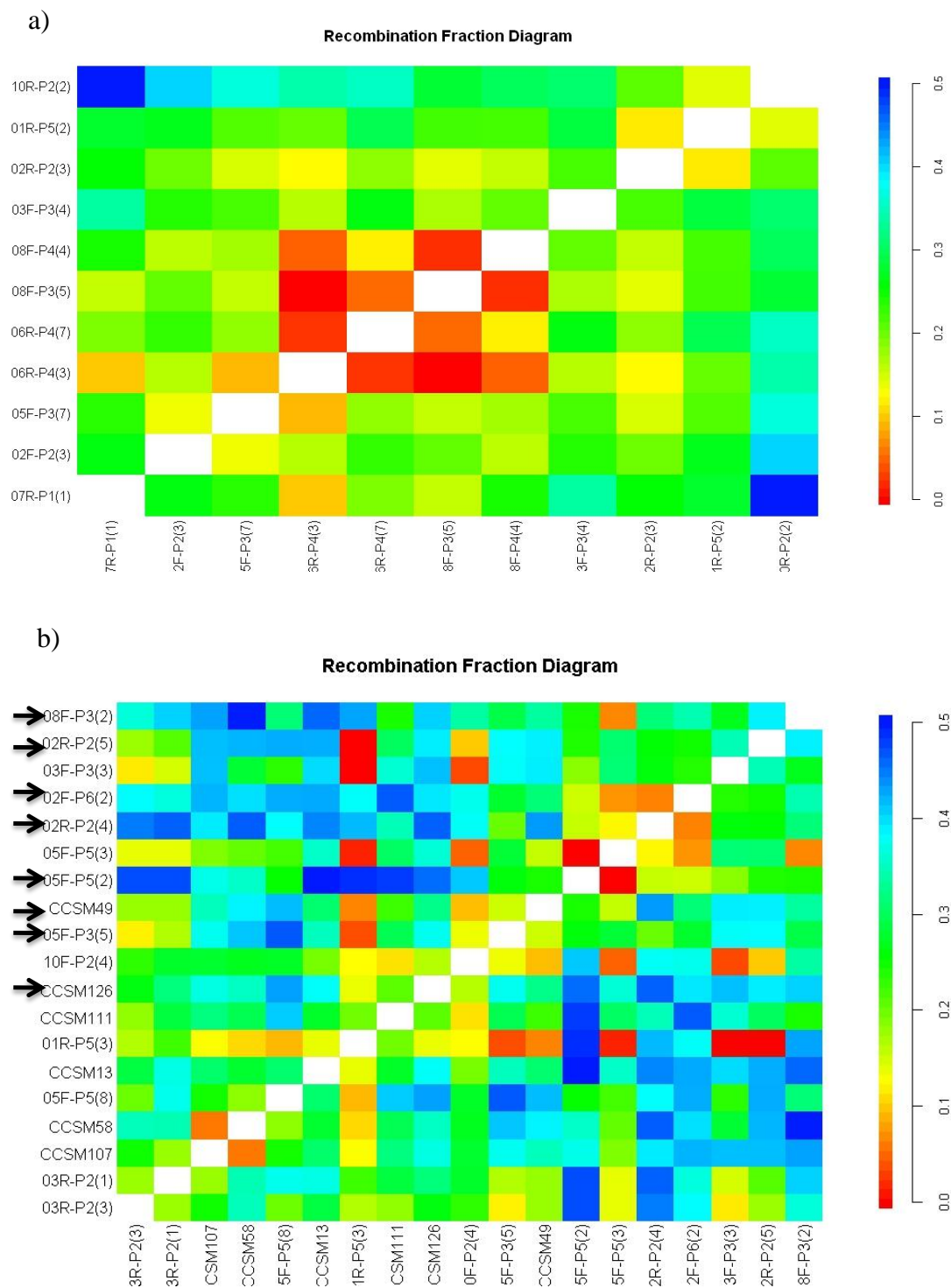


Figura 6 - *Heatmaps* para dois grupos de ligação da população de *Citrus sinensis* a) matriz gráfica do grupo de ligação 2 mostrando a uniformidade de cores decorrente da melhor ordenação obtida para os marcadores; b) marcas espúrias (setas) que, após removidas, resultou numa melhor ordem para o grupo

Os mapas de ligação gerados no trabalho, em geral, apresentaram similaridade. As diferenças encontradas são esperadas em função dos programas utilizarem procedimentos estatísticos diferentes de estimação da recombinação genética. Além disso, enquanto os mapas não forem completamente saturados, a inclusão de novos marcadores poderá proporcionar desde pequenas variações nas distâncias até mesmo mudanças na ordem dos marcadores (VAN OOIJEN; VOORRIPS, 2001). Por isso, torna-se importante a análise de dados por ambos os aplicativos de forma a permitir o conhecimento das regiões de maior e menor consistência.

O mapa de ligação deste trabalho foi o primeiro mapa genético de uma população intraespecífica de laranja doce. Além disso, foi também o primeiro estudo a aplicar o método descrito por WU et al. (2002) para construir um mapa do gênero *Citrus*. O resultado foi um mapa cobrindo maior parte do genoma de *Citrus*, cerca de 1.100 cM, que servirá de base para outros estudos e poderá ser mais saturado.

5 CONCLUSÕES

A hipótese de que dois genes controlam o caráter florescimento precoce em plantas de laranjeira Tobias foi comprovada utilizando o teste de qui-quadrado.

O primeiro mapa desenvolvido para uma população híbrida de laranja doce, englobando marcadores TRAP e SSR, foi obtido por dois *softwares* distintos. A característica fenotípica de interesse (florescimento) foi integrada ao mapa confeccionado pelo OneMap.

Houve similaridade entre os mapas de ligação de híbridos intraespecíficos de laranja doce construídos com os aplicativos JoinMap e OneMap. A distinção encontrada ocorreu, principalmente, devido aos marcadores com segregação distorcida.

Diferenças na composição dos grupos de ligação, na ordem e nas distâncias entre os marcadores foram verificadas ao se construir mapas de ligação com diferentes aplicativos.

O comprimento do mapa de ligação de híbridos intraespecíficos de laranja doce construídos com o JoinMap foi inferior ao obtido pelo OneMap.

REFERÊNCIAS

- AGRAFNP CONSULTORIA E COMÉRCIO. **Agriannual 2009**: anuário de agricultura brasileira. São Paulo, 2009. p.277-295.
- ALWALA, S.; COLLINS, A. K.; VEREMIS, J. C.; GRAVOIS, K. A. Linkage mapping and genome analysis in a *Saccharum* interspecific cross using AFLP, SRAP and TRAP markers. **Euphytica**, Wageningen, v.164, p.37-51, 2008.
- ANUÁRIO brasileiro da fruticultura 2009. Brazilian Fruit Yearbook. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2009. 136 p.
- BASTIANEL, M.; OLIVEIRA, A. C.; CRISTOFANI, M.; GUERREIRO-FILHO, O.; FREITAS-ASTÚA, J.; RODRIGUES, V.; ASTÚA-MONGE, G.; MACHADO, M. A. Inheritance and heritability of resistance to citrus leprosis. **Phytopathology**, Lancaster, v.96, p.1092-1996, 2006.
- BEEDANAGARI, S. R.; DOVE, S.K.; WOOD, B. W. A first linkage map of pecan cultivars based on RAPD and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.110, p.1127-1137, 2005.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 1997. 547p.
- 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 coldacclimation-responsive loci. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.89, p.606-614, 1994.
- CAMERON, J. W.; FROST, H. B. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1968. v.2, p.325-370.
- CARLOS, E. F.; LEMOS, E. G. M.; DONADIO, L. C. O Declínio dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.21, n. 1, p.175-203, 2000.
- CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, Campinas, v.61, p.89-100, 2002.
- CELTON, J. M.; TUSTIN, D. S.; CHAGNÉ, D.; GARDINER, S. E. Construction of a dense genetic linkage map for apple rootstocks using SSRs developed from *Malus* ESTs and *Pyrus* genomic sequences. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v.5, p.93-107, 2009.
- CHEN, C.; ZHOU, P.; CHOL, Y. A.; HUANG, S.; GMITTER JUNIOR, F. G. Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.112, n.7, p.1248-1257, 2006.

CHEN, C.; BOWMAN, K. D.; CHOI, Y. A.; DANG, P. M.; RAO, M. N.; HUANG, S.; SONEJI, J. R.; COLLUM, G. M.; GMITTER, J. F. G. EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v.4, p.1-10, 2008.

CHU, C. G.; XU, S. S.; FRIESEN, T. L.; FARIS, J. D. Whole genome mapping in a wheat doubled haploid population using SSRs and TRAPs and the identification of QTL for agronomic traits. **Molecular Breeding**, Heidelberg, v.22, p.251-266, 2008.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeats polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gel by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, San Francisco, v.19, p.299-306, 2001.

CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of Citrus tristeza virus resistance gene. **Euphytica**, Wageningen, v.109, p.25-32, 1999.

CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A.; NOVELLI, V. M.; SOUZA, A. A.; TARGON, M. L. P. N. Construction of linkage maps of *Poncirus trifoliata* and *Citrus sunki* based on microsatellite markers. In: Proceedings of the INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE CONGRESS, 9., 2000, Orlando, Florida. **Proceedings...** Orlando, FL: Acireale, 2000. v.1, p.175-178.

CRISTOFANI-YALY, M.; BERGER, I. J.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; DORTA, S. O.; FREITAS-ASTUA, J.; SOUZA, A. A.; BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; REIS, M. S.; MACHADO, M. A. Differential expression of genes identified from *Poncirus trifoliata* tissue inoculated with CTV through EST analysis and *in silico* hybridization. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.30, p.972-979, 2007.

DANCHIN, A.; MEDIGUE, C.; GASCUEL, O.; SOLDANO, H.; HENAUT, A. From data banks to data bases. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v.142, n.7-8, p.913-916, 1991.

DENG, Z.; HUANG, S.; LING, P.; YU, C.; TAO, Q. Fine genetic mapping and BAC contig development for the Citrus tristeza virus resistance gene locus in *Poncirus trifoliata* (Raf.). **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.265, p.739-747, 2001.

DOMINGUES, E. T.; TULMANN NETO, A.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Viabilidade de pólen em clones de laranja Pêra e outras variedades assemelhadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, p.85-89, 2000.

DORNELLES, C. M. M. Laranja Tobias cultivar promissora para a indústria de sucos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 4., 1977, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1977. p.369.

DURHAM, L.; GMITTER, M. Linkage of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in Citrus. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.84, p.39-48, 1992.

ENDO, T.; SHIMADA, T.; FUJII, H.; KOBAYASHI, Y.; ARAKI, T.; OMURA, M. Ectopic expression of an FT homolog from Citrus confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). **Transgenic Research**, Dordrecht, v.14, p.703–712, 2005.

FALCAO, C. L.; PAPPAS, M. C. R.; LOURENCO, R. T.; ALENCAR, M. M.; BATISTA, A. R. S.; PAPPAS JUNIOR, G. J.; GRATTAPAGLIA, D. **Desenvolvimento e mapeamento de microssatélites derivados de ESTs em *Eucalyptus***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 8p. (Circular Técnica, 32).

FANG, D. Q.; ROOSE, M. L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.95, p.408-417, 1997.

FANG, D. Q.; FEDERICI, C. T.; ROOSE, M. L. A high-resolution map of Citrus tristeza virus resistance gene region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Genetics**, Bethesda, v.150, p.883-889, 1998.

FAO. Nutritional and health benefits of citrus fruits. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/X2650t/x2650t03.htm>>. Acesso em: 16 jul. 2010.

FEUILLET, C.; KELLER, B. Comparative Genomics in the grass family: molecular characterization of grass genome structure and evolution. **Annals of Botany**, Oxford, v.89, p.3-10, 2002.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1996. p.220.

FROST, H. B.; SOOST, R. K. Seed reproduction: development of gamets and embryos. In: WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1968. v.2, p. 290-324.

GARCIA, M. R.; ASINS, M. J.; CARBONELL, E. A. QTL analysis of yield and seed number in Citrus. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.101, p.439-487, 2000.

GARCIA, A. A. F.; KIDO, E. A.; MEZA, A. N.; SOUZA, H. M. B.; PINTO, L. R.; PASTINA, M. M.; LEITE, C. S.; DA SILVA, J. A. G.; ULIAN, E. C.; FIGUEIRA, A. V. O.; SOUZA, A. P. Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.112, n.2, p.298-314, 2006.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, Bethesda, v.137, p.170-177, 1994.

GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R. B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do triângulo mineiro. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.27, n.1, p.93, 2001.

GONZAGA, D. L.; ROCHA, G. F.; FERREIRA, L. A.; LATADO, R. R. Caracterização de acessos de laranja doce com relação ao número de sementes por frutos, número de embriões e taxa de poliembrionia do BAG-Citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19., 2006, Cabo Frio. **Frutas do Brasil**. Saúde para o mundo. Viçosa: JARD Editora, 2006. 1 CD-ROM.

GUERRA, M.; SANTOS, K. G.; SILVA, A. E. B.; EHRENDORFER, F. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantieae - a case of parallel chromosomal evolution. **American Journal of Botany**, New York, v.87, p.735-747, 2000.

GULSEN, O.; UZUN, A.; CANAN, I.; SEDAY, U.; CANIHOS, E. A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v.173, p.265-277, 2010.

HU, J.; VICK, B. A. Target Region Amplification Polymorphism: A novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.21, p.289-294, 2003.

HU, J.; SEILER, G. J.; JAN, C. C.; VICK, B. A. Assessing genetic variability among sixteen perennial *Helianthus* species using PCR-based TRAP markers. In: SUNFLOWER RESEARCH WORKSHOP, 25., 2003. **Proceedings...** Washington: USDA, Agricultural Research Service, 2003. p.16-17.

HU, J.; OCHOA, O. E.; TRUCO, M. J.; VICK, B. A. Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. **Euphytica**, Wageningen, v.144, p.225-235, 2005.

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**, New York, v.84, p.49-56, 1992.

JOSHI, S. P.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, V. S. Molecular markers in plant genome analysis. **Current Science**, Bangalore, v.77, n.2, p.230-240, 1999.

KEPIRO, J. L.; ROOSE, M. L. AFLP markers closely linked to a major gene essential for nucellar embryony (apomixis) in *Citrus maxima* x *Poncirus trifoliata*. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v.6, p.1-11, 2010.

KIJAS, J. M. H.; FOWLER, J. C. S.; THOMAS, M. R. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. **Genome**, Ottawa, v.38, p.349-55, 1995.

KIJAS, J. M. H.; THOMAS, M. R.; FOWLER, J. C. S.; ROOSE, M. L. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of citrus. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.94, p.701-706, 1997.

- LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M. J.; LINCOLN, S. E.; NEWBERG, L. A. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, Orlando, v.1, p.174-181, 1987.
- LEE, M. DNA markers and plant breeding programs. **Advances in Agronomy**, Amsterdam, v.55 p.265-344, 1995.
- LI, G.; QUIROS, C. F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.103, p.455-461, 2001.
- LI, Y.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, Malden, v.11, p.2453-2465, 2002.
- LI, Y.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; NEVO, E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.21, n.6, p.991-1007, 2004.
- LIU, D. H.; KNAPP, S. J. **Gmendel 2.0**: a software for gene mapping. Corvallis: Oregon State University, 1992.
- LIU, Z.; ANDERSON, J. A.; HU, J.; FRIESEN, T. L.; RASMUSSEN, J. B.; FARIS, J. D. A wheat intervarietal linkage map based on microsatellite and target region amplified polymorphism markers and its utility for detecting quantitative trait loci. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.111, p.782-794, 2005.
- MACHADO M. A.; COLETTA-FILHO, H. D.; TARGON, M. L. N.; POMPEU JUNIOR, J. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v.92, p.321-326, 1996.
- MARGARIDO, G. R. A.; SOUZA, A. P.; GARCIA, A. A. F. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. **Hereditas**, Lund, v.144, p.78-79, 2007.
- MIKLAS, P. N.; HU, J.; GRUNWALD, N. J.; LARSEN, K. M. Potential application of TRAP (Targeted Region Amplified Polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean. **Crop Science**, Madison, v.46, p.910-916, 2006.
- MURRAY, H. C.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v.8, p.4321-4325, 1980.
- NEVES, M. F.; LOPES, F. **Estratégias para a laranja no Brasil**. São Paulo: Editora Atlas, 2005. 225p.

NIENHUIS, J.; HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; RUGGERO, B.; SAHAEFER, A. Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with insect resistance in tomato. **Crop Science**, Madison, v.27, p.797-803, 1987.

NOVELLI, V. M.; CRISTOFANI, M.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, n.1, p.90-96, 2006.

OLIVEIRA, A.C.; GARCIA, A.N.; NOVELLI, V.M.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Identification of sexual and nucellar citrus seedlings through single and duplex PCR of simple sequence repeat *loci*. INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE CONGRESS, 9., 2000, Orlando, Florida. **Proceedings...** Orlando, FL: Acireale, 2000. v.1, p.138-141.

OLIVEIRA, R.P. **Mapeamento de laranja ‘Pêra’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e tangerina ‘Cravo’ (*C. reticulata* Blanco) por pseudo-testcross**. 2001. 181p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

OLIVEIRA, R. P.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Skewed RAPD markers in linkage maps of *Citrus*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.27, n.3, p.437-441, 2004a.

OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Genetic linkage maps of ‘Pêra’ sweet orange and ‘Cravo’ mandarin with RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.2, p.159-165, 2004b.

OLIVEIRA, R.P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Integrated genetic map of citrus base on RAPD markers. **Fruits**, Paris, v.60, p.187-193, 2005.

PAKULL, B.; GROPE, K.; MEYER, M.; MARKUSSEN, T.; FLADUNG, M. Genetic linkage mapping in aspen (*Populus tremula* L. and *Populus tremuloides* Michx.). **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v.5, p. 505-515, 2009.

PALMIERI, D. A.; NOVELLI, V. M.; BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALY, M.; ASTÚA-MONGE, G.; CARLOS, E. F.; OLIVEIRA, A. C.; MACHADO, M. A. Frequency and distribution of microsatellites from ESTs of citrus. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.30, p.1009-1018, 2007.

PETERS, J. L.; CNOPS, G.; NEYT, P.; ZETHOF, J.; CORNELIS, K.; VAN LIJSEBETTENS, M. V.; GERATS, T. An AFLP-based genome-wide mapping strategy. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.108, p.321-327, 2004.

RITTER, E.; GEBHARDT, C.; SALAMINI, F. Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. **Genetics**, Bethesda, v.125, p.645-654, 1990.

ROOSE, M. L.; CHENG, T.; KUPPER, F. Mapping the citrus genome. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.535, p.25-32, 2000.

ROOSE, M. L. Identification and use of genetic resistance and tolerance to new diseases. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Beijing, v.2, p.952-954, 2003.

RUIZ, C.; ASINS, M. J. Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.106, p.826-836, 2003.

SANKAR, A. A.; MOORE G. A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of the linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.102, p.206-214, 2001.

SCOTT, K. D. Microsatellite derived from ESTs, and their comparison with those derived by other methods. In: HENRY, R. J. (Ed.). **Plant genotyping: the DNA fingerprinting of plants**. Oxon, UK: CABI Publishing, 2001. p.225-237.

SIVIERO, A.; CRISTOFANI, M.; BOAVA, L. P.; MACHADO, M. A. Mapeamento de QTLs associados à produção de frutos e semente em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, p.741-743, 2002.

SIVIERO, A.; CRISTOFANI, M. FURTADO, E.L.; GARCIA, A.A.F.; COELHO, A.S.G.; MACHADO, M.A. Identification of QTLs associated with citrus resistance to *Phytophthora gummosis*. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v.47, n.1, p.23-38, 2006.

STAM, P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Joinmap. **The Plant Journal**, Oxford, v.5, p.739-744, 1993.

STELL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. A biometrical approach. 2. ed. New York: McGraw-Hill Book Co., 1980.

SUITER, K. A.; WENDEL, J. F.; CASE, J. S. Linkage-1: a PASCAL computer program for the detection and analysis of genetic linkage. **The Journal of Heredity**, Washington, v.74, n.3, p.203-204, 1983.

SWINGLE, W. T. The botany of Citrus and its relatives in the orange subfamily. In: WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1943. v.1, p.128-474.

SWINGLE, W. T.; REECE, P. C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1967. v.1, p.190-430.

TANKSLEY, S. D.; GANAL, M. W.; PRINCE, J. P.; de VICENT, 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**, Bethesda, v.132, p.1141-1160, 1992.

VAN OOIJEN, J. W.; VOORRIPS, R. E. **JoinMap version 3.0**: software for the calculation of genetic linkage maps (software). Wageningen: Plant Research International, 2001. p.51.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.23, n.1, p.48-55, 2005.

VOORRIPIS, R. E. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **Journal of Heredity**, Washington, v.93, p.77-78, 2002.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v.23, p.4407-4414, 1995.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

WU, R.; MA, C. X.; PAINTER, I.; ZENG, Z. B. Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species. **Theoretical Population Biology**, San Diego, v.61, p.349-363, 2002.

ZHANG, W.; HE, H.; GUAN, Y.; DU, H.; YUAN, L.; LI, Z.; YAO, D.; PAN, J.; CAI, R. Identification and mapping of molecular markers linked to the tuberculate fruit gene in the cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.120, p.645-654, 2010.

ZHAO, X.; KOCHERT, G. Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)_n microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.21, p.607-14, 1993.