



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1806-9193

Dezembro, 2006

Documentos 160

versão
ON-LINE

Biotechnologia em citros

Roberto Pedroso de Oliveira

Pelotas, RS
2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: BR 392 km 78

Caixa Postal 403 - Pelotas, RS

Fone: (53) 3275 8199

Fax: (53) 3275-8219 / 3275-8221

Home page: www.cpact.embrapa.br

E-mail: sac@cpact.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Walkyria Bueno Scivittaro

Secretária-Executiva: Joseane M. Lopes Garcia

Membros: Cláudio Alberto Souza da Silva, Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, Isabel Helena Vernetti Azambuja, Claudio José da Silva Freire, Luís Antônio Suinta de Castro, Sadi Macedo Sapper, Regina das Graças V. dos Santos

Suplentes: Daniela Lopes Leite e Luís Eduardo Corrêa Antunes

Revisores de texto: Sadi Macedo Sapper/Ana Luiza Barragana Viegas

Normalização bibliográfica: Regina das Graças Vasconcelos dos Santos

Editoração eletrônica: Oscar Castro

1ª edição

1ª impressão 2006: 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Oliveira, Roberto Pedroso de.

Biotecnologia em citros. -- Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006.
36 p. -- (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 160).

ISSN 1516-8840

1. Citros - Laranja - Limão - Tangerina - Biotecnologia - Conservação - Caracterização - Germoplasma - Diagnose de doença - Patógeno - Propagação - Resgate de embrião - Limpeza clonal - Hibridação somática - Mapeamento - Sequenciamento genético - 2. Transformação de plantas. I. Título. II. Série.

Autores

Roberto Pedroso de Oliveira

Eng. Agrôn., Dr., Pesquisador da Embrapa
Clima Temperado, BR 392, km 78
Pelotas, RS. Cx. Postal 403 - 96001-970
(rpedroso@cpact.embrapa.br)

Apresentação

Os citros, ou seja, as laranjas, as tangerinas e os limões, são as frutas mais consumidas do Brasil, estando presentes na mesa de famílias de todas as classes sociais. Em razão de sua rusticidade no campo, vêm sendo cultivadas em todos os Estados, desde em pomares caseiros a grandes plantios altamente tecnificados. Conseqüentemente, o País é o maior produtor mundial, contando com cerca de 250 milhões de plantas.

Há mais de um século, pesquisadores de vários países vêm trabalhando no melhoramento genético dos citros, buscando novas cultivares com resistência a pragas e a estresses ambientais, mais produtivas, que apresentem maior período de colheita e que produzam frutos de melhor qualidade. Nas últimas décadas, várias técnicas de biotecnologia passaram a ser utilizadas, proporcionando avanços significativos nos programas de melhoramento e de propagação de material genético certificado, servindo, inclusive, como modelo para estudos em outras espécies.

Nesse sentido, esta publicação reúne os principais avanços obtidos por meio do uso de técnicas de biotecnologia na cultura dos citros, relacionados à conservação e caracterização de germoplasma, diagnose de doenças, caracterização de

patógenos, propagação, resgate de embriões, limpeza clonal, hibridação somática, mapeamento, seqüenciamento genético e transformação de plantas.

Com isso, a Embrapa Clima Temperado contribui não só para o avanço do conhecimento científico como também para a qualificação do processo produtivo.

João Carlos Costa Gomes
Chefe-Geral
Embrapa Clima Temperado

Sumário

1. Introdução	9
2. Áreas da biotecnologia	10
2.1 Caracterização genética de germoplasma	10
2.2 Filogenia e taxonomia	12
2.3 Pré-imunização	12
2.4 Resgate de embriões	13
2.5 Seleção de híbridos e de plantas nucelares	13
2.6 Limpeza clonal	15
2.7 Micropropagação	15
2.8 Diagnose de doenças	16
2.9 Hibridação somática	16
2.10 Indução de mutantes e de variantes somaclonais	18
2.11 Mapeamento genético	19
2.12 Transformação de plantas	22
2.13 Seqüenciamento de genoma	23
3. Perspectivas	24
4. Agradecimentos	24
5. Referências bibliográficas	25

Biotecnologia em citros

Roberto Pedroso de Oliveira

Introdução

Os citros encontram-se entre as frutas mais consumidas no mundo, sendo comercializados nas formas *in natura* e industrializada. O Brasil é o maior produtor mundial, com uma população estimada em 250 milhões de plantas, distribuídas em uma área de 940 mil hectares, onde são produzidas cerca de 20 milhões de toneladas de fruta por ano. Quanto à distribuição espacial, 90% da produção nacional é obtida nos Estados de Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Rio Grande do Sul e São Paulo, havendo maior concentração nesse último. Do ponto de vista econômico, a citricultura movimenta mais de 3 bilhões de dólares por ano no País e, do ponto de vista social, gera mais de 500 mil empregos diretos.

Embora a diversidade de gêneros, espécies, cultivares e clones de citros seja muito grande, é restrito o número de cultivares utilizadas nos pomares comerciais. Este fato, associado à ocupação de extensas áreas pela cultura e pela alta plasticidade genética dos patógenos, que têm grande capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, fazem com que a citricultura brasileira seja bastante vulnerável (Oliveira et al., 2004b). Desta forma, ações de pesquisa relacionadas à potencialização do uso do germoplasma existente, ampliação da base genética dos pomares e avaliação do potencial agrônomo dos novos genótipos obtidos devem ser conduzidas para a sustentação e otimização do sistema produtivo.

Há mais de um século, a hibridação sexual e a seleção de mutações espontâneas têm sido utilizadas no melhoramento de citros, tendo sido obtidas várias cultivares de interesse agrônômico (Pompeu Jr. et al., 1983). Fatores biológicos de natureza genética e/ou botânica, relacionados à elevada heteroziguidade, natureza poliembriônica, longo ciclo reprodutivo, esterilidade de pólen e/ou estigma, incompatibilidade e depressão por endogamia, têm sido as principais limitações encontradas no desenvolvimento de cultivares de citros (Oliveira, 2001).

A partir da segunda metade do século XX, várias técnicas de biotecnologia passaram a ser utilizadas como ferramentas auxiliares nos programas de melhoramento, possibilitando: a caracterização genética e estudos de filogenia e de taxonomia; pré-imunização de laranjeiras doces contra o vírus da tristeza; resgate de embriões zigóticos; identificação precisa de híbridos; limpeza clonal de vírus, viróides e micoplasmas de plantas matrizes; micropropagação; diagnose de doenças; obtenção de híbridos somáticos por meio da fusão de protoplastos; indução de mutantes e de variantes somaclonais; mapeamento genético; seqüenciamento do genoma de citros e de seus patógenos; e geração de plantas geneticamente modificadas.

Os principais avanços obtidos e as perspectivas existentes são descritas nesta publicação.

2. Áreas da biotecnologia

2.1. Caracterização genética de germoplasma

Os *Citrus* e gêneros correlacionados, *Poncirus* e *Fortunella*, pertencem à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tendo seu centro de origem na Ásia. Em geral, compreendem espécies alógamas, sexualmente compatíveis, altamente heterozigotas e diplóides, com número de cromossomos nas células somáticas $2n = 18$ (Cameron & Frost, 1968).

A existência de um banco de germoplasma, ou seja, de uma coleção de genótipos de diferentes procedências, é fundamental para o estabelecimento de um programa de melhoramento. O Brasil possui dois dos principais bancos ativos de germoplasma (BAG) de citros existentes no mundo.

O BAG do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, localizado em Cordeirópolis, SP, conta com 1.709 introduções, distribuídas em 636 acessos de laranjeiras doce, 383 de tangerineiras e seus híbridos, 118 de limoeiros e híbridos, 45 de laranjeiras ‘Azeda’, 56 de limeiras doces, ácidas e híbridos, 46 de limoeiros ‘Cravo’ e híbridos, 13 de limoeiros ‘Rugoso’, 66 de pomeleiros, 44 de toranjeiras e híbridos, 200 de *P. trifoliata* e híbridos, e 102 de outras espécies de citros e gêneros correlacionados (Machado et al., 2005).

O BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, localizado em Cruz das Almas, BA, conta com 626 acessos, compreendendo diversas espécies e cultivares do gênero *Citrus*, além de genótipos de gêneros afins, tais como *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Severinia*.

Em função das características morfológicas serem altamente influenciadas pelas condições ambientais e de manejo das plantas, além de detectarem um baixo polimorfismo, vários tipos de marcadores isoenzimáticos e moleculares vêm sendo utilizados na caracterização genética de acessos de tangerineiras, limeiras, *P. trifoliata* e híbridos dos bancos de germoplasma, visando eliminação de duplicatas, estudos de similaridade/distância genética, nível de heretozigosidade e de evolução dos citros (Coletta Filho et al., 1998; Oliveira et al., 2001; Oliveira & Radmann, 2005). Esses estudos também são importantes para orientar a seleção de materiais promissores, a realização de novos cruzamentos e o entendimento da herança de diversos caracteres (Barbosa Neto & Bered, 1998). Por outro lado, esses marcadores não têm conseguido explicar a variabilidade fenotípica observada em laranjeiras doces e limoeiros verdadeiros (Novelli et al., 2000; Targon et al., 2000).

2.2. Filogenia e taxonomia

A filogenia e a taxonomia dos *Citrus* é bastante complexa, em função da alta variabilidade do gênero, decorrente de hibridações naturais interespecíficas, mutações espontâneas, alterações cromossômicas estruturais, apomixia e cultivo em ampla área geográfica (Oliveira & Radmann, 2005). Em função disso, sempre existiu muita divergência quanto à origem e à classificação dos *Citrus*, principalmente no que diz respeito ao número de espécies conhecidas: 159 para Tanaka (1977), 16 para Swingle & Reece (1967) e três para Barret & Rhodes (1976).

Nos últimos anos, além dos descritores morfológicos (IBPGR, 1988) e dos dados de distribuição geográfica, diversos tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados para elucidar essas questões (Federici et al., 1998). Atualmente, somente *C. medica*, *C. reticulata* e *C. grandis* têm sido aceitos como subgêneros dos *Citrus* (Machado et al., 2005). Segundo esses autores, os demais taxons desses subgêneros são híbridos naturais entre tais espécies ou entre representantes sexualmente compatíveis de outros subgêneros.

2.3. Pré-imunização

Há décadas, a pré-imunização, também conhecida por proteção cruzada, vem sendo utilizada com sucesso no controle do vírus da tristeza dos citros (CTV), que, na primeira metade do século XX, dizimou 9 milhões de laranjeiras enxertadas sobre laranjeira 'Azeda' no Brasil (Oliveira et al., 2004b).

O princípio da pré-imunização consiste em inocular plantas suscetíveis com isolados fracos do vírus, de forma a conferir um efeito protetor em relação às raças mais severas, mesmo na presença do principal vetor da doença, o pulgão preto (*Toxoptera citricidus* Kirk.). Para se ter uma idéia da aplicabilidade dessa tecnologia, em 1990, haviam mais de 80 milhões de laranjeiras pré-imunizadas no País (Müller et al., 1999).

2.4. Resgate de embriões

A hibridação por meio de cruzamentos controlados vem sendo utilizada há mais de um século no melhoramento de citros, tendo sido obtidos alguns híbridos de importância econômica (Moreira & Pio, 1991). Nesses programas, o resgate e a cultura *in vitro* de embriões zigóticos têm sido utilizados para aumentar a frequência de híbridos identificados, principalmente quando o genitor feminino é altamente poliembriônico (Soares Filho et al., 1997). Além da genética dos genitores, o número de híbridos em uma população varia em função do vigor, fatores ambientais e estado fisiológico das plantas (Cameron & Frost, 1968).

Em citros, a cultura *in vitro* de tecidos vem sendo estudada há quase quatro décadas, tendo iniciado com o estabelecimento do meio MT (Murashige & Tucker, 1969) para cultivo de tecidos nucelares. Na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, o cultivo de embriões vem sendo feito rotineiramente há mais de uma década, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com adaptações nas concentrações de sais e de vitaminas (Soares Filho et al., 1997), tendo possibilitado o resgate de milhares de híbridos.

2.5. Seleção de híbridos e de plantas nucelares

Além da reprodução sexuada por meio de auto-polinização ou polinização cruzada, muitas espécies dos gêneros *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella* são capazes de reproduzir-se agamicamente por apomixia, formando vários embriões a partir da diferenciação de células do tecido nucelar. Desta forma, além do embrião sexual, podem se formar um ou mais embriões nucelares por semente (Frost & Soost, 1968).

As linhagens nucelares são importantes por serem geneticamente idênticas à planta matriz, livres de vírus, uniformes e, geralmente, proporcionarem maior produção e longevidade do que as plantas que lhe deram origem (Spiegel-

Roy & Kochba, 1980). Praticamente todos os porta-enxertos produzidos no País são derivados de linhagens nucelares, sendo, na prática, feita a semeadura e a seleção com base em caracteres morfológicos ainda no viveiro.

Em razão dos caracteres morfológicos geralmente apresentarem natureza poligênica com herança aditiva e serem altamente influenciados pelo meio ambiente (Cameron & Frost, 1968), a identificação precisa dos híbridos vem sendo realizada por meio de marcadores bioquímicos e moleculares (Oliveira et al., 2003).

Os marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) encontram-se entre os mais recomendados para a identificação precisa e precoce de híbridos de citros (Oliveira et al., 2000). Isso ocorre em função da fácil execução, rápida obtenção de marcadores, elevado polimorfismo, possibilidade de automação, necessidade de pequena quantidade de DNA, baixo custo quando comparado a outros marcadores moleculares, ausência de hibridação e de utilização de radioisótopos e o polimorfismo ser visualizado na forma de banda amplificada de DNA visível em gel de agarose corado com brometo de etídio (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Como limitações dessa técnica, pode-se citar problemas de reprodutibilidade dos resultados, ambigüidade na interpretação de bandas, co-migração de fragmentos de tamanho igual ou muito próximo e o caráter dominante da maioria dos marcadores obtidos (Cruz & Milach, 1998). Segundo Oliveira et al. (2000), a utilização de uma única reação de RAPD é suficiente para a detecção de mais de 99% dos híbridos de determinados cruzamentos.

Além dos RAPDs, marcadores bioquímicos, ou seja, isoenzimáticos (Oliveira & Radmann, 2005), e marcadores moleculares microssatélites (SSR) (Cristofani et al., 2001) têm sido freqüentemente utilizados na seleção de híbridos.

2.6. Limpeza clonal

A utilização de material genético sadio é fundamental para o estabelecimento de programas de certificação de mudas.

A técnica da microenxertia, inicialmente aplicada em citros por Navarro et al. (1975), vem sendo utilizada na limpeza de patógenos sistêmicos de plantas matrizes há décadas, sempre associada à termoterapia para aumentar a eficiência do processo.

A microenxertia é feita inoculando-se a porção apical de um ápice caulinar de tamanho aproximado de 0,2 mm em uma incisão em forma de “T” invertido na haste de um micro-porta-enxerto estiolado produzido *in vitro* (Carvalho et al., 2005). Após o desenvolvimento do enxerto, é necessária a indexação, pois os processos de microenxertia e de termoterapia não apresentam eficiência absoluta na limpeza de vírus e viróides (Roistacher, 1985).

2.7. Micropropagação

A micropropagação ou propagação *in vitro* de citros vem sendo utilizada apenas em atividades de pesquisa, pois as plantas resultantes desse processo têm apresentado maior sensibilidade à seca e ao tombamento, em razão de não apresentarem uma raiz pivotante verdadeira e o sistema radicular ser mais superficial (Carvalho, 1992). O seu uso em pomares comerciais justifica-se apenas nos casos de disponibilidade restrita de sementes do porta-enxerto, quando são produzidas poucas sementes, como em tangerineira ‘Sunki’, ou em materiais recém obtidos pelos programas de melhoramento (Carvalho et al., 2005).

Existem vários protocolos para a propagação *in vitro* de cultivares de citros. Kobayashi et al. (2003), por exemplo, recomendam os meios de cultura MS e WPM suplementados

com 1,8 μM de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,7 μM de AG₃ (ácido giberélico).

2.8. Diagnose de doenças

Anualmente, milhões de plantas cítricas morrem no País em decorrência de problemas fitossanitários, principalmente em função da morte súbita dos citros e do declínio (Fundecitrus, 2006).

O diagnóstico preciso dessas e de outras doenças é fundamental para os programas de certificação de mudas e para a sustentação da produtividade. Desta forma, além da indexação com plantas indicadoras, testes serológicos, como o ELISA, são rotineiramente utilizados para a diagnose do vírus da tristeza, e testes moleculares, como o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e o RT-PCR, para a detecção da presença de bactérias causadoras do cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), da clorose variegada dos citros (*Xylella fastidiosa*) e do Huanglongbing (*Candidatus liberibacter* spp.), para os vírus da tristeza e da leprose (*Citrus Leprosis Virus* - CiLV) e do fungo causador da mancha-preta (*Guignardia citricarpa*) (Astua-Monge et al., 2004).

2.9. Hibridação somática

Em citros, a hibridação somática via fusão de protoplastos aplica-se tanto ao melhoramento de cultivares copa quanto de porta-enxertos. No caso do melhoramento de porta-enxertos, as aplicações referem-se, principalmente, à obtenção de híbridos alotetraplóides entre cultivares que exibam características complementares (Grosser et al., 1988a). Também pode ser utilizada com a finalidade de enriquecimento de germoplasma, por possibilitar o cruzamento entre espécies sexualmente incompatíveis (Grosser et al., 1988b).

Os híbridos somáticos obtidos são alotetraplóides, em função do processo de fusão de protoplastos ser aditivo, não

ocorrendo segregação meiótica. Por essa razão, os genes deletérios recessivos acumulados nos genitores não se expressam e as características controladas por genes dominantes ou codominantes presentes em um dos genitores podem se expressar nos híbridos (Grosser & Gmitter Jr., 1990a). Segundo Hutchison (1985), são exemplos dessas características a tolerância ao frio, resistência à gomose causada por *Phytophthora parasitica*, ao vírus da tristeza e ao nematóide *Tylenchulus semipenetrans*.

Quanto ao uso da hibridação somática no melhoramento de cultivares copa, os híbridos alotetraplóides obtidos podem ser cruzados com plantas diplóides para originarem híbridos triplóides, os quais apresentam especial interesse por não produzirem sementes (Grosser & Gmitter Jr., 1990a).

Como desvantagens dessa técnica, somente uma única combinação por cruzamento pode ser obtida por par de genitores e os híbridos somáticos gerados podem apresentar problemas de fertilidade, impossibilitando seu uso em ciclos subsequentes de hibridação sexual (Grosser & Gmitter Jr., 1990b). Alternativamente, modificações na metodologia podem ser introduzidas, visando a produção de híbridos assimétricos (Vardi et al., 1990) ou de cíbridos (Xu et al., 2004), de forma a contornar essas limitações. Os cíbridos são híbridos citoplasmáticos, que apresentam DNA nuclear de apenas um dos genitores. Já os híbridos assimétricos são híbridos somáticos resultantes da fusão de protoplastos de dois doadores, sendo que um deles não apresenta o conteúdo cromossômico completo, o que, normalmente, é conseguido por meio de tratamento com irradiação ou com mutagênico químico.

Nos dias atuais, a hibridação somática vem sendo utilizada como atividade de rotina em programas de melhoramento de citros conduzidos no Japão, Estados Unidos, França, Israel, Espanha e Brasil. Inúmeros híbridos vêm sendo obtidos, destacando-se os obtidos entre: laranja 'Trovia' e *P. trifoliata*

(Ohgawara et al., 1985), limeira ácida 'Galego' e laranjeira 'Valência' (Grosser et al., 1989), tangerineira 'Cleópatra' e laranjeira 'Azeda' (Louzada et al., 1992), 'Mexerica' e laranjeira 'Shamouti' (Ollitrault et al., 1996), laranjeira 'Succari' e tangerineira 'Dancy' (Mourão Filho et al., 1996), laranjeira 'Valência' e limoeiro 'Femminello' (Tusa & Bosco, 1996), dentre muitos outros. Atualmente, os híbridos descritos vêm sendo avaliados quanto ao potencial de uso no sistema produtivo.

No Brasil, pesquisas visando gerar híbridos somáticos resistentes ao vírus da tristeza dos citros, à morte súbita dos citros e ao declínio têm sido conduzidas na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ e no Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA (Mourão Filho, 2002).

2.10. Indução de mutantes e de variantes somaclonais

A maioria das cultivares de citros, especialmente de laranjeiras doces, são resultantes de mutação espontânea de gemas. A frequência de mutações espontâneas pode ser aumentada pelo uso de mutagênicos físicos e/ou químicos, como a radiação e a colchicina, respectivamente.

Raios gama, raios X e partículas neutron são os agentes mutagênicos físicos mais utilizados, podendo ser irradiadas praticamente todas as partes das plantas, tanto sob condições *in vivo* quanto *in vitro*. Frequentemente, a radiação induz a mutações pontuais de genes. Como exemplo de sucesso do uso da irradiação no melhoramento de citros, pode-se citar o pomeleiro 'Star Ruby', que apresenta polpa de coloração vermelha intensa (Hensz, 1981). Nos casos de formação de quimeras, ou seja, presença de células com constituição genética distinta em um mesmo tecido da planta, esta pode ser separada mediante cultura *in vitro* de tecidos.

O principal mutagênico químico utilizado em citros é a colchicina, que induz mutagênese genômica, ou seja, promove uma alteração no número de cromossomos (Machado et al.,

2005). Genótipos triploides, resultantes do cruzamento entre os tetraploides obtidos com colchicina e diplóides, apresentam grandes perspectivas no segmento de produção de frutos sem sementes (Davis & Albrigo, 1994). Além da colchicina, o 2,4-D também é bastante utilizado para induzir mutações em tecidos cultivados *in vitro*.

Durante o cultivo *in vitro* de tecidos podem ocorrer alterações genéticas nas células, principalmente nas cultivadas por longos períodos, que passaram pela fase de calo ou que foram cultivadas com doses elevadas de reguladores de crescimento, resultando em variantes somaclonais (Roca & Mroginski, 1991).

A grande limitação da técnica de indução de mutantes *in vivo* e de variantes somaclonais *in vitro* refere-se ao processo de alteração genética ser aleatório, resultando, na maioria das vezes, em mutações deletérias. Por isso, a necessidade de processos eficientes de seleção para o sucesso do programa de melhoramento por essa metodologia.

2.11. Mapeamento genético

As espécies do gênero *Citrus* reúnem características bastante favoráveis à construção de mapas genéticos de ligação. São diplóides com pequeno número haplóide de cromossomos ($n = 9$), altamente polimórficas, e possibilitam a produção de híbridos interespecíficos e intergenéricos com facilidade (Oliveira et al., 2005).

A existência de mapas genéticos de ligação saturados com marcadores moleculares consiste na base para estudos avançados de genética, podendo possibilitar a identificação e o isolamento de genes, entendimento da herança, e estudos da estrutura, expressão e função desses genes (Roose et al., 2000). Uma vez identificados e isolados, os genes podem ser clonados e transferidos para cultivares comerciais por meio da transformação genética, superando as barreiras biológicas existentes nas espécies de citros (Gmitter Jr. et al., 1996).

Para o planejamento de um programa de mapeamento genético, alguns requisitos são fundamentais, destacando-se: a) Escolha de genitores com comportamento fenotípico contrastante em relação à característica a ser mapeada; b) Reprodução sexuada controlada entre os genitores com produção de uma progênie com eventos meióticos representativos; e c) Disponibilidade de técnicas para a obtenção de centenas de marcadores com comportamento Mendeliano (Oliveira, 2001).

O desenvolvimento das técnicas de marcadores moleculares viabilizou o mapeamento genético em várias espécies, na medida em que inúmeros marcadores sem interferência ambiental puderam ser rapidamente produzidos. No mapeamento de citros, vários tipos de marcadores moleculares vêm sendo utilizados, destacando-se o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e SSR (*Simple Sequence Repeat*), os quais, geralmente, possibilitam a detecção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos diretamente ao nível de DNA, de forma a representar todo o genoma (Oliveira, 2001).

O mapeamento de espécies perenes de elevada heterozigosidade, como os citros, teve um grande impulso com o trabalho de Grattapaglia & Sederoff (1994), que propuseram a utilização da estratégia *pseudo-testcross*. Desta forma, a configuração do cruzamento pode ser inferida após a análise de segregação dos marcadores da progênie, não havendo a necessidade de ser planejada *a priori*, como em um cruzamento teste clássico. Por meio dessa estratégia, mapas de ligação de cada genitor podem ser construídos com base em marcadores que segregam na progênie e se encontram em heterozigose em um genitor e em homozigose recessiva no outro. Segundo Carlson et al. (1991), a eficiência desse procedimento é diretamente proporcional ao nível de heterozigose e à distância genética entre os genitores.

A construção de mapas de ligação é realizada pelo procedimento clássico denominado de mapeamento de três pontos, sendo os marcadores ordenados seqüencialmente em grupos de ligação, com base em dados de frequência de recombinação genética (*crossing overs*) obtidos em uma progênie. Aplicativos específicos, como o Linkage-1 (Suiter et al., 1983), MapMaker (Lander et al., 1987), GMendel (Liu & Knapp, 1992) e JoinMap (Van Ooijen & Voorrips, 2001) têm sido utilizados na construção de mapas de ligação. Em cada aplicativo, diversas funções de mapeamento, como as de Haldane (1919), Kosambi (1944) e Crow (1990) podem ser utilizadas para o cálculo das distâncias entre marcadores.

Dezenas de mapas de ligação já foram gerados em citros, destacando-se os de *C. grandis* x *P. trifoliata* (Cai et al., 1994), de *C. grandis* e de *C. reshni* x *P. trifoliata* (Luro et al., 1996), de *C. latipes* e de *C. aurantium* (Simone et al., 1998), de *C. sunki* e *P. trifoliata* (Cristofani et al., 1999), de *C. volkameriana* (Garcia et al., 1999), de 'Sacaton' x citrange 'Troyer' (Roose et al., 2000), de *C. sinensis* cv. Pêra e de *C. reticulata* cv. Cravo (Oliveira et al., 2004a), de *C. volkameriana* x *P. trifoliata* Rubidoux e de *C. aurantium* x *P. trifoliata* Flying Dragon (Ruiz & Asins, 2003).

A partir dos mapas de ligação descritos, têm-se buscado genes e/ou caracteres de locos quantitativos (QTLs – *Quantitative Trait Loci*) de tolerância a sais e ao frio (Cai et al., 1994; Moore et al., 2000), reguladores da dormência, juvenilidade e vigor (Roose et al., 1992), porte de plantas e acidez de frutos (Gmitter Jr. et al., 1996; Roose et al., 1996), resistência ao vírus da tristeza (Gmitter Jr. et al., 1996; Cristofani et al., 1999), ao nematóide *Tylenchulus semipenetrans* (Ling et al., 2000) e à gomose causada por *Phytophthora* (Siviero, 2001). Para tanto, a população segregante e os genitores devem ser avaliados quanto à resposta à característica em questão. Quando os fenótipos observados segregam de acordo com as proporções esperadas pelas leis de Mendel, marcadores genéticos associados à característica são localizados nos mapas de ligação. Uma vez identificados e isolados, esses genes podem ser clonados e

transferidos para cultivares comerciais por meio de transformação genética (Gmitter Jr. et al., 1996).

2.12. Transformação de plantas

As plantas transgênicas ou geneticamente modificadas são aquelas que expressam genes originados de outro organismo. Particularmente em citros, esta técnica apresenta grande potencial, por possibilitar a introdução de material genético em situações em que as espécies são sexualmente incompatíveis, por acelerar o processo de obtenção de cultivares melhoradas e por restringir a adição de genes indesejáveis, em função dos efeitos da heterozigose decorrente dos cruzamentos sexuais (Machado et al., 2005).

A primeira transformação genética de células de citros foi realizada no final da década de 80, tendo sido obtida a expressão e a integração de DNA exógeno em laranja doce, utilizando um sistema de protoplastos (Kobayashi & Ushimiya, 1989).

Embora o bombardeamento de partículas, técnica conhecida como biobalística, também possa ser utilizado na transformação de plantas de citros (Yao et al., 1996), o co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens* tem sido o método mais empregado. As principais vantagens desse sistema referem-se à: fácil manipulação, integração de poucas cópias do fragmento de DNA a ser transferido para a planta, baixo rearranjo no genoma, maior probabilidade de integração em região de transcrição ativa do cromossomo e alta fertilidade das plantas transgênicas obtidas (Machado et al., 2005). Na literatura também existem alguns exemplos de transformação de citros utilizando a espécie *A. rhizogenes* (Balch & Alejo, 1998).

Em se tratando da introdução de genes de importância agrônômica em espécies de citros, já existem trabalhos relacionados a: resistência ao vírus da tristeza utilizando gene

da capa protéica em laranjeiras doce e 'Azeda', limoeiro 'Galego' e pomeleiro (Gutiérrez et al., 1997; Domínguez et al., 2000; Yang et al., 2000), resistência a fungos (Peña & Navarro, 1999), resistência a solos salinos por meio do gene *HAL2* (Cervera et al., 2000), produção de frutos com número menor de sementes (Koltunow et al., 2000) e precocidade de produção com os genes *LEAFY* e *APETALA1* (Peña et al., 2001).

No Brasil, o gene que codifica a toxina sarcotoxina IA, de reconhecida ação antibacteriana, foi introduzido em laranjeira 'Pêra' (Astua-Monge et al., 2004); na cultivar Pineapple de laranjeira doce foi introduzido o gene que codifica a proteína PR-5 de tomate visando resistência a *Phytophthora citrophthora* (Fagoaga et al., 2001); e cultivares de laranjeira doce Hamlin, Valência e Pêra foram transformadas com os genes *Xa21* e *attA* com atividade antibacteriana, visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xylella fastidiosa* (Boscariol, 2004)

2.13. Seqüenciamento de genoma

O genoma consiste no conjunto de genes de um organismo. Nos últimos anos, grandes conquistas nessa área vêm sendo obtidas com o desenvolvimento da bioinformática e de métodos de seqüenciamento automático de DNA cada vez mais eficientes.

Em função do genoma dos citros ser considerado de alta complexidade e grande tamanho (0,6 pg de DNA por célula haplóide), a estratégia principal tem sido seqüenciar os principais patógenos da cultura, os quais possuem genomas mais simples (Machado et al., 2005). Desta forma, foram seqüenciados os genomas das bactérias *Xylella fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros (CVC) (Simpson et al., 2000) e da *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causadora do cancro cítrico (Silva et al., 2002), além do genoma do vírus que causa a leprose (CiLV). Este último seqüenciamento foi efetuado pela empresa brasileira *Alellyx Applied Genomics*, do

grupo Votarantim. Atualmente, com base nos resultados gerados, têm-se buscado estratégias para reduzir a patogenicidade desses organismos.

O seqüenciamento de genes utilizando informações contidas nos RNAs mensageiros, ou seja, nas seqüências ESTs (*Expressed Sequence Tags*) também tem sido realizado, buscando-se informações parciais sobre o genoma expresso de citros. Nesse aspecto, o Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” já conta com mais de 250 mil ESTs seqüenciadas, as quais podem ser utilizadas para comparações entre espécies, obtenção de marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) úteis para saturar mapas genéticos de ligação e montagem de lâminas para *microarray* visando análise funcional do genoma de citros (Machado et al., 2005).

3. Perspectivas

Um universo de perspectivas foi aberto com o desenvolvimento e aplicação de técnicas de biotecnologia, possibilitando a superação das barreiras genéticas existentes aos métodos tradicionais de melhoramento. A aplicação dessas técnicas com racionalidade e objetividade deverá proporcionar grandes avanços na busca por cultivares mais produtivas e com fatores de resistência a agentes bióticos e abióticos, cultivares estas altamente demandadas pelo sistema produtivo.

4. Agradecimentos

Ao CNPq e a FAPERGS, pelo apoio financeiro e concessão de bolsas.

5. Referências bibliográficas

- ASTUA-MONGE, G.; FREITAS-ASTUA, J.; MACHADO, M.A. Biotecnologia gera produtividade e citros sadios. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 2, p. 48-53, 2004.
- BALCH, P.M.; ALEJO, N.O. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes* transformed tissues. **Plant Cell Reports**, New York, v. 17, p. 591-596, 1998.
- BARBOSA NETO, J.F.; BERED, F. Marcadores genéticos e diversidade genética no melhoramento de plantas. In: MILACH, S.C.K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 29-40.
- BARRET, H.C.; RHODES, A.M. A numerical study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. **Systematic Botany**, Tallahassee, v. 1, p. 105-136, 1976.
- BOSCARIOL, R.L. **Transformação genética de laranja doce com os genes *manA*, *atacinaA* e *Xa21***. 2004. 102 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- CAI, Q.; GUY, C.L.; MOORE, G.A. Extension of the linkage map in *Citrus* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 89, p. 606-614, 1994.
- CAMERON, J.W.; FROST, H.B. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1968. v. 2, p. 325-370.
- CARLSON, J.E.; TULSIERAM, L.K.; GALUBITZ, J.C.; LUK, V.W.K.; KAUFFELDT, C.; RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 83, p. 194-200, 1991.

CARVALHO, S.A. Caracterização do sistema radicular do limoeiro 'Cravo' propagado pela técnica *in vitro*. In: CONGRESSO DA PÓS-GRADUAÇÃO DA ESAL, 5., 2002, Lavras. **Anais ...** Lavras: ESAL, 1992. p. 105.

CARVALHO, S.; GRAF, C.C.D.; VIOLANTE, A.R. Produção de material básico e propagação. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JR., J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; FUNDAG, 2005. p. 279-316.

CERVERA, M.; ORTEGA, C.; NAVARRO, A.; NAVARRO, L.; PENA, L. Generation of transgenic citrus plants with tolerance to salinity gene HAL2 from yeast. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 75, p. 26-30, 2000.

COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; TARGON, M.L.P.N.; MOREIRA, M.C.P.; POMPEU JR, J. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 102, p. 133-139, 1998.

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.; NOVELLI, V.M.; OTAVIANO, A.R.; SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A. Identificação de híbridos de cruzamentos interespecíficos em citros utilizando marcadores RAPD e SSR. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, p. 232-244, 2001.

J.F. Mapping functions. **Genetics**, Maryland, v. 125, p. 669-671, 1990.

CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K. Análise de RAPD. In: MILACH, S.C.K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 107-116.

DAVIES, F.S.; ALBRIGO, L.G. **Citrus**. Wallingford: CAB International, 1994. 254 p.

DOMÍNGUEZ, A.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. ***Plant Cell Reports***, New York, v. 19, n. 4, p. 427-433, 2000.

FAGOAGA, C.; RODRIGO, I.; CONEJERO, V.; HINAJEROS, C.; TUSET, J.J.; ARNAU, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Increase tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. ***Molecular Breeding***, Dordrecht, v. 7, p. 175-185, 2001.

FEDERICI, C.T.; FANG, D.Q.; SCORA, R.W.; ROOSE, M.L. Phylogenetic relationship within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. ***Theoretical and Applied Genetics***, New York, v. 96, p. 812-822, 1998.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. ***Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética***. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

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

FUNDECITRUS. Fundo de defesa da citricultura. ***Manual de morte súbita dos citros***. Araraquara, 2006. 12 p.

GARCIA, M.R.; ASINS, M.J.; FORNER, J.; CARBONELL, E.A. Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. ***Theoretical and Applied Genetics***, New York, v. 99, p. 511-518, 1999.

GMITTER JR., F.G.; XIAO, S.Y.; HUANG, S.; HU, X.L.; GARNSEY, S.M.; DENG, Z. A localized linkage map of the citrus virus resistance gene region. ***Theoretical and Applied Genetics***, New

York, v. 92, p. 688-695, 1996.

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

GROSSER, J.W.; GMITTER JR., F.G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 8, p. 339-374, 1990a.

GROSSER, J.W.; GMITTER JR., F.G. Somatic hybridization of Citrus with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. **HortScience**, Alexandria, v. 25, p. 147-151, 1990b.

GROSSER, J.W.; GMITTER JR, F.G.; CHANDLER, J.L. Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 7, p. 5-8, 1988a.

GROSSER, J.W.; GMITTER JR, F.G.; CHANDLER, J.L. Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus sinensis* and *Severinia disticha*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 75, p. 397-401, 1988b.

GROSSER, J.W.; MOORE, G.A.; GMITTER JR, F.G. Inter-specific somatic hybrid plants from the fusion of 'Key lime' (*C. aurantifolia*) with 'Valência' sweet orange (*C. sinensis*) protoplasts. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 39, p. 23-29, 1989.

GUTIÉRREZ, M.A.; LUTH, D.; MOORE, G.A. Factors affecting *Agrobacterium* mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, n. 11, p. 745-753, 1997.

HALDANE, J.B.S. The combination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linked factors.

Journal of Genetics, London, v. 8, p. 299-309, 1919.

HENSZ, R.A. Bud mutations in citrus cultivars in Texas.

Proceedings of the International Society of Citriculture, Tokyo, v. 1, p. 89-91, 1981.

HUTCHISON, D.J. Rootstock development screening and selection for disease tolerance and horticultural characteristics.

Fruit Varieties Journal, Urbana, v. 39, p. 21-25, 1985.

IBPGR - International Board for Plant Genetic Resources.

Descriptors for Citrus. Rome, 1988. 27 p.

KOBAYASHI, A.K.; BESPALHOK, J.C.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, The Hague, v. 74, n. 1, p. 99-102, 2003.

KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts by direct DNA transfer. ***Japanese Journal of Genetics***, Shizuoka, v. 64, n. 2, p. 91-97, 1989.

KOLTUNOW, A.M.; BRENANN, P.; PROTOPSALTIS, S.; NITO, N.

Regeneration of west Indian limes (*Citrus aurantifolia*)

containing genes for decreased seed set. ***Acta Horticulturae***, The Hague, v. 535, p. 81-91, 2000.

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distance from

recombination values. ***Annual Eugenetic***, v. 12, p. 172-175, 1944.

LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.;

DALY, M.J.; LINCOLN, S.E.; NEWBURG, L. MapMaker: an

interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations.

Genomics, Amsterdam, v. 1, p. 174-181, 1987.

LING, P.; DUNCAN, L.W.; ZENG, Z.; DUNN, D.; HU, X.; HUANG, S.; GMITTER JR., F.G. Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. ***Theoretical and Applied Genetics***, New York, v. 100, p. 1010-1017, 2000.

LIU, B.H.; KNAPP, S.J. GMENDEL: a program for Mendelian segregation and linkage analysis of individual or multiple progeny populations using log-likelihood ratios. ***Journal of Heredity***, Washington, v. 81, n. 5, p. 407-418, 1992.

LOUZADA, E.S.; GROSSER, J.W.; GMITTER JR., F.G.; NIELSEN, B.; CHANDLER, J.L.; DENG, X.X.; TUSA, N. Eight new somatic hybrid citrus rootstock with potential for improved disease resistance. ***HortScience***, Alexandria, v. 27, p. 1033-1036, 1992.

LURO, F.; LAIGRET, F.; LORIEUX, M.; OLLITRAULT, P. Citrus genome mapping with molecular markers: two maps obtained by segregation analysis of progeny of one intergeneric cross. ***Proceeding of International Society of Citriculture***, Sun City, v. 2, p. 862-866, 1996.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JR., J. (Ed.). ***Citros***. Campinas: Instituto Agrônômico; FUNDAG, 2005. p. 223-277.

MOORE, G.A.; TOZLU, I.; WEBER, C.A.; GUY, C.L. Mapping quantitative trait loci for salt tolerance and cold tolerance in *Citrus grandis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. hybrid populations. ***Acta Horticulturae***, The Hague, n. 535, p. 37-45, 2000.

MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JR., J.; AMARO, A.S. (Ed.). ***Citricultura Brasileira***. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p. 116-152.

MOURÃO FILHO, F.A.A. Hibridação somática para melhoramento de porta-enxertos em São Paulo. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS, 7., 2002, Bebedouro. **Anais ...** Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, 2002. p. 134.

MOURÃO FILHO, F.A.A.; GMITTER JÚNIOR, F.G.; GROSSER, J.W. New tetraploid breeding parents for triploid seedlings citrus cultivar development. **Fruit Varieties Journal**, Urbana, v. 50, p. 76-80, 1996.

MpLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A. Trinta anos de uso do clone pré-imunizado 'Pêra IAC' na citricultura paulista. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 20, n. 2, p. 399-408, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirements of citrus tissue culture. **Proceeding of the First International Citrus Symposium**, Riverside, v. 3, p. 1155-61, 1969.

NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N.; MURADHIGE, T. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 100, p. 471-479, 1975.

NOVELLI, V.M.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Evaluation of microsatellite markers in cultivar of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.). **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 535, p. 47-50, 2000.

OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, E.; UCHIMIYA, H.; ISHII, S. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus Trifoliata*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 71, p. 1-4, 1985.

OLIVEIRA, R.P. **Mapeamento de laranja 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e tangerina 'Cravo' (*Citrus reticulata* Blanco) por pseudo-testcross**. 2001. 181 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

OLIVEIRA, R.P.; RADMANN, E.B. Genetic similarity of citrus fresh fruit market cultivars. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 332-334, 2005.

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, 2004a.

OLIVEIRA, R.P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Integrated genetic map of citrus based on RAPD markers. **Fruits**, Paris, v. 60, n. 3, p. 187-193, 2005.

OLIVEIRA, R.P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Marcadores RAPD para mapeamento genético e seleção de híbridos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 477-481, 2001.

OLIVEIRA, R.P.; NOVELLI, V.M.; MACHADO, M.A. Frequência de híbridos em cruzamento entre tangerina 'Cravo' e laranja 'Pêra': análise de marcadores morfológicos e RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 9, p. 1895-1903, 2000.

OLIVEIRA, R.P.; RADMANN, E.B.; AUGUSTIN, E. Genetic characterization of new varieties and hybrids of citrus table fruit through isoenzymes. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 77-82, 2003.

OLIVEIRA, R.P.; SCIVITTARO, W.B.; JOÃO, P.L.; SOUZA, E.L.S. **Características dos principais porta-enxertos recomendados para citros no Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004b. 6 p. (Embrapa Clima Temperado. Comunicado Técnico, 128).

OLLITRAULT, P.; SUDAHONO, D.D.; LURO, F. Somatic hybridization in *Citrus*: some new hybrids and alloplasmic plants. ***Proceedings of the International Society of Citriculture***, Sun City, v. 2, p. 907-912, 1996.

PEÑA, L.; NAVARRO, L. Transgenic citrus. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). ***Biotechnology in agriculture and forestry***: transgenic trees. Berlin: Springer-Verlag, 1999. v. 8, p. 39-55.

PEÑA, L.; MARTIN-TRILLO, M.; JUAREZ, J.; PINA, J.A.; NAVARRO, L.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M. Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1, genes in citrus reduces their generation time. ***Nature Biotechnology***, New York, v. 19, p. 263-267, 2001.

POMPEU JR., J.; FIGUEIREDO, J.O.; PIO, R.M. Melhoramento de variedades copas e porta-enxertos. ***Laranja***, Cordeirópolis, v. 4, p. 305-318, 1983.

ROCA, W.M.; MROGISNKI, L.A. ***Cultivo de tejidos en la agricultura***: fundamentos e aplicaciones. Cali: CIAT, 1991. 969 p.

ROISTACHER, C.N. ***A historical review of the major graft-transmissible disease of citrus***. Riverside: FAO/Regional Office for the Near East, 1985. 89 p.

ROOSE, M.L.; CHENG, F.; FANG, D. Identification of molecular markers linked to various citrus gene using bulked segregate analysis. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 8., 1996, Sun City. ***Proceedings ...*** Sun City: International Citrus Society, 1996. v. 1, p. 100.

ROOSE, M.L.; JARRELL, D.C.; KUPPER, R.S. Genetic mapping in a *Citrus x Poncirus* F₂ population. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7., 1992, Acireale. ***Proceedings ...*** Acireale: International Citrus Society, 1992. v. 1, p. 210-213.

ROOSE, M.L.; FANG, D.; CHENG, F.S.; TAYYAR, R.I.; FEDERICI, C.T.; KUPPER, R.S. Mapping of citrus genome. ***Acta Horticulturae***, The Hague, n. 535, p. 25-32, 2000.

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.

SILVA, A.C.R.; FERRO, J.A.; REINACH, F.C.; FARAH, C.S.; FURLAN, R.L.; QUAGGIO, R.B.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; SLUYS, M.A.; ALMEIDA, N.F.; ALVES, L.M.C. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with different host specificities. ***Nature***, London, v. 417, p. 459-463, 2002.

SIMONE, M.; RUSSO, M.P.; PULEO, G.; MARSAN, P.A.; LORENZONI, C.; MAROCCO, A.; RECUPERO, G.R. Construction of genetic maps for *Citrus aurantium* and *C. latipes* based on AFLP, RAPD and RFLP markers. ***Fruits***, Paris, v. 53, p. 383-390, 1998.

SIMPSON, A.J.G. et al. The genome sequence of plant pathogen *Xylella fastidiosa*. ***Nature***, London, v. 406, p. 151-159, 2000.

SIVIERO, A. ***Avaliação de métodos de inoculação de Phytophthora parasitica e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de Citrus sunki vs. Poncirus trifoliata à gomose.*** 2001. 117 f. Tese (Doutorado em Agronomia. Área de Concentração em Fitopatologia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

SOARES FILHO, W.S.; VILARINHOS, A.D.; CUNHA SOBRINHO, A.P.C.; OLIVEIRA, A.A.R.; SOUZA, A.S.; CRUZ, J.L.; CASTRO NETO, M.T.; GUERRA FILHO, M.S.; CUNHA, M.A.P.; PASSOS, O.S.; MEISSNER FILHO, P.E.; OLIVEIRA, R.P. ***Programa de melhoramento genético de citros da Embrapa-CNPMPF: obtenção de híbridos.*** Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF, 1997. 17 p. (Embrapa-CNPMPF. Documentos, 74).

SPIEGEL-ROY, P.; KOCHBA, J. Embryogenesis in citrus tissue cultures. ***Advances in Biochemical Engineering***, Berlin, v. 16, p. 27-48, 1980.

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

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, 1967. v. 1, p. 190-430.

TANAKA, T. Fundamental discussion of *Citrus* classification. *Study in Citrologia*, Osaka, v. 14, p. 1-6, 1977.

TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A.; COLETTA FILHO, H.D.; CRISTOFANI, M. Genetic polymorphism of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.) varieties evaluated by random amplified polymorphic DNA. *Acta Horticulturae*, The Hague, v. 535, p. 51-54, 2000.

TUSA, N.; BOSCO, G.F. Obtaining triploid plants by crossing citrus lemon cv. Femminello 2n x 4n allotetraploid somatic hybrids. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, Sun City, v. 1, p. 133-136, 1996.

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. 51 p. + 1 CD ROM.

VARDI, A.; BLEICHMAN, S.; AVIV, D. Genetic transformation of citrus protoplasts and regeneration of transgenic plants. *Plant Science*, Limerick, v. 69, p. 199-206, 1990.

XU, X.Y.; LIU, J.H.; DENG, X.X. Production and characterization of intergeneric diploid cybrids derived from symmetric fusion between *Microcitrus papuana* Swingle and sour orange (*Citrus aurantium*). *Euphytica*, Wageningen, v. 136, n. 2, p. 115-123, 2004.

YANG, Z.N.; INGELBRECHT, I.L.; LOUZADA, E.; SKARIA, M.; MIRKOV, T.E. *Agrobacterium* mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). ***Plant Cell Reports***, New York, v. 19, p. 1203-1211, 2000.

YAO, J.; WU, J.; GLEAVE, A.P.; MORRIS, B.A.M. Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. ***Plant Science***, Limerick, v. 113, p. 175-183, 1996.