



**DISSERTAÇÃO**

**MAPEAMENTO GENÉTICO E DETECÇÃO  
DE QTLs EM UM CRUZAMENTO DE  
LIMÃO ‘CRAVO’ E CITRUMELO  
‘SWINGLE’**

**LAURA MACHADO DE FARIA**

**Campinas, SP  
2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**INSTITUTO AGRONÔMICO**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA  
TROPICAL E SUBTROPICAL**

**MAPEAMENTO GENÉTICO E DETECÇÃO DE QTLs  
EM UM CRUZAMENTO DE LIMÃO ‘CRAVO’ E  
CITRUMELO ‘SWINGLE’**

**LAURA MACHADO DE FARIA**

**Orientador: Dr. Marcos Antônio Machado**

**Co-orientadora: Dra. Mariângela Cristofani-Yaly**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de **Mestre** em Agricultura  
Tropical e Subtropical Área de  
Concentração em Melhoramento  
Genético Vegetal

Campinas S!  
Abril "##\$

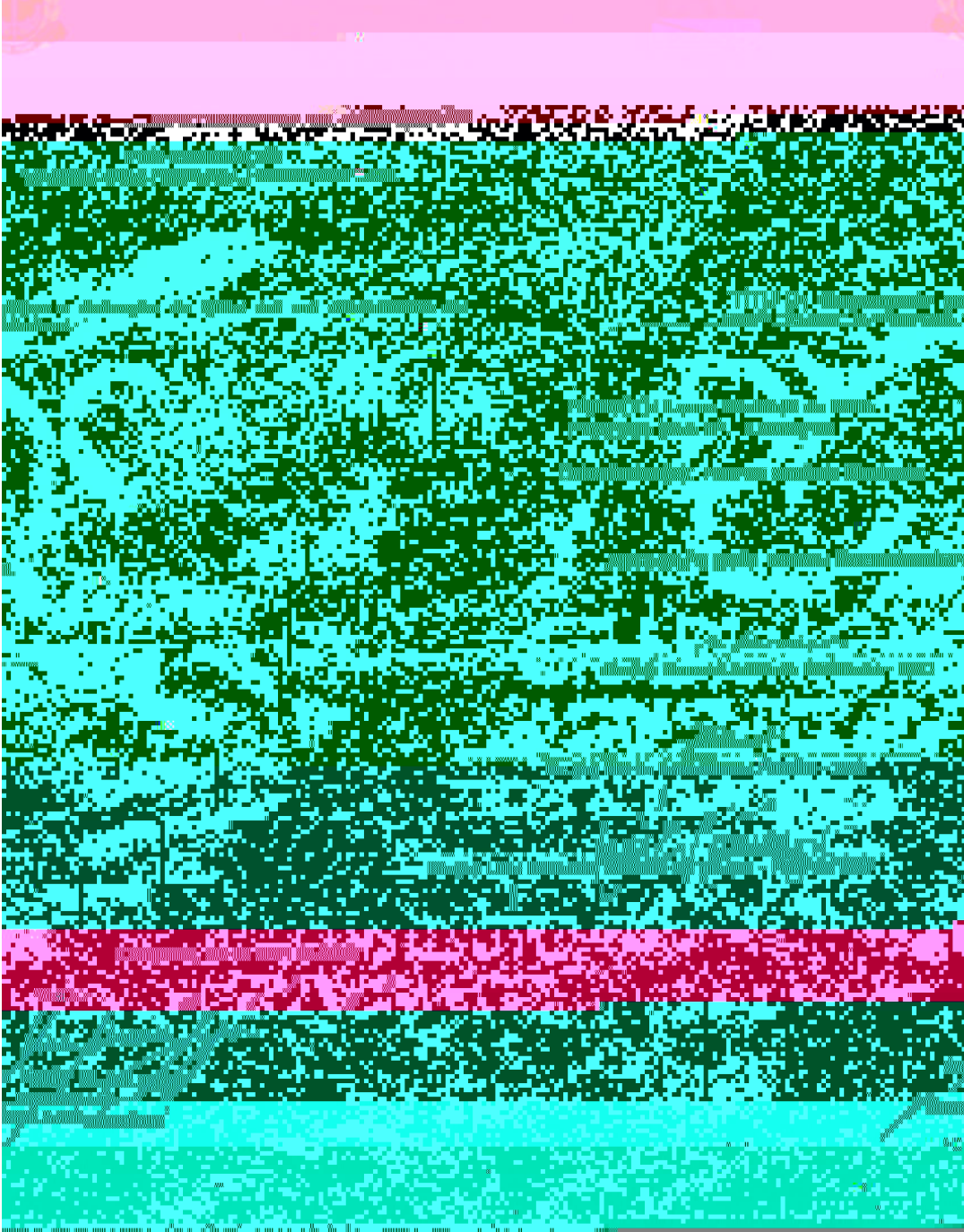
Ficha elaborada pela bibliotecária do Núcleo de Informação e documentação do Instituto Agronômico

F224m Faria, Laura Machado de  
Mapeamento genético e detecção e QTLs em um cruzamento de limão 'Cravo' e citrumelo 'Swingle' / Laura Machado de Faria.  
Campinas, 2007  
93 fls

Orientador: Dr. Marcos Antônio Machado  
Co-orientadora: Dra. Mariângela Cristofani-Yaly  
Dissertação - Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical – Instituto Agronômico

1. Limão cravo - vírus da tristeza 2. Citros - padrão foliar  
%& TRAP I. Machado, Marcos Antônio II. Cristofani-Yaly, Mariângela  
III. Campinas. Instituto Agronômico IV. Título

CDD. 634.33



' minha mãe Maria  
por me possibilitar  
com apoio e amor  
concluir este trabalho

**DEDICO**

Aos alunos(  
)o\*ens pesquisadores  
que creditam na pesquisa um amanhã  
melhor

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

- + Ao pesquisador e orientador Dr.<sup>o</sup> Marcos Antônio Machado pela oportunidade de orientação e crescimento adquiridos com seu auxílio de orientação e estímulo frente aos desafios surgidos
- + À pesquisadora e co-orientadora Dra.<sup>a</sup> Mariângela Cristófoli pelo seu apoio e ensinamentos que foram constantes e igualmente importantes para este trabalho
- + À pesquisadora Dra.<sup>a</sup> Marina Bastianel por sua importante contribuição nas análises estatísticas
- + Aos pesquisadores Drs.<sup>os</sup> Luis Eduardo Aranha Camargo e Maria Imaculada Sacchi pelas observações enriquecedoras : dissertação como membros examinadores
- + Ao meu pai, pelas canções inspiradas que tocamos e cantamos juntos : as minhas memórias pela amizade e histórias que impulsionaram meus sonhos e minhas esperanças
- + À Sueloni pela divertida companhia e auxílio pontual no desenvolvimento das etapas finais e experimentais deste trabalho
- + Aos colegas de laboratório Carol Fernanda, Laísa, Francineide, Juliana, Eli Mariana, Marcelo, Paulo, Rafael, Aquel, Thiago e Vandeclei pelos momentos de conhecimentos compartilhados e pela amizade
- + Às colegas Dras.<sup>as</sup> Andréa e Andréia e ao Dr.<sup>o</sup> Berghem pelas discussões científicas e prática profissional principalmente na etapa de finalização do mestrado
- + À toda a equipe de pesquisadores aos funcionários da administração e colegas do Centro APTA Citros SAI<sup>o</sup> Moreira e aos colegas da IGTAC pelas preciosas colaborações e amizade no decorrer do curso
- + Ao IAC e ao Centro APTA Citros SAI<sup>o</sup> Moreira pela oportunidade oferecida de grande aprendizado
- + Ao CBIC pela bolsa de fomento : pesquisa concedida

## SUMÁRIO

CBD7C6 D6 TA3 65AS	*i
CBD7C6 D6 =7GD@AS	*ii
57STA D6 AB6EFS	*iii
@6SDMF	i.
A3ST@ACT	.
G 7BT@FDDH I F	#G
" @6V7S I F D6 57T6@ATD@A	#J
"&G Citricultura no 3rasil	#J
"&" Genética e Melhoramento de Citros	#K
"&% Mapas Genéticos	GL
"&L Mapeamento Genético de Citros	"G
"&M Mapeamento de NT5s	"L
"&J !adrão =oliar 6nrai ;amento e CTV	"J
% MAT6@7A5 6 MOTFDFS	"P
%&G Material Genético	"P
%&" 6 . tração do DBA Total	"P
%&% Marcadores @A !D	%#
%&L Marcadores Microsatélites	%G
%&M Marcadores T@A !s QRTarget @egion Ampli0ication !oAmorphismSTU U U	%"
%&J A*aliação de Caracter-sticas Mor0ol<gicas	%L
%&J&G Mor0ologia 0oliar	%L
%&J&" Capacidade de enrai ;amento de estacas	%L
%&\$ A*aliação de @esist/ncia ao CTV	%L
%&K An4lise 6stat-stica dos Dados Mor0ol<gicos	%J
%&P Construção dos Mapas de 5igação	%\$
%&G# 7denti0icação de NT5s	%\$
L @6SD5TADFS 6 D7SCDSS I F	%K
L&G Caracteri ;ação Mor0ol<gica dos V-bridos	L"
L&G&G !adrão 0oliar	L"
L&G&" 6nrai ;amento de estacas	LL
L&" A*aliação de @esist/ncia ao CTV	LM
L&% Mapas de 5igação	LK
L&%&G Marcadores moleculares	LP
L&%&" An4lise de ligação	ML
L&L Mapeamento de NT5s	J"
M CFBC5DSW6S	J\$
J @6=6@XBC7AS 373 57FG@Á=7CAS	JK
\$ AB6EFS	K\$



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela G +	Códigos utilizados para os tipos de segregação para uma população C! QCross !ollinatorsTY	%"
Tabela " +	Seq/ncias dos RprimersS 0i. os e arbitr4rios utilizados para os marcadores T@A !s	%%
Tabela % +	@esultados médios obtidos da mensuração das *ari4*eis CTV 6nrai;amento Q6T -ndice de mor0ologia 0oliar Q7=T e tipo de 0olha em tr/s plantas de PL h-bridos de limão [Cra*o\ e citrumelo [S ] ingle\ e genitores	%P
Tabela L +	6stimati*a de par1metros genéticos obtidos para as caracter-sticas n^mero médio de estacas enrai;adas absorb1ncia QCTVT e -ndice de mor0ologia 0oliar em uma prog/nie de PL indi*-duos do cru;amento entre limão [Cra*o\ *s citrumelo [S ] ingle\	LG
Tabela M +	B^mero tipo de marcadores e a dist1ncia em centiMorgans QcMT de cada grupo de ligação do mapa de citrumelo [S ] ingle\	MM
Tabela J +	B^mero tipo de marcadores e a dist1ncia em centiMorgans QcMT de cada grupo de ligação do mapa de limão [Cra*o\	MM
Tabela \$ +	Detalhes dos NT5s detectados nos grupos de ligação de citrumelo [S ] ingle\ pelo método RMultiple NT5 MappingS QMNMT associados :s caracter-sticas estudadas	J"

## ÍNDICE DE FIGURAS

=figura G +	Ilustração de como os h-bridos de limão [Cra*o\ com citrumelo [S ]ingle\ e os genitores foram inoculados com material de laranja [! /ra\ inoculada com CTV estirpe [3arão 3\	%J
=figura " +	!adrão de folhas e folhas em h-bridos de limão [Cra*o\ com citrumelo [S ]ingle\ QG_ limão [Cra*o\ V_ h-bridos 7_ citrumelo [S ]ingle\T	L"
=figura % +	!adrão de enraizamento de estacas de limão [Cra*o\ QAT citrumelo [S ]ingle\ QCT e h-brido Q3T	LL
=figura L +	Teste de RprimersS @A!D Q7#\$ e 7G#T para a*aliação da segregação utilizando os genitores Q5C e CST e h-bridos QG " % L M J \$ e KT	LP
=figura M +	Teste de RprimersS T@A!s para a*aliação da segregação utilizando os genitores Q5C e CST e h-bridos QG " % L M J e \$T	MG
=figura J +	Teste de RprimersS SS@ QCCSM6PT para a*aliação da segregação utilizando os genitores Q5C e CST e h-bridos QG " % L M e JT	M%
=figura \$ +	Mapa de ligação de citrumelo [S ]ingle\ com \$\$ marcadores Q%J @A!D "M SS@ e GJ T@A!T em K grupos de ligação	M\$
=figura K +	Mapa de ligação de limão [Cra*o\ com %% marcadores Q"" @A!D G# SS@ e G T@A!T em \$ grupos de ligação	MK
=figura P +	Grupos de ligação de citrumelo [S ]ingle\ QAT e limão [Cra*o\ Q3T mostrando marcadores SS@ em comum	J#
=figura G# +	Marcador SS@ QCCSMGPT segregando na proporção G""G& 5C _ limão [Cra*o\ CS _ citrumelo [S ]ingle\ G a GK h-bridos e M _ Marcador de peso molecular 5adder G ?b !lus	JG
=figura GG +	NT5s associados : morfologia foliar QAT resist/ncia a CTV Q3T e enraizamento de estacas QC e DT em mapas de ligação de citrumelo [S ]ingle\& Y !orcentagem de *ariação fenotípica que cada NT5 pode replicar	JJ

## LISTA DE ANEXOS

Ane.o 7 +	Distribuição de médias para as variáveis número de estacas enraizadas absorvência em 657SA QCTVT e índice de morfologia foliar mensuradas em PL h-bridos	KK
Ane.o 77 +	Análise de variância para CTV enraizamento e morfologia foliar referentes : a) criação de uma população de h-bridos de limão [Cravo] e citrumelo [S]ingle em experimento completamente casualizado em casa de vegetação (Aplicativo SASSM+Agri Cantieri et al) GT	KP
Ane.o 777 +	Marcadores AFLD e teste de homogeneidade para segregação Mendeliana	P#
Ane.o 7V +	Marcadores Microssatélites obtidos a partir de bibliotecas genômicas (CCSMT e bibliotecas de STs (CCSM6T tipo de repetição seqüência dos primers) tipo de segregação e teste de homogeneidade para segregação Mendeliana	PG
Ane.o V +	Marcadores TAs seqüência dos primers) tipo de segregação e teste de homogeneidade para segregação Mendeliana	P%

Mauro Machado de **Mapeamento genético e detecção de QTLs em um cruzamento de limão 'Cravo' e citrumelo 'Swingle'** - Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Sub-Tropical) - Universidade Federal de Lavras

## RESUMO

A presença de inúmeros citoplasmas entre outros desvios presentes de natureza genética e botânica limitam o melhoramento genético dos citros por métodos convencionais. A poliembrionia, incompatibilidade sexual e longa juvenalidade dificultam grande parte das estratégias empregadas, principalmente aquelas como a hibridação sexual. O objetivo principal desse trabalho foi o desenvolvimento de mapas de ligação de limão [Cravo] e citrumelo [Swingle] com vistas ao estudo da herança do vírus da tristeza dos citros (CTV). Ao mapa foram incluídas ainda características contrastantes como padrão foliar e capacidade de enraizamento de estacas. A estratégia de pseudo-testcross foi utilizada para a construção de mapas genéticos de ligação utilizando marcadores moleculares RAPD e AFLP foram genotipados 16 híbridos para constituir a população de mapeamento. Para tanto os marcadores foram integrados aos mapas de ligação utilizando o programa JoinMap 4.1 enquanto que para a detecção e mapeamento de NT5s foram realizadas análises por meio do programa MapNT5. O número médio de marcadores obtidos por par de primers AFLP foi quase quatro vezes maior que o número de marcadores por primer RAPD. Foi observada a possibilidade de que dois genes complementares e dominantes possam estar envolvidos na característica folha trilobada, sendo cada espécie heterocigótica para um deles. Porcentagens de enraizamento de 50% foram encontradas para citrumelo [Swingle] e de 60% para os híbridos. No CTV foi encontrado um controle genético monogênico com proporção 1:1. As análises pelo método de Multiple NT5 Mapping (MNMT) detectaram a presença de um NT5 para resistência a CTV no grupo de ligação J. Quando se aplicando PMGB da variação genotípica um para morfologia foliar (JL + JG bT) e dois NT5s para a característica enraizamento de estacas (JG5 e J + M# Kb e J# Kb) respectivamente. Embora os genitores possuam genótipos bastante diferentes a sintonia entre eles foi observada em alguns grupos de ligação.

Palavras-chave: vírus da tristeza dos citros, padrão foliar, AFLP.

Mauro Machado de Sá Genetic mapping and detection of the NT5s in the crossing of 'Angpur' lime and 'S'ingle' citrumelo. "##\$ P%0 Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Sub-Tropical) + !<s+Graduação + 7AC

## ABSTRACT

Countless and different pathogens among other challenges of genetic and botanical nature limit conventional approaches for citrus breeding. Soilborne sexual incompatibility and long juvenility hinder in a considerable amount of the adopted strategies mainly the approaches based on sexual hybridization. The main objective of this study was to develop linkage maps of 'Angpur' lime and the 'S'ingle' citrumelo aiming to evaluate the inheritance to citrus tristeza virus (CTV). Contrastive characteristics were included on the map like the foliage pattern and the rooting capacity of cuttings. The pseudo-testcross strategy was used to build the genetic linkage maps with 100 SSR and 100 markers. PL hybrids were genotyped in the map population. In order to achieve that the markers were integrated to the linkage maps using the software JoinMap 4.1 whereas the software MapNT5 1.0 was used for the detection and mapping of the NT5s. The mean number of markers obtained by a pair of primers was almost four times greater than the number of markers per primer. 100 complementary and dominant genes seem to be involved in the triallelic leaf characteristic considering that each species is heterozygous for one of them. Rooting capacities of 100 were obtained for the 'S'ingle' citrumelo 100 or 'Angpur' lime and from 100 to 100 for hybrids. In CVT a monogenic genetic control was found in a 3:1 ratio. The analysis by the Multiple NT5 Mapping (MNMT) method detected the presence of a NT5 or CTV resistance on linkage group J (G5 J) explaining 95.1% of the phenotypic variation. One foliage morphology on linkage group L (G5 L) and 100 NT5s for rooting of cuttings on the linkage groups 100 and J (G5 100 and J + M 100 kb e 100 kb respectively. Although the parents are quite different genotypes sentinels between them were also observed in some linkage groups.

Keywords: citrus tristeza virus, foliage pattern and 100

# 1 INTRODUÇÃO

A indústria cítrica é uma das principais atividades do agronegócio brasileiro sendo o suco concentrado congelado sua principal commodity para exportação. O Brasil lidera as exportações mundiais de suco concentrado de laranja e de sua produção com participação acima de 50% e de 20% do mercado internacional respectivamente. Internamente os preços também são alcançados o que a laranja representa 10% de toda a produção de frutas do país. Com uma área cultivada em torno de 1,5 milhões de hectares e produção de 10 milhões de caixas de 18 kg/plantafano o setor cítrico conta com uma cadeia altamente organizada desde produtores até a indústria exportadora e mantém-se há anos na liderança mundial. A exportação de suco de laranja concentrado e subprodutos (pectina, pulpa para ração de animais etc.) movimentam algo próximo de 10 bilhões de dólares anuais e representam

O importante destacar que o aumento da produção nos últimos anos explica-se essencialmente por um acréscimo de áreas de plantio. As condições edafoclimáticas tornaram-se adequadas a cultura dos citros em várias regiões do Brasil entretanto a produtividade média ainda é muito baixa quando comparada com outras importantes regiões produtoras como a Califórnia que alcança uma média de 100 caixas/plantafano com intenso uso de irrigação. Diferentemente da produção média brasileira de 10 caixas/plantafano, estes dados podem ser atribuídos em grande parte a fatores de ordem sanitária e às estratégias de manejo do pomar e pós-colheita dos frutos (Machado et al.). Entretanto doenças e pragas são os principais fatores limitantes da agroindústria cítrica brasileira representando mais de 10% do custo de produção.

A consequente vulnerabilidade dos citros a pragas e doenças decorre de uma estreita base genética ocasionada pela adoção de um sistema de produção considerado monocultural em que um número reduzido de variedades é cultivado em grandes extensões. O importante salientar que apesar de o gênero apresentar uma grande diversidade de espécies apenas um pequeno número é

utilizado comercialmente

Como exemplos dos diferentes tipos de citros que trouxeram graves problemas ao Brasil no século XX podem ser citados o vírus da tristeza dos citros (CTV) e a leprose nos anos 1930 o cancro cítrico nos anos 1940 o declínio nos anos 1950 a clorose variegada dos citros e a pinta preta nos anos 1960 (FSS) e mais recentemente a morte súbita dos citros (MSCT) e o Huanglongbing (HLB) (greening) (GMB) e a ASSAB (Mg) e a CF56TTA (ilho et al.)

Uma alternativa racional frente ao usual controle químico dessas doenças ou de seus vetores é a obtenção de genótipos com maior resistência a esses principais patógenos (CSTF=AB) e (GPP). Sendo assim os programas de melhoramento genético e seleção dos citros focam a obtenção de novos portáteis e variedades copa que sejam resistentes às doenças e pragas e mais adaptados a condições abióticas adversas.

Frente a este cenário o melhoramento de citros tem se destacado nas últimas décadas principalmente devido à possibilidade de utilização e incorporação de ferramentas de biotecnologia aos programas tradicionais de melhoramento. Nesse aspecto a utilização de marcadores moleculares para a seleção precoce de plantas de origem sexual oriundas de cruzamentos dirigidos possibilitou a seleção de um número elevado de novas combinações e consequentemente o estabelecimento de um maior número de populações híbridas em condições de campo para seleção de novas variedades e características agronômicas desejáveis. Entretanto segundo (BFV) e (JTF) (FFS) (JTF) e (CSTF=AB) e (JTF) algumas limitações são observadas nas espécies do gênero Citrus um desafio para os estudos genéticos especialmente sua alta heterocigosidade genética longo tempo de geração necessário para a seleção recombinação e poliembrionia nucelar adventícia podem aparecer em citros cerca de três a doze embriões apomíticos formados a partir de células da nucela. O grau da embrião nucelar varia entre os portáteis de (G) para menos de (M) b. Entretanto alguns tipos de citros são monoembriônicos produzindo somente plântulas; genótipos (ND67) (F8) (VF5) (TAB) e (35) (DM6) (MT).

Embora os desafios na obtenção de progênies no cruzamento dentro do gênero Citrus e entre gêneros próximos sejam consideráveis existem várias fontes de resistência a fatores bióticos e abióticos que podem ser potencializadas na

obtenção de indivíduos com características agrônomicas desejáveis (MST6 et al. 2006). Essa abordagem é particularmente importante quando a ela se agrega ferramentas auxiliando na seleção de indivíduos genéticos na obtenção de marcadores no mapeamento genético culminando com a seleção assistida por marcadores uma etapa ainda em processo de incorporação aos programas de melhoramento de citros.

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: posição dos genes nos cromossomos (Forsberg et al. 2006). 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 da herança estrutura e organização do genoma. Os citros possuem características morfológicas que auxiliam a construção de mapas genéticos. Eles são espécies predominantemente diploides que possuem um genoma pequeno bom nível de polimorfismo entre espécies e várias espécies produzem híbridos férteis (Forsberg et al. 2006).

Diferentes marcadores têm sido usados no desenvolvimento de mapas de ligação em várias populações de citros. Marcadores dominantes como AFLP + Random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) e AFLP + Random amplified polymorphism (RAPD) são os mais usados embora apresentem especificidade de população e sejam mais difíceis de serem aplicados em outras populações por serem dialélicos. Marcadores AFLP são capazes de acessar vários pontos de polimorfismo com poucas bandas polimórficas em um único gel (Forsberg et al. 2006). Os SSRs + Rtarget region amplification polymorphism (SRAP) e VTC são outra classe de marcadores que utilizam primers mais longos que AFLP melhorando significativamente a reprodutibilidade. Tais marcadores facilitam o desenvolvimento de mapas densos que são ideais para localização de características quantitativas (QTLs) e trait loci. A estratégia de mapeamento prioriza o desenvolvimento de um mapa detalhado usando marcadores dominantes de alta resolução mas suplementado com marcadores codominantes que podem ser mapeados em muitas populações. Marcadores codominantes como SSRs + Simple



sequence repeats 57TT e 5DTT2 GPKPT são polimórficos e transferíveis entre espécies/variedades e portanto mais apropriados para o uso como marcadores para interligar mapas desenvolvidos em diferentes populações.

Beste conteúdo marcadores moleculares especialmente marcadores baseados em DNA como TGA, QVD e V7C? "###%T A=5! QVFS et al. GPPMT e SS@ 57TT e 5DTT2 GPKPT abrem a possibilidade de construção de mapas genéticos de modo mais rápido. O desenvolvimento de mapas de ligação de alta resolução é um pré-requisito para se isolar genes usando estratégias de clonagem baseada em mapas (SCV h A@8 et al. "###%T O uso de marcadores ancorados em seqüências repetidas os denominados microssatélites (SS@T) permite a integração e seleção assistida por marcadores em um amplo espectro de populações. Um mapa de referência com marcadores multialélicos co-dominantes oferece a possibilidade de ligar os mapas dos dois genitores desenvolvidos e permite mapeamento comparativo (3A@?562 et al. "###%T @FFS6 "###%T C@7STF=AB7 et al. "###%T

Os últimos 6 anos cerca de 10 mapas genéticos foram desenvolvidos para citros. Como exemplos (5D@F et al. GPPJT Q7MFB6 et al. GPKT e C@7STF=AB7 et al. GPPP( GA@C7A et al. GPPP( F57V67@A et al. "###%T Toda vez apesar de diferentes grupos de pesquisa no mundo estarem envolvidos neste processo tem sido bastante difícil correlacionar e integrar os grupos de ligação identificados nesses mapas devido ao pequeno número de marcadores em comum (D78 e ASCBS "###%T Em outros casos um mapa consenso foi obtido para os dois genitores sem levar em consideração a possível reorganização cromossômica que deve ter acontecido durante a evolução da família Aurantioideae.

Esses mapas possibilitaram o mapeamento do gene de resistência : tristeza-a e características como nanismo ácido; do grupo resistência a

Cobb número de sementes apomixia resistência a salinidade macho esterilidade e resistência : gomose causada por (CA7 et al. GPP( CV6BG e @FFS6 GPPM( GM7TT6@ >rt et al. GPPJ( D6BG et al. GPP\$( M6ST@6 et al. GPP\$( =ABG et al. GPPK( C@7STF=AB7 et al. GPPP( GA@C7A et al. GPPP( TF85D et al. GPPab( 57BG et al. "###%T ( GA@C7A et al. "###%T ( S7V76@F et al. "###%T ( S7V76@F et al. "###%T ( F57V67@A et al. "###%T Características estas que serão úteis em estratégias de seleção assistida por

marcadores na condução de estudos avanços em melhoramento de citros( ainda em fase de implementação. A maior parte dos mapas reportados relaciona-se com estudos de herança da resistência a doenças muitas delas com herança simples (genes de resistência ou outras poligênicas) e resistance locus ou N5. A estratégia de 3SA (3-Striped Segregant Analysis) descrita por M7CV65MF6 et al (GPPGT) foi utilizada em alguns desses mapas.

Recentemente com o aparecimento da morte súbita dos citros (MSC) (G7M6B6S+6/BABD6S e 3ASSAB687) (Mg556@ et al) (##GT) detectou-se a necessidade de obtenção de novas combinações de porta-enxerto que pudessem ser utilizados como uma alternativa ao limão (Cra\*o) e que possibilitassem estudos sobre a herança a essa anomalia. Considerando que a morte súbita dos citros é uma doença de combinação entre copa e porta-enxerto (limão (Cra\*o) e limão (Voldameriano) ela é altamente preocupante uma vez que o limão (Cra\*o) responde por mais 80% dos porta-enxertos no Estado de São Paulo. Portanto este grande interesse no desenvolvimento de novos porta-enxertos. Nesse sentido é importante o desenvolvimento de novos híbridos com características desejáveis presentes em genitores contrastantes. Seguindo este raciocínio seria de grande interesse um porta-enxerto híbrido com grande número de sementes poliembrionicas por fruto rústico de indução de produção precoce com boa tolerância ao estresse hídrico que confira boa qualidade aos frutos e produção : copa. Todas essas características estão presentes no limão (Cra\*o) e algumas delas no citrumelo (S) (MD556@ et al) (##GT). Com o surgimento e expansão da MSC um dos principais objetivos da pesquisa com porta-enxertos passou a ser o desenvolvimento de porta-enxertos que possam substituir o limão (Cra\*o) porém sem perder significativas qualidades dessa espécie principalmente a tolerância : seca.

A hipótese principal desse trabalho é que existe suficiente variabilidade genética dentro dos genótipos dos genitores que permita mapeamento e produção de novos híbridos com tolerância : morte súbita. Uma vez que a avaliação de morte súbita exige experimentação de campo acima de cinco anos foi feita a avaliação preliminar da tolerância ao vírus da tristeza com um dos candidatos associados ao desenvolvimento da doença. Como o patógeno da MSC possui etiologia incerta trabalha-se com a possibilidade de uma associação do patógeno da MSC com o de CTV. Além do fato de ambas as doenças serem de combinação copa e porta-

en.erto. Esse projeto foi parte do Programa de Melhoramento de Hortaliças do Centro de Citricultura Siqueira Moreira do IAC.

Portanto o objetivo principal desse trabalho foi o desenvolvimento de mapas genéticos de ligação de limão [Crato] e citrumelo [S]ingle com estas ao estudo da herança da resistência ao vírus da tristeza dos citros e de características contrastantes como padrão foliar e capacidade de enraizamento de estacas. Para tanto foi utilizada uma população de mapeamento de híbridos utilizando-se a estratégia de pseudotestcross com locos marcadores ADSS e TAD.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Citricultura no Brasil

A citricultura brasileira apresenta vários aspectos que traduzem a grande importância econômica e social que a atividade gera para a economia do país. Segundo Azevedo (1997) a área plantada é próxima a 100 mil hectares enquanto que no ano de 1995 somente o Estado de São Paulo produziu cerca de 1,5 milhões de caixas de 15 kg superando 6 milhões de toneladas anuais (Azevedo, 1997).

O parque cítrico no Brasil se iniciou no século XX com citricultores iniciando o plantio de citros em larga escala quando estimulados pela crise do café no final da década de 1920. Desde o início da sua base comercial a citricultura concentrada até então em São Paulo e Rio de Janeiro já era planejada para atender ao mercado externo. Estatisticamente em 1995 o Brasil já era considerado o quinto maior produtor mundial de citros (Azevedo e Bazzani, 1997).

Mas somente a partir dos anos 30 do século passado segundo Azevedo (1997) a citricultura começou a ser implantada comercialmente nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia. Entre 1930 e 1940 após uma sucessão de fatos como a decadência do café nos anos 20, a Segunda Guerra Mundial em 1939, disseminação de doenças como a tristeza na década de 1930, cancro cítrico em meados dos anos cinquenta e consequente baixo incentivo aos produtores houve um declínio da citricultura no país como apontam Azevedo e Bazzani (1997).

Em meados da década de 1940 o parque cítrico retoma o crescimento. Os primeiros investimentos visando a industrialização da laranja no Brasil foram

incentivados pela queda da produção norte-americana devido : geada que em dezembro de 1997 destruiu cerca de 60 milhões de laranjeiras na Califórnia (AMA et al. 1998) impulsionado por uma série de outros fatores como incentivos fiscais condições naturais do Brasil o parque citrícola mudou seu foco comercial de fruta fresca para indústria processadora com desenvolvimento a partir da década de 1980 o Brasil se consolida como o maior produtor mundial de suco de laranja. Desde o processo de industrialização até o momento o foco principal da citricultura paulista tem sido a produção de suco destinado ao mercado interno (Azeiteiro et al. 1998) (Ferreira e Bavaresco 1998).

Atualmente um custo de produção competitivo aliado a um parque industrial atuante em escala global são pontos fortes da citricultura brasileira. Por outro lado o ponto fraco encontra-se no aparecimento de sérias doenças nos pomares tanto para variedades copa como porta-enxerto. Nas últimas décadas o aparecimento de doenças como a tristeza dos citros (CTV) na década de 1970 (Meyer et al. 1970) e a clorose variegada dos citros (CVCT) na década de 1980 (Ferreira et al. 1980) comprometeu o custo e a oferta futura. Entretanto o aparecimento das novas doenças neste início de milênio como morte súbita dos citros (MSCT) (Gomes et al. 2000) e a ASSAB (MD556) et al. (1998) e a doença de greening (CF56TTA) (Silva et al. 1998) é um risco econômico muito presente no setor e pode comprometer a produtividade brasileira no futuro.

Enquanto isso segundo AMA et al. (1998) e Ferreira et al. (1998) o aumento do consumo a redução das barreiras tarifárias e fitossanitárias investimentos em qualidade da fruta fresca modernização da sua estrutura de beneficiamento e comercialização produção a custos competitivos investimentos em diversidades de sucos de laranja e sólida retaguarda de pesquisa são estratégias a se considerar mantenedoras da estrutura citrícola nacional rentável.

Bo ano de 1998 o seqüenciamento genético funcional e comparativo dos citros foi concluído e assim foi possível saber quais são e onde estão localizados os genes responsáveis pela resistência às principais doenças da laranja assim como quais são os genes existentes nos vírus fungos bactérias e fungos que provocam as doenças (Cavaliari et al. 1998). Com isso se torna possível disponibilizar no mercado variedades de laranjas resistentes a um ou dois patógenos gerando economia : cadeia citrícola principalmente levando-se em conta que as doenças é

o principal fator limitante da citricultura brasileira representando mais de 1/3 do custo de produção segundo MACVADF et al. (1987).

A citricultura brasileira detém o maior banco de informações sobre citros no mundo com cerca de 100 mil seqüências de genes como discute AMAZAL et al. (1997). Colocando o Brasil também na liderança mundial nas pesquisas científicas do setor como exemplos o seqüenciamento e mapeamento genético já realizados de *Citrus* e de pelo menos seis espécies do gênero *Citrus* (AMAZAL et al. 1997).

Aliando o agronegócio citrícola brasileiro por trás de todo o caminho que percorre a produção da laranja até chegar às mãos dos consumidores há uma cadeia que gera empregos pesquisa investimentos economias locais e gera conhecimento global (FRANCO e BASSO 1997).

## 2.2 Genética e Melhoramento de Citros

Estima-se que os gêneros correlatos se originaram entre 10 a 20 milhões de anos atrás nas regiões tropical e subtropical da Ásia e do arquipélago Malaio de onde se dispersaram para outras regiões do mundo. Em se tratando dos sistemas de classificação existentes o mais utilizado foi o proposto por SHANKER (1966) que reconheceu 12 espécies verdadeiras de citros e as classificou entre os seis gêneros que compunham o grupo subtribal denominado citros verdadeiros (*Citrus* *fruit trees* subtribo Citrinae tribo Citreae subfamília Aurantioideae da família Rutaceae (SHANKER e GUNDEL 1966)).

Número de cromossomos dos representantes desse gênero foi corretamente estabelecido pela primeira vez por SHANKER (1966) como  $2n = 28$ . Assim segundo GUNDEL et al. (1966) a subfamília Aurantioideae pode ser caracterizada pela dominância de diplóides sendo que de suas 12 espécies estudadas até então a grande maioria é  $2n = 28$ .  $2n = 28$  e ocasionalmente ocorrem autopoliploides intraespecíficos (e.g. *C. aurantium*). Poliploides comprovadamente estabelecidos são raramente encontrados. A estabilidade do cariótipo em Aurantioidea está aparentemente ligada à alta capacidade de hibridação inter-específica (GUNDEL et al. 1966).

Em relação ao sistema de classificação sistemática esse grupo de plantas apresenta grande complexidade. A taxonomia da subfamília Aurantioideae foi marcada pela proposição de novos gêneros segregados de *Citrus* como

e Bo entanto não há fortes evidências morfológicas para a manutenção desses gêneros uma vez que caracteres diagnósticos de um deles podem ser encontrados em outros representantes do referido grupo. Seus representantes apresentam grande compatibilidade sexual o que possibilitou a origem natural de híbridos intergenéricos e interespecíficos ao longo do processo de evolução do grupo (Araújo e FND6 "###M).

As espécies do gênero reproduzem-se sexualmente por autopolinização e polinização cruzada sexualmente por apomixia nucelar adventícia e agronomicamente por propagação vegetativa. Suas sementes possuem tanto embriões zigóticos como apomíticos apresentando em geral apomixia facultativa com número variável de embriões entre um a dois. Algumas espécies são monoembriônicas e não aproveitadas como porta-enxertos em função da alta variabilidade na progênie conduzindo o plantio com baixa uniformidade. Os métodos de seleção de embriões zigóticos e nucleares podem se basear em características morfológicas (T67CV e S176G65+@F2 GP\$T) químicas e bioquímicas (D@@ e @66C6 GPLJ( !76@7BG6@ e 6D hA@DS GPJ\$( TATDM et al. GP\$( TF@@6S et al. GP\$( ABD6@SFB et al. GPPGT) ou moleculares (3AST7AB65 et al. GPPK( F57V67@A et al. "##" "##%T).

Essas espécies do gênero e outras de gêneros correlacionados como e apresentam compatibilidade genética produzindo híbridos férteis de interesse para o melhoramento. Os exemplos típicos dessa compatibilidade sexual são os híbridos do gênero com Apêns de astadoras geadas ocorridas na Itália em GKPL+GKPM pesquisadores do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos iniciaram em GKPS um programa de produção de cultivares copas resistentes ao vírus mediante a hibridação de trióliata com cultivares de citros. Desse trabalho surgiram dezenas de híbridos a citranges citrumelos citrandarinas citradias citremons e citrumquats a alguns dos quais vieram a se tornar porta-enxertos comerciais em diversos países inclusive no Brasil (3FT6FB et al. "###M).

Apêns hibridação com os descendentes denominados citranges citrandarins citrumelos entre outros apresentam folhas trióliadas que é uma característica morfológica governada por um gene dominante que determina essa característica quando em homocigose e heterocigose. Contudo vale ressaltar que o uso de como um dos genitores em programas vai muito além de sua

marcante morfologia de folha trilobada haja \*isto que esse gênero apresenta inúmeras características agrônomicas importantes como resistência a doenças e melhor qualidade de fruta na variedade copa en.ertada sobre ele

F citrumelo [S]ingle\ é originado do cruzamento entre o pomelo Q Mac0T [Duncan\ e sendo utilizado como porta-en.erto de \*ido a muitas características como tolerância : tristeza e ocoorte .iloporoze QG@ABT et al\ GPJG( VDTCV7SFB GP\$LT e ao declínio Q36@6TTA et al\ GPPLT\ Também é resistente : gomose de ao nematídeo dos citros QFj3ABBFB e =F@D GP\$KT e : morte súbita dos citros QG7M6B6S e 3ASSAB687 "##GT\ !lantas en.ertadas em citrumelo [S]ingle\ produzem bem em solos arenosos ou argilosos porém não têm bom comportamento em solos com pH elevado e nos solos mal drenados QhDTSCV6@ GP\$PT\ O moderadamente resistente : seca e a geadas\ Entretanto suas plântulas são suscetíveis : mancha bacteriana dos citros causada por p\* que causou a queima de milhões de mudas na =lândia nos anos oitenta\

As laranjeiras e outras espécies en.ertadas no trióliata Q T ou em seus híbridos apresentam maior diâmetro do tronco do porta-en.erto que o da copa o que não impede que as plantas sejam produtivas e longevas\ poucas cultivares apresentam combinações denominadas de incompatíveis\ Como emprego a laranja [!/\ra\ e o tangor [Murcott\ são incompatíveis com os trióliatas e diversos de seus híbridos entre eles os citrâneos e os citrumelos Q!FM!6D "##MT\

6m São Paulo laranjeiras [Valência\ en.ertadas em citrumelo [S]ingle\ produzem menos que as en.ertadas em limão [Cra\*\ Q!FM!6D >r\ e 35DM6@ "##"T porém com frutos de qualidade superior : aqueles obtidos sobre os limões [Cra\*\ e [Voldameriano\ é este entre os porta-en.ertos que induzem maior produção : lima ácida [Tahiti\ em Sebedouro e Água- Q=7GD67@6DF et al\ "##GT\ Boêmio de >aneiro laranjeiras [Batal\ em citrumelo [S]ingle\ foram mais produtivas que as en.ertadas em limão [Cra\*\ limão [Voldameriano\ tangerina [Cleopatra\ e outros porta-en.ertos QG@AHA et al\ "##GT\

De acordo com Sh7BG56 QGPJ\$T o limão [Cra\*\ é um lemandarin isto é um híbrido natural de limão Q 5\T e uma tangerina Q 3lancoT originado na região de Canton no Sul da China onde é conhecido como limão Canton\ Ba classificação de TABA?A QGPMLT o limão [Cra\*\ é considerado uma espécie Q T nativa da Índia onde é conhecido pelo nome de >amir\ Supre+

se que ele tenha sido levado do sudeste da Ásia para a Europa e daí para as Américas tendo sido introduzido no Brasil pelos colonizadores (Fonseca 1962) (Mota 1962).

A primeira referência ao seu uso como porta-enxerto no Brasil foi feita por F5=S e F5=S (Gomes) que encontraram em Minas Gerais laranjeiras enxertadas nesse porta-enxerto plantadas na década de 1930. Esses autores ficaram entusiasmados com o uso do limão (Crato) considerando-o excelente porta-enxerto. Em São Paulo vem sendo comercialmente empregado desde a década de 1930, porém seu uso foi ampliado a partir dos anos cinquenta quando veio a substituir a laranja Ásia pela suscetibilidade desta ao vírus da tristeza dos citros. Há muitas razões para seu uso por fitopatólogos e citricultores: tolerância à seca, facilidade na obtenção das sementes, grande vigor no primeiro ano e depois da enxertia, bom pegamento das mudas por ocasião do plantio no pomar, rápido crescimento das plantas, produção precoce, altas produções de frutos de regular qualidade, compatibilidade com todas as culturas, média resistência ao frio e bom comportamento nos solos arenosos (Fonseca 1962) (Mota 1962).

De modo geral o limão (Crato) apresenta média resistência: gomose de e embora existam variações entre as seleções. Segundo MDBTAB (et al.) (Gomes) as seleções (Santa Bárbara) e (665) são as mais resistentes e o limão (Crato) (vermelho) e lima (Ornato) as mais suscetíveis. Sendo considerado suscetível aos nematoides e (CAMPES) não tendo sido encontradas referências sobre o comportamento das suas diversas seleções a esses nematoides. O tolerante ao vírus da tristeza dos citros (CFSTA) et al. (Gomes) (GABT) et al. (Gomes) mas mostra caneluras quando infectado por raças severas do vírus como a variante Capão Bonito (Mg556) et al. (Gomes).

Recentemente com o aparecimento da morte súbita dos citros (MST) (G7M6B6S) e (ASSAB687) (Mg556) et al. (Gomes) detectou-se a necessidade de obtenção de novas combinações de porta-enxerto que pudessem ser utilizados como uma alternativa ao limão (Crato) e que possibilitassem estudos sobre a herança da resistência a MST. O interesse no desenvolvimento desses híbridos é evidente uma vez que se pretende associar as características desejáveis que estão presentes nos dois genitores.

Segundo (C7STF=AB7) et al. (Gomes) e (BFV6557) et al. (Gomes) os citros possuem muitas características agrônomicas que são úteis de selecionar por



técnicas convencionais de melhoramento de citros: maioria delas possuem herança aparentemente quantitativa com expressão de algumas como resistência a CTV, leprose e morfologia foliar que são aparentemente governadas por um ou dois genes. No melhoramento genético de citros o estudo do modo de herança de resistência a doenças e de outras características importantes apresenta um determinado grau de complexidade especialmente devido a fatores de ordem genética botânica e agrônoma. Tais como a heterogeneidade genética do gênero poliembrionia, natural recombinação longo período pré-reprodutivo incompatibilidade alta heterozigosidade complexidade dos mecanismos genéticos depressão por autogamia e as longas gerações necessárias para se realizar seleções. O uso de um número reduzido de variedades com base genética estreita e o sistema de produção de citros como monocultura além com que a indústria cítrica se tornasse vulnerável a pestes e doenças. Como aconteceu com o vírus da tristeza dos citros (CTV) na década de 1930 cancro cítrico na década de 1950 clorose variegada de citros nos anos 1960 e mais recentemente morte súbita de citros (MSCT) e greening.

Esses programas de melhoramento genético de citros focam principalmente a obtenção de novos porta-enxertos e variedades copa resistentes às doenças pragas e mais adaptados a condições abióticas adversas. Vale destacar que como os programas de melhoramento de espécies anuais o melhoramento de plantas perenes lenhosas também deve basear-se no conhecimento do controle genético da herança de características importantes e no uso e manutenção dos recursos genéticos disponíveis. O melhoramento genético de citros é por meio de mapas de ligação no qual essas características são ordenadas seqüencialmente correspondendo de modo apropriado: posição dos genes nos cromossomos (MacVadF et al., 1998).

Quando se trata do método mais eficiente de se obter híbridos é sem dúvida mediante hibridação artificial com polinização controlada. Além de permitir o controle da identidade de ambos os genitores reduz significativamente os riscos de cruzamentos indesejáveis e de auto-oculação o que ocasiona a perda de identidade do genitor masculino (MacVadF et al., 1998). Entretanto a maioria das pesquisas de melhoramento de citros tem pretendido selecionar variedades que são resistentes a doenças. Sendo que poucos estudos genéticos de citros usando uma

prog/nie controlada t/m sido reali;ados para entender a herança com relação : resist/ncia a importantes doenças

Embora os desafios na obtenção de prog/nies =<sub>G</sub> no cru;amento dentro do g/nero e entre g/neros pr<.imos sejam considerados QB FV6557 et al. a introgressão de genes em por hibridação se.ual é 0reqZentemente dificultada pela poliembrionia incompatibilidade se.ual e longa )u\*enilidade. Essa abordagem é particularmente importante quando a ela se agregam 0erramentas da biotecnologia au.iliando na seleção de indi\*-duos ;ig<ticos na obtenção de marcadores no mapeamento genético culminando com a seleção assistida por marcadores

Bo tocante :s di0erentes estratégias de melhoramento de citros atualmente a grande re0erencia na literatura são as pesquisas en\*ol\*endo genética+gen,mica. De maneira que pode+se di;er que estudos de mapeamento genéticos completam a gen,mica 0uncional que por sua \*e; completam os de mapeamento. Assim sendo a genética+gen,mica \*em surgindo como a no\*a opção para se obser\*ar os 0en,menos da herança determinando o gen<tipo por análise direta das seqZ/ncias de DBA.

Segundo ? FB7BG et al. Q"##MT a gen,mica 0uncional tem sido aplicada na dissecação genética de em di0erentes caminhos( para detectar locos de caracter-sticas quantitativas QNT5sT no cru;amento e.perimental entre linhagens que di0erem nas caracter-sticas contrastantes delineando estas di0erenças( mapeamento genético e 0-sico( estudos de e.pressão g/nica na medição dos n-\*eis de e.pressão ou in0er/ncias de e.pressão di0erencial para milhares de genes usando microarran)os entre outras in^meras aplicaç9es

Dma estrutura de mapeamento chamada mapeamento 0uncional tem sido proposta para caracteri;ar em um ^nico passo os locos de caracter-sticas quantitativas a Rquantitati\*e trait lociS QNT5sT ou mesmo os nucleot-deos de caracter-sticas quantitativas a Rquantitati\*e trait nucleotideS QNTBT segundo h D e 57B Q"##JT. Fs NTBs são bastante ^teis integrando 0inas estratégias de mapeamento e clonagem posicional de genes locali;ados. A abordagem 0ornece uma pro\*etosa estrutura quantitativa e analis4\*el para estimar a interação entre aç9es g/nicas e mudanças desen\*ol\*imentais

Futra poderosa abordagem genética+gen,mica é uma combinação dos métodos de mapeamento tradicional Rquantitati\*e trait lociS QNT5T com dados de

RmicroarraAS resultando em uma notável utilidade em um grande número de investigações recentes biológicas. Estes estudos de locos associados com variação herdável na expressão de outros genes no genoma (eNT5T) são similares aos estudos tradicionais de NT5s com um objetivo principal em identificar os locais genômicos aos quais as características e pressões são ligadas (Wang et al. 2005).

Beste contexto a seleção assistida por marcadores uma etapa ainda em processo de incorporação aos programas de melhoramento de citros (MACVAD et al. 2004) pode combinar todas estas diferentes estratégias. Estas vão desde análises NT5 de diferentes tipos associadas com análises NT5 de níveis de expressão de genes até a transformação genética (Wang et al. 2005) conduziram um retrocruzamento interespecífico de uma população de e observaram que NT5s para crescimento do diâmetro estão associados com eNT5s para genes relacionados com lignina sugerindo que características de crescimento e lignina são controladas pelos mesmos locos.

Beste sentido RmicroarraAS têm sido usados para determinar níveis de expressão de genes em populações segregantes e identificar regiões genômicas (NT5s de expressão de genes ou eNT5s) e aplicando variações do transcrito em genes co-regulados. Portanto quando os RmicroarraAS são correlacionados com dados fenotípicos de uma característica quantitativa é possível identificar com sucesso genes candidatos posicionais. Desta forma dados do transcrito dados fenotípicos e genotípicos podem ser integrados para identificar genes controlando variação no crescimento em diferentes espécies. Nos trabalhos de Wang et al. (2005) as análises em populações de spp revelaram uma redução coordenada de níveis de transcrito para enzimas codificando genes envolvidos na biossíntese de lignina na progênie que mostra um crescimento superior.

### 2.3 Mapas Genéticos

Em função do ciclo de reprodução e da perenidade de muitas espécies lenhosas de polinização aberta e altamente heterogênicas o mapeamento genético mesmo com marcadores moleculares ainda não está tão avançado quanto o de espécies anuais. A disponibilidade de progênies de cruzamentos entre diferentes espécies e variedades de por exemplo ainda é muito rara. Na maioria das vezes somente progênies do cruzamento entre dois genitores com

certa heterozigotidade encontram-se disponíveis para estruturação de mapas de ligação. Para superar problemas dessa natureza, GATTA e S6D6F e QPPLT propuseram a utilização de uma estratégia por eles denominada de Pseudo-testcross que permite a construção de mapas de ligação com base em progênies de genitores altamente heterozigotos. Nessa abordagem a configuração do cruzamento não precisa ser planejada como em um cruzamento teste clássico mas pode ser inferida após a análise de segregação dos marcadores na progênie.

Um método mais importante e comum de mapeamento utilizado é a frequência de recombinação para determinar a distância relativa entre duas características ligadas. ST6VABT e QPGT estabeleceu que a frequência de quiasmas entre dois genes ligados é de certa forma proporcional: distância física entre ambos. Esse princípio é a base para o mapeamento genético. Uma unidade de centiMorgan equivale a aproximadamente 1% de recombinação quando os marcadores estão bastante próximos ou podem derivar da porcentagem de recombinação quando estão mais distantes em vista da ocorrência de Crossing-over duplo triplo etc. Diversas técnicas de mapeamento têm sido utilizadas na correção das distâncias calculadas em porcentagem de recombinação para a distância em centiMorgan (667) e GATTA e S6D6F e QPPLT.

Com base na frequência de recombinação é 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 (776) e al. QPPLT. 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 como 5indage (SD76) e al. QPKT Mapmaker (5ABD6) e al. QPKT GMendel (57D) e ?BA!! QPPLT. Joinmap (STAM QPPLT) entre outros. JoinMap é baseado em um SFM modificado em função de um teste de Qui-quadrado independente permitindo assim a integração de marcadores de diferentes tipos de segregação em mapas genitores e a construção de mapas consensos.

Assim como para outras espécies o mapeamento genético de plantas perenes requer alguns requisitos como: escolha dos genitores com tipo contrastante em relação à característica de interesse por exemplo resposta diferenciada em relação à resistência a alguma doença, polinização controlada entre os genitores com produção de uma progênie com tamanho médio e representativo de eventos meióticos e obtenção de centenas de marcadores com segregação mendeliana clássica. Ao se caracterizar um loco marcador é desejável que os marcadores moleculares sejam polimórficos que não sofram seleção sejam codominantes para que todos os possíveis alelos dos locos marcadores possam ser identificados e contenham maior informatividade que os dominantes. Cada vez mais mapas genéticos de ligação vêm sendo utilizados em várias espécies principalmente após o desenvolvimento de diferentes classes de marcadores moleculares segundo CAUVERGUE e VIGORELLI (1988). Entretanto os primeiros mapas genéticos basearam-se em marcadores morfológicos e citológicos. Estes últimos eram obtidos a partir de alterações cromossômicas (aneuploidias, translocações, deleções e inversões) principalmente em culturas de milho, arroz, tomate e ervilha. Entretanto esses marcadores são restritos às espécies de amplo conhecimento citológico. A partir do desenvolvimento de marcadores bioquímicos (isoenzimas) e moleculares (RFLP) o mapeamento genético passou a ser utilizado em várias espécies até mesmo naquelas para as quais nem sequer havia ainda estudos de ligação a algum marcador.

Entretanto os mapas genéticos têm importante papel em muitas áreas da genética: análise de QTLs, clonagem baseada em posição no mapa, melhoramento por meio da seleção assistida por marcadores (MAS) e mais recentemente na genômica comparativa. A seleção indireta por meio de marcadores genéticos tem sido sugerida para características de baixa herdabilidade que requerem grandes populações para sua mensuração (GALLAGHER 1996).

O mapeamento comparativo (comparative mapping) ou RFLP mapping constitui outra importante aplicação dos mapas genéticos (MILLER 1996) e (MILLER 1996). 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 (CAUVERGUE e VIGORELLI 1988). Futura utilização do mapeamento comparativo é

como estratégia de obtenção de um mapa físico de referência para a maioria das espécies vegetais cultivadas pelo menos ao nível de famílias taxonômicas (Cavalli-Sforza e Powell 1987 e Vekemans et al. 1999).

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 e função e expressão desses genes como em (Mackay et al. 1996) em seus trabalhos. Altas resoluções em regiões específicas deste é permitidas a genes de interesse são fundamentais para a identificação isolamento e clonagem de genes que se tornando uma realidade em espécies com mapas genéticos bem definidos (Frary et al. 1999).

Nos últimos poucos anos mapas integrados de muitas espécies têm sido publicados. Devido ao aumento na densidade dos locos e decréscimo no número de gaps estes mapas consensos têm fornecido uma identificação mais precisa de genes principais e SNPs de importância agrônoma. Adicionalmente eles têm auxiliado a conduzir a seleção assistida por marcadores e estudar a estrutura e organização do genoma estudos de evolução e introgressão de genes.

O mapeamento genético se tornou mais freqüente principalmente após o advento da tecnologia de seqüenciamento de alta produção que tem gerado informações abundantes sobre seqüências de DNA para os genomas de muitas espécies de plantas. Isto inclui o seqüenciamento de seqüências genômicas completas para o modelo de planta Arabidopsis em Arabidopsis e para o arroz;

Os mapas físicos em Arabidopsis. Adicionalmente as RFLP Sequence Tags (RSTS) de outras importantes espécies cultivadas têm sido geradas e ferramentas poderosas de bioinformática têm anotado milhares de seqüências como genes funcionais putativos. Neste contexto marcadores moleculares representam a tarefa de relacionar estas informações geradas de seqüências de DNA com fenótipos particulares. Conseqüentemente há uma forte demanda em melhorar técnicas de marcadores para se melhor utilizar a informação de seqüências disponíveis.

Um mapa saturado é a base para estudos avançados de genética incluindo a identificação isolamento e estudos da estrutura e função e expressão dos genes. A clonagem de genes se tornou uma realidade em espécies com mapas genéticos bem definidos. Entretanto a construção de mapas de alta resolução vale ressaltar isto é que permitam encontrar marcadores bastante próximos ou até mesmo completamente ligados ao gene é um pré-requisito para a clonagem de genes.

baseada em mapeamento.

Marcadores moleculares segundo CV6B et al. (1991) e V7C? (1992) realizaram um importante papel na genômica estrutural e funcional de animais, plantas e espécies microbianas. A detecção de RNAs quantitativos e 5'oci TraitsS (NT5) principais em mapas de ligação genéticos baseada em marcadores moleculares oferece uma refinada visão da arquitetura genética de caracteres quantitativos e uma ferramenta potencial para melhoramento genético por meio de seleção assistida por marcadores (2 FSV7MA@D et al. (1993) GPPK( 57BG et al. (1994).

Os estudos de (1995) AMS et al. (1996) demonstraram que primers curtos com seqüências de nucleotídeos arbitrárias podem ser usados para reproduzir segmentos ampliados de DBA genômico de uma extensa variedade de espécies. Estes marcadores foram denominados de Random amplified polymorphic DNA (RAPD).

Entre os métodos baseados em DBA a análise com RAPD é uma das mais utilizadas em programas de melhoramento (3 AST7AB65 et al. (1997). Estes marcadores utilizam um conjunto de primers universais que podem ser usados para análise genômica em uma ampla variedade de espécies e são dominantes, isto que segmentos de DBA de mesmo tamanho são ampliados de um indivíduo, mas não do outro. Desta forma, não é possível distinguir se um segmento de DBA é amplificado de um loco que é heterozigoto (heterozygous) ou homozigoto (homozygous).

Outra eficiente técnica com marcadores inclui os chamados AFLP (Amplified fragment length polymorphism) que geram locos dominantes. Estes têm sido utilizados para determinar a localização cromossomal de genes e tipos mutantes por meio de uma estratégia de mapeamento de todo o genoma (4 6T6@S et al. (1998). Recentemente (57 e ND7@FS) (1999) publicaram uma nova técnica de marcador molecular denominada Rsequence related amplification polymorphism (SRAP) em que pares de primers com nucleos ricos em AT ou GC são usados para amplificar fragmentos intragênicos por detecção de polimorfismo. Um aspecto comum de SRAP, RAPD e AFLP é que fragmentos múltiplos podem ser gerados em uma única reação de amplificação.

Entretanto, estas técnicas não usam informação da seqüência e os marcadores gerados são distribuídos aleatoriamente no genoma.

V7C? (1992) desenvolveram uma técnica rápida e eficiente baseada em AFLP que utiliza ferramentas de bioinformática e dados de RFLP para gerar

marcadores polimórficos ao redor de genes alélicos candidatos. Este polimorfismo de amplificação de regiões alélicas (T@A) utiliza dois primers de aproximadamente 60 nucleotídeos para gerar marcadores. Um dos primers é desenhado a partir de uma sequência alélica do banco de dados de ST amplificando seqüências parciais do gene candidato. O segundo primer arbitrário é uma seqüência arbitrária com alta nucleotídeos rica em AT e/ou GC (embora de preferência de alta de conteúdo rico em GC para manter a estabilidade adequada do primer em seu núcleo para anelar com introns e regiões amplificando as demais regiões próximas do gene candidato. Além desta região o primer arbitrário possui alta nucleotídeos seletivos em sua extremidade 3' e seqüências de preenchimento na extremidade 5'. Uma reação de amplificação é então realizada e os fragmentos de DNA são separados em um gel de seqüenciamento ou de poliacrilamida. A técnica tem sido utilizada tendo como alélicos genes que governam características agronômicas de interesse para o melhoramento.

Diferenças morfológicas entre duas espécies de spp obtidas pelo sistema taxonômico de classificação para estas espécies foram confirmadas e bem retratadas quando confrontadas com dados obtidos por marcadores T@A em estudos feitos por Vu et al. Estes autores construíram uma árvore filogenética com os dados de um sistema múltiplo. + utilizando primers primers alélicos com alélicos em seqüências g/nicas de genes de resistência a doença com regiões repetidas ricas em leucina ou sítios de ligação a nucleotídeos e primers arbitrários resultando em mais de 60 fragmentos polimórficos entre estas espécies.

Fuza classe de marcadores os microssatélites ou simple sequence repeats (Q T) são marcadores codominantes multialélicos altamente informativos e de ampla utilização na maior parte das culturas. A identificação e desenvolvimento de marcadores microssatélites tem permitido aumentar significativamente a densidade dos mapas de ligação obtidos com outros marcadores. Em girassol por exemplo tem sido utilizados na integração de diferentes mapas genéticos previamente obtidos com marcadores de restrição fragment length polymorphism (Q@=5) (Q2D) et al. A utilização de microssatélites na construção e/ou integração de mapas genéticos em citros tem sido limitada devido: à falta de um número suficiente de marcadores polimórficos disponíveis para esta finalidade. Embora tenham ajudado a aumentar a densidade



em alguns dos mapas genéticos) 4 obtidos (A@@65 et al. GPP) (GA@C7A et al. GPPPT) eles ainda não têm permitido obter níveis de saturação apropriados (7>AS et al. GPP) (FFS6 et al. "###( @D78 e ASCBS "###% C@7STF=AB7 et al. "###T

Especialmente em se tratando de microssatélites segundo 57 et al. Q"##"T estes estão distribuídos tanto em regiões codificantes como não-codificantes do genoma (sua distribuição no genoma possui significância evolutiva e dinâmica (possuindo funções e efeitos na expressão gênica e desordem genética orgânica; ação da cromatina ciclo celular processos do metabolismo do DNA e contribuição relativa de replicação e mecanismos de reparo associado ao DNA). A distribuição genômica não-aleatória dos microssatélites (SS@sT nos organismos é evidenciada nos trabalhos de 57 et al. Q"##LT em que demonstram que numerosas linhas de evidência têm demonstrado este fato o que é bastante interessante em trabalhos de mapeamento (A5CIF et al. "##LT. Estes autores evidenciam que a vantagem adicional do desenvolvimento de microssatélites a partir de ST é o fato de que ao mapear estes microssatélites automaticamente são mapeados genes no mapa genético. Sendo que alguns destes genes mapeados podem constituir potenciais candidatos para funções importantes devido: sua localização com NTS para características notáveis de importância econômica. Isto presume-se devido aos seus efeitos na orgânica; ação da cromatina regulação da atividade gênica recombinação replicação do DNA ciclo celular metabolismo de plantas e na evolução do gene. =A5CIF et al. Q"##LT mapearam G### microssatélites a partir de STs de diferentes espécies e tecidos de esperando com isso a cobertura de todo o genoma com uma densidade de marcadores suficiente para poder fazer mapeamento de NTS com precisão bem como a ancoragem com o mapa físico.

Por outro lado a utilização de marcadores co-dominantes na construção e saturação de mapas de ligação é de fundamental importância pois esses também permitem resolver as ambiguidades 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 incoras para combinar mapas de ligação obtidos em diferentes laboratórios ou com diferentes populações gerando assim um mapa genético que melhor represente a estrutura e orgânica; ação dos diferentes grupos de ligação (7>AS et al. GPP) (

SAB ?A@ e MFF@6 "##GT

@FSTF ?S et al. (1993) baseando-se em análises de seqüências genômicas e mapeamento genético encontraram quatro diferentes genes de reação induzida hipersensitivos (V7) relacionados com a hipersensibilidade putativa em cada uma das mais eficientes formas de defesa de plantas contra patógenos biotróficos. Este trabalho de mapeamento estes autores retratam uma importante contribuição na caracterização de mecanismos moleculares de resposta hipersensitiva em plantas. O primeiro mapa genético para seringueira (C. glabrata) foi feito por Bassett et al. (1993) utilizando a estratégia de pseudo-testcross para saturação com marcadores AFLP e SSR e isoenzimas.

Mapeamento molecular do gene da macho-esterilidade nuclear em girassol (C. annuus) usando marcadores AFLP e SSR foi realizado por Cavalli et al. (1993). Sendo que os marcadores que foram ligados mais firmemente com o gene que controla a macho-esterilidade serão úteis na seleção assistida por marcadores de plantas macho-estéreis entre populações segregantes o que facilitaria o isolamento deste gene pelo uso da abordagem de clonagem baseada em mapas.

## 2.4 Mapeamento genético de Citros

Até o ano de 1990 GL mapas genéticos de Citrus foram publicados (D78 e AS7BS). Neste mesmo ano estes mesmos autores iniciaram e publicaram o primeiro mapa de ligação genético comparando grupos de ligação de espécies intergenéricas de Citrus e Citrus. Contudo mapas genéticos em especial de limão [Cra] ainda não foram relatados na literatura.

Os primeiros mapas de ligação de citros foram desenvolvidos com locos isoenzimáticos e AFLP utilizando famílias de retrocruzamento intergenérico de Citrus e Citrus de tangerina com pomelo e uma família intergenérica de Citrus e Citrus. Vários mapas de citros já foram publicados embora nenhum ainda seja consensual isto é represente efetivamente todo o gênero (FD GPP (D78 e AS7BS). A saturação com mais marcadores em alguns desses mapas possibilitou o mapeamento do gene de resistência : tristeza e características como nanismo ácido do fruto resistência a Citrus nêmero de sementes apomixia resistência : salinidade macho-esterilidade e resistência : gomose de Citrus et al. (GPP (

CV6BG e @FFS6 GPPM( GM7TT6@ >rt et al( GPPJ( D6BG et al( GPP\$( M6ST@6 et al( GPP\$a b c( =ABG et al( GPPK( C@7STF=AB7 et al( GPPP( GA@C7A et al( GPPP( TF85D et al( GPPpab( 57BG et al( "###( GA@C7A et al( "###( S7V76@F et al( "##G "##JT( A maior parte dos mapas relaciona-se com estudos de herança da resist/ncia a pat<genos algumas delas monog/nica outras polig/nicas QRquantitati\*e resistance lociS ou N@5T(

GD6@@A QGPKLT ressalta que o g/nero e correlatos t/m caracter-sticas \*ant)osas que 0acilitam a construção de mapas genéticos \*isto que são dipl<ides Qn \_ P "n \_ GKT altamente hetero;ig<ticos permitindo a produção de h-bridos inter+espec-0icos e inter+genéricos( Muitos projetos de mapeamento genético de muitas espécies de t/m sido condu;idos com o prop<sito de identi0icar genes efou locos de caracter-sticas quantitativas QNT5T para resist/nciaftoler1ncia para sal e 0rio QMFF@6 et al( "###T \*-rus da triste;a dos citros QC@7STF=AB7 et al( GPPPT dorm/ncia )u\*enilidade e \*igor Q@FFS6 et al( GPP" T peso da planta e acide; do 0ruto QGM7TT6@ et al( GPPJT( 6m "##L por e.emplo F57V67@A et al( Q"##La bT elaboraram mapas de ligação de laranja [!/ra\ e tangerina [Cra\*o\ utili;ando marcadores @A!D e a estratégia Rpseudo+testcrossS sendo este trabalho de importante rele\*1ncia para estudos posteriores da herança ao CVC cancro c-trico e leprose(

6studos de mapeamento genético de locos de resist/ncia oligog/nica relacionados : resist/ncia ao Citrus triste;a \*-rus QCTVT são predominantes QGM7TT6@ >unior et al( GPPJ( D6BG et al( GPP\$( M6ST@6 et al( GPP\$a b c( C@7STF=AB7 et al( GPPPT( Trabalhos de mapeamento para resist/ncia : triste;a condu;idos no Centro A!TA Citros SAI\*io Moreira QC@7STF=AB7 et al( GPPPT determinaram o loco de resist/ncia a esse \*-rus no grupo de ligação 7 do mapa de ( !or sua \*e; dois trabalhos de mapeamento de resist/ncia quantitativa de citros a pat<genos 0oram reportados Q57BG et al( "###( S7V76@F "##G "##JT( F primeiro deles determinou a locali;ação de N@5s de citros para o Q57BG et al( "###T herdada do genitor como ^nico loco g/nico dominante respons4\*el por M% J b da \*ariação 0enot-pica do car4ter(

C@7STF=AB7 et al( QGPPPT relatam o uso de @A!D e 3SA QM7CV65MF@6 et al( GPPGT para construir mapa de ligação genético e mapear a resist/ncia genética ao \*-rus da triste;a dos citros QCTVT presente em usando estratégia Rpseudo+testcrossS( 6m seus trabalhos F57V67@A et al( Q"##MT

construíram um mapa genético integrado entre *Q5* e *Fsbcd c\** [!/ra\ e  
*3lanc c\** [Cra\*o\ usando dois tipos diferentes de segregação de  
 marcadores. A saturação dos mapas com a inclusão de novos marcadores aumenta  
 o número de grupos de ligação com marcadores de ambos os genitores, o que  
 com que o número destes grupos seja o mesmo do número haplóide cromossômico  
 da espécie. Ademais, vale mencionar que segundo *F57V67@A* et al. (2003) é  
 pequeno o conhecimento sobre a herança genética das principais características  
 agrônomicas de

A identificação de QNT5s para *Dastur* (Lungo  
 responsável pela gomose de citros *Q57V76@F* (2003) e *QNT5* também conduzido no  
 Centro de Citros SAI (Instituto Moreira) constitui o primeiro trabalho de mapeamento  
 genético de citros de resistência a esse patógeno e no qual se identificou  
 inequivocamente herança quantitativa. *Q57V76@F* et al. (2003) identificaram  
 QNT5s associados à resistência à gomose de *QNT5* em citros a partir de um  
 cruzamento entre *QNT5* e *QNT5* foram detectados % QNT5s ligados à  
 resistência à gomose em *QNT5* e *QNT5* em *QNT5* e *QNT5* em *QNT5*  
 detectados e denominados "QNT5" e "QNT5" e "QNT5" (resistência a *QNT5* em  
 T são responsáveis por "QNT5" e "QNT5" da variação fenotípica para  
 resistência à gomose em *QNT5* [Lungo. \ respectivamente. *QNT5* "QNT5"  
 Cs (resistência a *QNT5* em T é responsável por "QNT5" da variação  
 fenotípica total para a resistência à gomose. A detecção de vários locos  
 controladores associados à resistência à gomose em *QNT5* [Lungo. \ e a  
 reação dos indivíduos da progênie em relação à resistência a *QNT5* indicam  
 que esse caráter é de natureza quantitativa concordando com as hipóteses  
 defendidas por *QNT5* e *QNT5* (QNT5) e *QNT5* (QNT5) e *QNT5* (QNT5)

*Q57BG* et al. (2003) identificaram que um marcador molecular ligado ao gene  
 de resistência ao CTV descrito por *Q57BG* et al. (2003) encontra-se mapeado a  
 6,8 cM do gene de resistência ao *QNT5* podendo tratar-se de uma  
 região com diferentes genes de resistência no genoma de *QNT5*  
*QNT5* e *QNT5* (QNT5) *Q57BG* et al. (2003) 6 id/ncias  
 experimentais suportam a hipótese de que o grupo de ligação 7 de *QNT5*  
 do mapa descrito por *QNT5* et al. (2003) possa também apresentar uma região  
 rica de genes de resistência em face da associação estatística de determinados  
 marcadores desse grupo ligados ao gene de resistência ao CTV a eventos de

resistência de citros : gomose (S7V76@F "##G "##JT

A estratégia de clonagem baseada em mapa )4 \*em sendo utilizada para genes de resistência de citros. F primeiro patossistema de citros a ser contemplado com esse tipo de abordagem. Oina de mapeamento foi o gene (resistência : triste;aT a partir de tendo sido construídos mapas de alta resolução para o loco (D6BG et al. "##G( 2ABG et al. "##%T

3AST7AB65 et al. Q"##MT estudaram a herança de resistência do citros : leprose e localização de NT5s no mapa de ligação usando marcadores A=5! e @A!D desenvolvidos de GL% h-bridões obtidos do cruzamento entre o genitor resistente tangor [Murcott\ com um genitor suscetível (laranja doce [! /ra\ sendo que estas plantas foram estabelecidas em campo infectadas com o \*-rus e a incidência e severidade da leprose associada por três anos consecutivos

Segundo S7V76@F et al. Q"##JT mapas de ligação genético de c\* @ubidou. e foram construídos previamente usando marcadores moleculares @A!D (C@7STF=AB7 et al. GPPPT explorando a estratégia de mapeamento Rpseudo+testcrossS. Dois conjuntos de dados separados foram gerados uma para cada genitor. Uma análise de ligação preliminar foi realizada com um modelo de retrocruzamento de base desconhecida em 5FD 1 L# e m4.imo  $\theta_{\#} \# \# \#$ . Setenta e oito RprimersS mostraram combinação Rpseudo+testcrossS onde o marcador está presente em um dos genitores ausente em outro e segregando na prole. Análises de ligação revelaram que G" M desses locos @A!D se ligaram em GK grupos de ligação QG# grupos com J% marcadores para & F comprimento total desses mapas foi \$% " %" cM para e KJJ&KK cM para com a distância entre marcadores variando de # a L% K cM

## 2.5 Mapeamento de QTLs

Pouco se sabe sobre a base genética envolvendo o controle de características fenotípicas de citros tais como morfologia foliar e capacidade de enraizamento de estacas ou mesmo a tolerância a patógenos como o \*-rus da tristeza dos citros. Portanto, inicialmente isso deve ao fato dos estudos quase sempre se direcionarem para o estudo da resistência de genótipos específicos

A maior parte das características agronômicas de citros deve ser controlada por locos quantitativos com exceção de poucas como (CTV leprose e

aparentemente morfológica. O estudo desses locos deve permitir a identificação, mapeamento e quantificação de seus efeitos. Porém a detecção eficiente de NT5s depende do seu número, magnitude de seus efeitos, características de herdabilidade, interações entre genes, frequência de recombinação entre os NT5s e os tipos de marcadores e grau de saturação do mapa.

A maioria dos métodos comumente usados para se detectar a associação entre marcadores NT5 e traços fenotípicos em análises de marcadores individuais utilizando-se teste simples regressão linear, análise da variância, razão de similaridade e estimação da máxima similaridade (mapeamento por intervalo) usando normalmente a abordagem de similaridade, regressão e uma combinação das abordagens similaridade e regressão (57D) (GPPKT) finalmente o mapeamento por intervalo composto (uma combinação de mapeamento de intervalo simples e regressão linear múltipla) (86BG) (GPP% GPPLT) NT5s podem ser detectados considerando-se ambientes separadamente ou em grupos por meio de uma análise integrada dos dados em diferentes ambientes.

S7V76@F et al. (1994) detectaram NT5s associados a marcadores moleculares para a capacidade de enraizamento de estacas em progênies h-bridas do cruzamento entre [ @ubidou. \] Os autores relataram o primeiro estudo de mapeamento de NT5 para enraizamento em [ @ubidou. \] e gêneros relacionados e concluíram que a presença de marcadores moleculares e NT5s associados a enraizamento de estacas de citros distribuídas em grupos de ligação de [ @ubidou. \] indicam que estas regiões são de interesse para seleção de genótipos que enraizam facilmente. Deve ser destacado que a capacidade de enraizamento é uma importante característica para a multiplicação clonal de indivíduos que serão avaliados como porta-enxertos. De outra forma seria necessário aguardar por vários anos para que esses indivíduos floresçam e rotineiramente para então serem avaliados como porta-enxertos.

F. baixo conhecimento de como marcadores são associados com NT5s economicamente importantes gera inúmeros fatores limitantes na pesquisa de melhoramento genético. Como ND@6SV7 et al. (1994) e. empregaram no caso das pesquisas com algodão ( spp) Segundo C@7STF=AB7 et al. (1994) um mapa de referência com marcadores multi-alelicos co-dominantes identificam locos e funciona como ponte entre os mapas dos genitores, levando com que um

determinado número de locos incorporem-se tornem disponíveis para um mapeamento refinado de locos de características quantitativas QNT5T permitindo o que se pode denominar de mapeamento comparativo

## 2.6 Padrão Foliar, Enraizamento e CTV

Em se tratando de híbridos de citros com embora esta alta variação morfológica são poucas as informações relativas ao estudo da herança dessas características como por exemplo morfologia foliar e enraizamento

O caráter folha trilobada é conhecido como mostrando dominância em cruzamentos sendo que alguns híbridos mostram uma mistura de folhas bilobadas e monoilobadas. Em um cruzamento entre e G#b dos híbridos obtidos apresenta-se folha trilobada indicando a dominância e presença do homocigose do gene ou genes que controlam o caráter em QCAF=AB7 GPPST

Em plantas de tangor [Temple] e tangerina [Clementina] polinizadas com citrange [Troar] um retrocruzamento para folha tipo monoilobada cerca de 1/4 das plantas eram monoilobadas QCAM6FB 6 =@FST GPJKT Segundo os autores estes dados indicam que o caráter folha trilobada é condicionado por dois genes dominantes. TFEF!6DS QGPJ" relatou que entre M# plantas do cruzamento entre Q5T Fsbcd . (ambos monoilobados) cerca de 1/4 eram trilobadas. Ele sugeriu que dois genes complementares e dominantes podem estar envolvidos sendo cada espécie heterocigótica para um deles.

Segundo S7V76@F et al. Q"###T a propagação de plantas por meio de enertia e enraizamento de estacas pode proporcionar a redução de infertilidade. Embora sejam tradicionalmente propagadas por enertia a estaquia pode ser um método alternativo e é eficiente na propagação de algumas espécies como lima [Tahiti] Q TQ!@AT7 et al. GPPPT

Os estudos de enraizamento de estacas de e gêneros correlatos procedem geralmente a estudos do potencial genotípico porcentagem de estacas enraizadas e as diferenças de híbridos diferentes em enraizar especialmente com a indução por reguladores de crescimento. Contudo pouco é conhecido sobre a base genética envolvendo o controle dessas características.

O enraizamento de estacas depende de fatores tais como idade vigor da planta lenhosidade reguladores de crescimento meio ambiente local;ação da

estaca nutrição e fatores genéticos relacionados ao g/nero ou espécies de interesse. Q=6@GDSFB et al. GPKJ( A3FD+@AMASV et al. GPKT Segundo !7F et al. Q"##MT a umidade é um dos fatores externos que mais contribuem para que ocorra enraizamento das estacas. Futuros estudos demonstram que os fatores que afetam a iniciação e o desenvolvimento de raízes são relacionados: própria planta, estado fitofisiológico, condições fitossanitárias, balanço hormonal e nutricional, e foram relacionados com condições ambientais (temperatura, luminosidade e umidade relativa) (MADAD et al. "##L( BF@36@TF et al. "##G( !ASNDA5 et al. "##GT

Em se tratando do efeito de reguladores de crescimento no enraizamento de estacas, segundo @FCVA et al. Q"##LT a indução de enraizamento para muitas espécies é dependente da aplicação de reguladores vegetais de natureza natural, principalmente ácido indolbutírico (IBA) com ação na atividade das células de cambium e na formação de raízes adventícias. Este pré-tratamento com auxinas tem proporcionado em algumas espécies, rapidez e uniformidade de enraizamento além de aumento do número de raízes adventícias. Além da necessidade da adição de auxinas, existem outros fatores que influenciam no enraizamento, como o potencial do genótipo da cultivar, as condições ambientais, a posição da origem das estacas, assim como a participação de substâncias como auxinas.

SVA852 et al. (GPPLT estudaram o efeito de doses destes reguladores em diferentes concentrações para enraizamento de estacas de lima e lima ácida. Concluíram que IBA promoveu a melhor porcentagem de enraizamento maior número e maiores raízes para ambos os genótipos. Segundo !@AT7 et al. (GPPPT o efeito benéfico dos reguladores de crescimento (IBA e BAAT) foi observado no enraizamento de lima ácida (Tahiti) e laranja doce. Enquanto que @A?6SV+ ?DMA@ et al. (GPPMT relatam que estacas de limão verdadeiro (Citrus aurantium) tratadas antes de serem plantadas com ácido indolbutírico associado com ácido piridobenzoico mostraram um melhor enraizamento nas concentrações de 100 mg/L IBA e 100 mg/L de piridobenzoico.

Ao lado de características morfológicas ou fisiológicas características associadas: tolerância a determinados patógenos são tão importantes quanto o estudo da resistência. Sabe-se que o g/nero Citrus é tolerante ao R-Citrus tristeza; a Citrus tristeza (CTV) enquanto alguns g/neros como Citrus limon podem apresentar resistência ou imunidade representada pela incapacidade do CTV de se replicar em seus tecidos. Víbrios entre Citrus e Citrus apresentam segregação mendeliana



para a resistência que deve ser governada por um gene ou por um gene de efeito principal (M6ST@6 et al. GPP\$b( 3 F@D7GBFB et al. "##%T

Devido : alta eficiência do como um vetor é praticamente impossível eliminar o vírus dos pomares. Estratégias a/m sendo conduzidas para introduzir resistência se) a com abordagens tradicionais (hibridação mapeamento etc) ou com transformação genética. Entretanto vale a pena ressaltar que estratégias de melhoramento genético com uma abordagem moderna para resistência : triste; a geralmente envolvem o uso de (V6A@B et al. GPP%T inclusive com mapeamento desta característica

Segundo 3 F@D7GBFB et al. Q"##%T uma das maneiras de se controlar a tristeza é usar variedades de copas e de porta-enxertos que interagem conforme a capacidade de multiplicar as partículas virais em suas células e de tolerar sua presença nos tecidos do floema. Portanto a tolerância de citros ao CTV parece estar associada a uma menor ou maior capacidade de multiplicação dos vírus em seus tecidos. Embora não exista nenhuma relação entre título do vírus e sua severidade tem sido observado que em variedades mais sensíveis como laranja [! /ra\ e limão [Galego\ o vírus apresenta-se em alta titulação (MACVADF et al. GPP\$T

Os métodos de detecção e caracterização do vírus baseiam-se em sintomas em variedades indicadoras (ensaio biológico) métodos sorológicos associados ou não a microscopia eletrônica (determinação de partículas virais) e métodos moleculares (determinação de genoma viral). Diferente do método biológico de detecção vários outros testes começaram a ser usados a partir de GP\$K para a detecção do vírus : medida que anticorpos mono e policlonais produzidos contra a proteína do capsídeo do CTV tornaram-se disponíveis. 3 A!T7STA et al. (GPPJT purificaram partículas do CTV de lima ácida [Galego\ que foram utilizadas como antígeno para produção de anticorpos policlonais. Estes apresentaram título e especificidade elevados e não ocorreu reação cruzada com proteínas da planta hospedeira em 657SA Rdot immunoprint assay (D73AT R h estern blot) e tissue immunoprints. A proteína do capsídeo do CTV expressa em T) Scherich também foi utilizada como antígeno para a produção de anticorpos mono e policlonais (TA@GFB GPP\$( TA@GFB et al. GPP\$T STACV+MACVADF et al. "##"T) Esses anticorpos também a/m sendo adotados rotineiramente para detecção do CTV por intermédio das técnicas citadas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material Genético

Os genitores limão [Cra\*o\ m] e resistente : seca suscet-\*el : morte s^bita dos citros e : s estirpes mais se\*eras do \*-rus da triste;a do citros e citrumelo [S]ingle\ m] Mac0k c\* Duncan .

Q5&T@a0kn suscet-\*el : seca resistente : morte s^bita dos citros e ao \*-rus da triste;a dos citros pertencentes ao banco de plantas matrizes do Centro A!TA Citros [SA!io Moreira\7AC Cordeir<polisfS! 0oram utilizados em hibridação controlada como genitores 0eminino e masculino respecti\*amente. =oram genotipados PL h-bridos ;igticos para constituir a população de mapeamento. As plantas de origem ;igticas )4 ha\*iam sido pre\*iamente selecionadas daquelas nucleares por meio de marcadores moleculares @A!D e seleção \*isual nas quais os h-bridos com morfologia 0oliar id/ntica ao genitor 0eminino 0oram descartados para as análises.

#### 3.2 Extração do DNA Total

F DBA total 0oi e .tra-do de 0olhas 0rescas de acordo com a metodologia descrita por MD@@A2 e TVFM!SFB QGPK#T com adaptaç9es introdu;idas por MACVADF et al. QGPPJT. Cerca de "##mg de 0olhas 0rescas 0oram la\*adas e trituradas em almo0ari; com nitrog/nio l-quido até a obtenção de um p< 0ino. Ap<s transferência do macerado para tubos de polipropileno de GM m5 0oram adicionados \$M# µ5 de tampão de e.tração QG b CTA3 G## mM Tris+VC7 pV \$ M( G# mM 6DTA( # \$M BaCl( " b sarcosil( " b mercaptoetanolT : J#oC. Os tubos 0oram mantidos por L# min sob agitação peri<dica para completa homogenei;ação. Ap<s o res0riamento 0oi adicionado ao e.trato o mesmo \*olume de cloro0<rmiof4lcool isoam-lico Q"L`GT e feita uma incubação por M min a J#o C e em seguida uma centri0ugação por K min a "LLP .g. F sobrenadante resultante 0oi transferido para um no\*o tubo e homogenei;ado com o mesmo \*olume de CTA3 G# b QG# b CTA3( # \$M BaClT ap<s o que igual \*olume de cloro0<rmiof4lcool isoam-lico Q"L`GT 0oi no\*amente adicionado e centri0ugado por K min a "LLP .g. F sobrenadante resultante 0oi transferido para um no\*o tubo e : ele adicionado igual \*olume de tampão de precipitação QG b CTA3( M# mM Tris+VC7 pV \$ M( G#mM

6DTAT misturado gentilmente permanecendo L# min em repouso e posteriormente centriugado por J min : G"t#PJ .g. Após a centriugação o sobrenadante foi descartado e o sedimentado (pellet) formado dissolvido em L##  $\mu$ 5 de T6 com alta concentração de BaCl<sub>2</sub> 0G# mM Tris+VC7 pV \$ M( G mM 6DTA( GM BaCl<sub>2</sub> : JMoC até completa dissolução. Posteriormente após resfriamento o DBA foi precipitado com " volumes de etanol G## b e centriugado por J min : G"t#PJ .g e em seguida precipitado novamente com G K volumes com etanol \$# b. F DBA obtido foi dissolvido em J#  $\mu$ 5 de V-F milliN contendo G# pgfp5 de @BAse para a eliminação completa de contaminação por @BA. F rendimento foi de J#ng de DBA f $\mu$ 5.

### 3.3 Marcadores RAPD

Os primers (K#T) aliados nas reações de amplificação de fragmentos de DBA foram de seqüências arbitrárias de G# nucleotídeos dos díctos da Peron Technologies Inc. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de G%  $\mu$ 5 e constituídas de V-F milliN (L L  $\mu$ 5T Tampão G#E (7n\*itrogenT (G%  $\mu$ 5T dBT!s + # " mM de cada dAT! dTT! dCT! e dGT! + !harmacia (G $\mu$ 5T # " mM de RprimerS de G# nucleotídeos (GM ngT + Fperon (G%  $\mu$ 5T Taq DBA polimerase (G M unidadesT (7n\*itrogenT (G%  $\mu$ 5T e de uma solução de % $\mu$ 5 de DBA (Mngf $\mu$ 5T. A amplificação foi conduzida em termocicladores M> @esearch Thermocycler programados para %J ciclos de G min a P" °C G min a %J °C e " min a \$" °C. Ao final do último ciclo foi feita uma extensão final de G# min a \$" °C.

Os produtos da reação foram visualizados em gel de agarose (G J b T preparado em tampão TA6 (G# #L M Tris+acetato G mM 6DTAT e corados com brometo de et-dio (G# M qgf $\mu$ 5T. A corrida eletroforética foi feita em tampão TA6 GE a K# V por aproximadamente %h e os géis fotografados no sistema R6agle 6AeS (Stratagene) sobre luz ultravioleta. Para a seleção de primers foram inicialmente preparadas reações para seis indivíduos da progênie escolhidos ao acaso e ambos os genitores. Primers que geraram polimorfismo entre os genitores e segregação dos marcadores em pelo menos um indivíduo da progênie foram então genotipados em todos os indivíduos da população mapa.

F polimorfismo entre os genótipos foi estimado por meio da presença ou ausência de bandas amplificadas por PCR. F tamanho dos fragmentos @A!D foi

estimado por comparação com o marcador G?b !lus DBA 5adder (Gibco) e os marcadores @A!D de boa intensidade e reprodutibilidade foram analisados quanto : segregação mendeliana esperada (G`G ou %`GT nos PL indivíduos da prog/niet Marcadores @A!D foram analisados de forma que os marcadores com presença de bandas no genitor limão [Cra\*o\ ou citrumelo [S]ingle\T ti\*eram os gen<tipos na população de mapeamento codificados para Im quando presente ou II quando ausente. Para os marcadores provenientes de citrumelo [S]ingle\ ou limão [Cra\*o\T os gen<tipos foram codificados como np quando a banda estiver presente e nn quando ausente.

### 3.4 Marcadores Microsatélites

Marcadores microsatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats) foram amplificados a partir de seqüências de microsatélites obtidas tanto do banco de dados do genoma citros (Cit6STT) (MST) como de DBA gen, micro (G\$GT) previamente obtidas no laboratório.

As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 20 µL e constituídas de 100 ng de DNA, 100 µM de tampão G#E (7n\*itrogen) (20 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM DTT, 1 mM DTT, 1 mM DTT) + 1 U de Taq DNA polimerase (20 unidades) (7n\*itrogen) (20 µM) e de uma solução de 100 µM de DBA (20 µM). A amplificação foi conduzida em termocicladores MJ Research programado para 35 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 1 min. A temperatura de anelamento se inicia a 55°C decrescendo até 45°C a cada ciclo seguido por 30 segundos de anelamento a 72°C. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1% com brometo de etídio (20 µg/ml) e fotografados sobre luz ultravioleta.

Os marcadores encontrados apresentaram todos os tipos de segregação para uma população C! (Cross pollinators). Os dados utilizados para a construção do primeiro mapa estão apresentados na tabela 6.

**Tabela 1** Códigos utilizados para os tipos de segregação para uma população C! QCross !ollinatorsT Y

Código	Descrição
rab.cd1	loco hetero;igoto em ambos os genitores quatro alelos
re0.eg1	loco hetero;igoto em ambos os genitores tr/s alelos
rhd.hd1	loco hetero;igoto em ambos os genitores dois alelos
rlm.l11	loco hetero;igoto em um genitor
rnn.np1	loco hetero;igoto em outro genitor

Y c<digos do programa >oinMap \* %k# QVAB FF7>6B e VFF@!7!S "##GT de uma população caracteri;ada como Rcross pollinatorsS! Nue são aquelas pro\*enientes de genitores hetero;igotos com base de ligação dos locos originalmente desconhecida

### 3.5 Marcadores TRAPs (Target Region Amplification Polymorphism)

As combinaç9es de RprimersS Oi.os e aleat<rios QJT 0oram a\*aliadas nas reaç9es de ampli0icação de 0ragmentos de DBA Q" Oi.os` !G e !" e % aleat<rios` @G( @" e @%T! F RprimerS Oi.o Qgene al\*oT 0oi desenhado de um banco de dados de seqZ/ncia 6ST enquanto o segundo RprimerS o arbitr4rio QGK a "# pbT possui em sua e.tremidade %\ % a L nucleot-deos seleti\*os L a J nucleot-deos no centro da seqZ/ncia Qrica ou em AT ou GCT ampli0icando as demais regi9es pro\*4\*eis do gene candidato e seqZ/ncias de preenchimento na e.tremidade Mk relacionadas com o desempenho do RprimerS

A ampli0icação por !C@ 0oi 0eita por cinco ciclos iniciais com uma temperatura de anelamento de %MoC seguida por %M ciclos com uma temperatura de anelamento de M#oC! Fs 0ragmentos com tamanhos \*ariando de M# a P##pb 0oram separados em um gel de seqZenciamento de poliacrilamida J Mb

R!rimersS =i.os Fs RprimersS Oi.os 0oram desenhados a partir seqZ/ncias parciais de genes di0erencialmente e.pressos detectados nos trabalhos com hibridação Rin silicoS a partir da identi0icação da seqZ/ncia no Cit6ST! SeqZ/ncias estas com homologia aos genes que codi0icam duas en;imas Q[CinnamoAl+CoA reductase\ e [Ca00eic acid+F+MethAltrans0erese\T en\*ol\*idas na rota metab<lica de bioss-ntese da lignina QC@7STF=AB7 et al! in pressT! As seqZ/ncias dos RprimersS estão apresentadas na tabela "

Dm mecanismo de de0esa contra o ataque de pat<genos é uma r4pida deposição de compostos 0en<licos como a lignina em paredes prim4rias nos s-tios de in0ecção ligando+se a polissacar-deos para bloquear o a\*anço do pat<geno

**Tabela 2** Seqüências dos Rprimers específicos e arbitrários utilizados para os marcadores T@A!s

“Primers”	Gene	Nomenclatura	Seqüência (5'→3')
R!rimersS =i.os R=or J ardS	CinnamoAl-CoA reductase	!G	GCCCGTGCTGCCTGATGATT
	Ca00eic acid+F+ MethAltrans0erase	!"	ACAGGGCCAAAGGTAAACACA
S!rimersS Arbitr4rios R@e*erseS Y		@G	GACTGCGTACGAATTAAT
		@"	GACTGCGTACGAATTTGC
		@%	GACTGCGTACGAATTGAC

YFs RprimersS arbitr4rios foram desenhados de acordo com 5i e Nuiros Q"##GT

As reações de amplificação foram conduzidas a um volume final de 50 µl com os seguintes componentes: 10 µl da amostra de DNA, 10 µl do tampão de reação, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de dNTPs, 0,5 µM dos RprimersS arbitrários e 0,5 µM dos RprimersS específicos. A reação foi realizada com temperatura de desnaturação do DNA a 95°C por 1 min. A seguir, 30 ciclos a 95°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 1 min, seguidos de 10 ciclos a 95°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 1 min e um passo de extensão a 72°C por 5 min.

Após a reação de amplificação, 5 µl de tampão da amostra contendo 10 mM Tris+VCl, 1 mM EDTA a 80°C, 0,1% SDS, 0,1% gliceroIT foram adicionados às reações. Uma al-quota de 5 µl foi aplicada no gel de seqüenciamento de poliacrilamida 6% contendo as recomendações do fabricante. A eletroforese foi conduzida a 200 V por 1 h em cuba vertical para eletroforeses de ácidos nucleicos tipo Sequi+Gen SAssem da BioLad sendo o gel corado com prata.

Os marcadores T@A!s de boa intensidade e reprodutibilidade foram analisados quanto à segregação mendeliana esperada (3:1 ou 1:1) nos PLh-bridões de forma idêntica: análise adotada para os marcadores T@A!D descritos

anteriormente.

## **3.6 Avaliação de Características Morfológicas**

As características morfológicas como morfologia foliar, capacidade de enraizamento de estacas e avaliação de resistência a CTV foram avaliadas e incluídas ao mapa de ligação.

### **3.6.1 Morfologia foliar**

A morfologia foliar foi avaliada em P<sub>1</sub> h-íbridos e seus " genitores como monofoliada ou trifoliada. As determinações foram realizadas em plantas juvenis mantidas em casa-de-vegetação em três repetições. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. A avaliação da morfologia das folhas foi realizada em três folhas de cada repetição coletadas em uma posição mediana em relação : altura das plântulas estimando-se um "comprimento" largura" das folhas monofoliadas (simples) e trifoliadas (englobando as folhas mistas + bifoliadas e suas variações). Estes dados foram incluídos como características fenotípicas no mapa de ligação.

### **3.6.2 Capacidade de enraizamento de estacas**

A capacidade de enraizamento de estacas foi avaliada em P<sub>1</sub> h-íbridos e seus

originadas das plântulas originais livres de CTV foram multiplicadas por en.ertia sobre limão [Cravo] e inoculadas por en.ertia com borbulhas infectadas com a estirpe 3arão 3 do vírus Q=igura GT. Todos os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação com tr/s repetições para cada indivíduo. A avaliação da presença de CTV foi feita aos 7 e 14 dias após a en.ertia com as borbulhas contaminadas. A presença do vírus foi avaliada em nervuras de folhas jovens e cascas de ramos apicais.

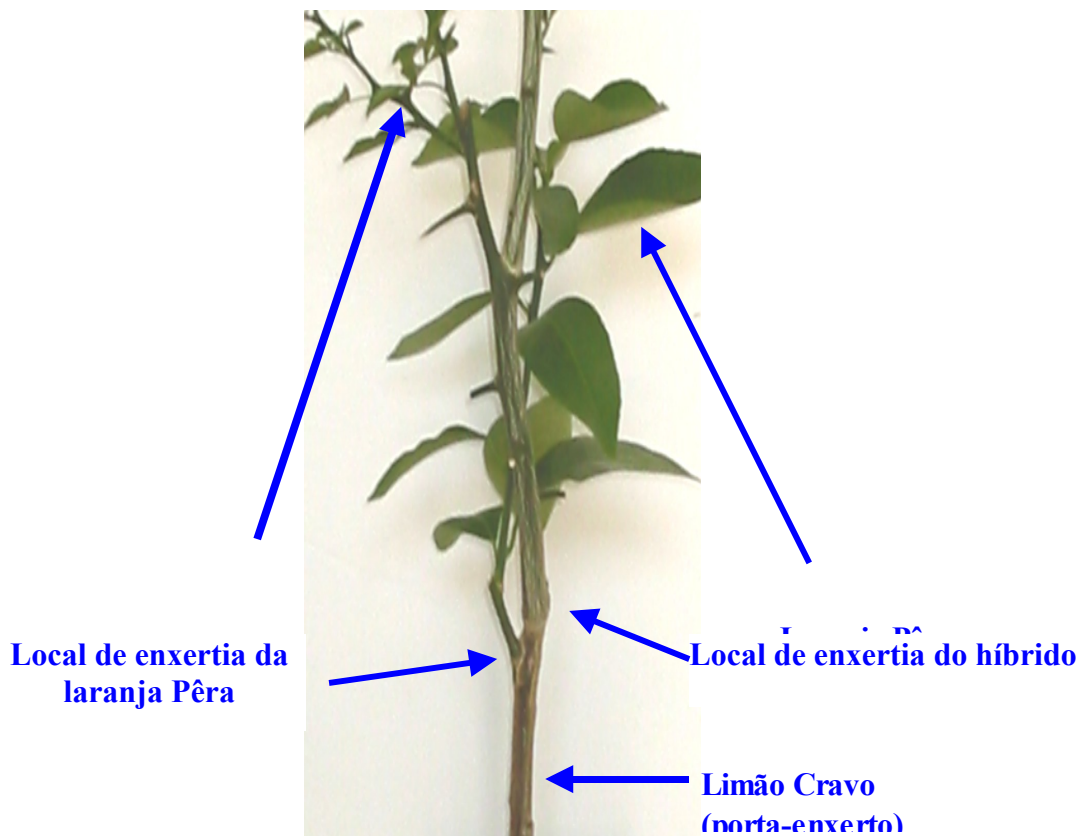
Berbas centrais das folhas e cascas foram trituradas com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino o qual foi ressuspenso em tampão de extração numa concentração final de 100 mg da amostra por ml de tampão. A detecção do CTV foi realizada por meio de ELISA segundo a metodologia descrita por C5A et al (GPKJT) placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 µg de antissoro policlonal Q3 @ 100 µg/ml Q3A!T7STA et al. GPPJT de coelho anti-CTV diluído a 1:1000 em tampão carbonato 0.1 M pH 7.2 e incubadas a 4°C por um período de 24 h. As placas foram bloqueadas com 100 µg de BSA em 0.1 M pH 7.2 por 2 h. As placas foram lavadas com 0.1 M pH 7.2 contendo 0.05% de Tween 20 e incubadas por 1 h com a amostra diluída em tampão de leite em pó desnatado e incubadas por 1 h a 37°C. As placas foram lavadas tr/s vezes com 0.1 M pH 7.2 contendo 0.05% de Tween 20 e incubadas por 1 h com a amostra positiva e outra negativa como controles do imunoensaio.

A incubação foi feita : noite a 4°C repetindo em seguida as tr/s la\*agens com BSA anteriormente foram adicionados 100 µg de uma mistura dos anticorpos monoclonais D=G e CAM universais para isolados de CTV produzidos na Espanha Q@FMAB et al. "###LT a uma diluição de 1:1000 e incubados por 1 h a 37°C repetindo-se as la\*agens das placas conforme 4 descrito. Foram adicionados 100 µg de antígeno anti-mouse IgG conjugado a fosfatase alcalina diluído a 1:1000 em 0.1 M pH 7.2 e incubadas por 1 h a 37°C. Após as la\*agens foram adicionados 100 µg de substrato pB!! (p-nitrofenil fosfato) na concentração de 1 mg/ml diluído em tampão substrato dietanolamina pH 7.2 contendo 0.05% de Dietanolamina e 0.05% de BaCl<sub>2</sub>. As amostras foram ensaiadas em duplicata. As placas foram incubadas no escuro por 1 h : temperatura ambiente e a leitura da absorbância foi efetuada a 405 nm em leitor de 657SA Q%MM# 37F@ADT.

As plantas foram consideradas positivas se as médias das leituras de absorbância em leitor de 657SA baseadas em tr/s repetições para cada um dos PL



h-bridos e seus genitores foram significativamente maiores pelo teste Scotta e notadamente maiores que o controle negativo.



**Figura 1.** Ilustração de como os híbridos de limão (Cravo) com citrumelo (S) e os genitores foram inoculados com material de laranja infectada com CTV estirpe (3arão 3).

### 3.8 Análises Estatística dos Dados Morfológicos

Vistogramas de distribuição das médias de todas as variáveis foram obtidos pelo aplicativo Statistica e o Janelo. A análise de variância e teste de comparação de médias foram realizadas utilizando o aplicativo SAS/Agri (CABT67 et al. 1997).

Para comparação de médias foi utilizado o teste Scotta e o SCFTT e o BFPT a Mb de probabilidade que separa as médias por meio de comparações entre grupos de média de dados.

Foi aplicado o método de análise de variância para calcular os parâmetros genéticos (herdabilidade, variância, coeficiente de variação) para todas as variáveis.

### 3.9 Construção dos Mapas de Ligação

Os marcadores foram integrados aos mapas de ligação utilizando o programa `oinMap` \* `%L# QVAB FF7>6B` e `VFF@7!S "##GT`. Este programa permite análise conjunta de marcadores segregando nas proporções `G`G %`G G``G` e `G`G`G`G`. De acordo com as instruções contidas no programa a população foi caracterizada como `C! QRCross !ollinatorsST` proveniente de genitores heterocigotos com base de ligação dos locos originalmente desconhecida. Os grupos de ligação foram formados e ordenados utilizando-se `5FD % #` e `m4`. Limite de `L#b` de recombinação. As frequências de recombinação estimadas em análises multiponto foram convertidas em distância genética (centiMorgans) por meio da função de `Posambi`. F teste qui-quadrado  $\chi^2$  `Q! ≤ ##M G5_GIn QST655` e `TF@@76 GPK#T` foi utilizado para testar as hipóteses de segregação Mendeliana `G`G %`G G``G` e `G`G`G`G` para cada um dos marcadores `SS@ @A!D` e `T@A!`.

### 3.10 Identificação de QTLs

Os dados fenotípicos utilizados (índice para morfologia foliar, absorção +CTV e número de estacas enraizadas) foram obtidos por meio das médias ajustadas dos clones. Para a detecção e mapeamento de NT5s na população derivada de limão [Cra\*o] . citrumelo [S]ingle foram realizadas análises por meio do programa `MapNT5` \* `L# QVAB FF7>6M` et al. "##"T utilizando-se os testes paramétricos `R7nter*al MappingS Q5ABD6@` e `3FTST67B GPKP( VAB FF7>6B GPP" T` e `Multiple NT5 Mapping QMNMT Q>ABS6B GPPLT`. A detecção dos NT5s foi realizada pelo módulo `R7nter*al MappingS Q7MT` com fator de significância de `PMb Q 1 # #MT` para identificar NT5s com efeitos principais significativos. F módulo `MNM` foi então utilizado para detectar possíveis NT5s mascarados pelos NT5s identificados pelo 7M. A estratégia `MNM` recorre-se ao uso dos marcadores que flanqueiam os NT5s identificados pelo 7M como co-fatores por meio da opção `Rautomatic co0ator selectionS` do aplicativo. F `5FD` crítico de cada NT5 foi calculado usando-se o teste de permutação `rand,mica QG###` repetições `QCVD@CV755` e `DFDG6 GPPLT` disponível no `MapNT5`.

F teste para verificar se um NT5 está ligado ao marcador é baseado na estatística da razão de verossimilhança (utiliza logaritmos naturais)

em que refere-se : hipótese da presença de um NT5

ligado a esse marcador com a pressuposição de que a distribuição dos fenótipos é normal. No mapeamento de NT5s é muito comum o uso do logaritmo das probabilidades na base 2. Quando  $D_m$  é igual a 1/2 indica que a hipótese alternativa é  $G^+$  ou  $G^-$ ; e, se  $D_m > 1/2$ , indica que a hipótese nula é a diferença entre o  $G^+$  e estatística é a base do logaritmo usada no teste.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos da mensuração de todas as variáveis estudadas no presente trabalho: absorvância a 657 nm após 5 min de reação com substrato no 657SA, associação para CTVT, enraizamento de estacas, índice de morfologia foliar e tipo de folha nos respectivos híbridos e os genitores estão apresentados na tabela 1. As estimativas de parâmetros genéticos para estas variáveis estão apresentados na tabela 2.

Analisando as frequências de distribuição das médias das características estudadas, a análise das variáveis associadas ao número de estacas enraizadas e leitura da absorvância em 657SA e CTVT mostram distribuição em classes distintas enquanto que o índice de morfologia foliar mostra uma distribuição contínuamente normal.

**Tabela 3** Resultados médios obtidos da mensuração das variáveis: altura de CT, índice de morfologia foliar e tipo de folha em plantas de PL híbridos de limão [Cravo] e citrumelo [S] e genitores

Planta/ Híbrido	CTV <sup>[1]</sup>	Planta/ Híbrido	E [%]	E <sup>[2]</sup>	Planta/ Híbrido	IF <sup>[3]</sup>	Tipo de folha			
<b>L. 'Cravo'</b>	G&L#	a	GK	P#	G&K	a	L#	%&PL	a	Mista
ML	G&G"	a	"P	K#	G&J	a	MK	%&M%	b	Mono0oliada
\$#	G&GG	a	JG	K#	G&J	a	%M	%&LJ	b	Mono0oliada
KJ	G&G#	a	MK	\$#	G&L	a	%	%&%#	b	Mista
P%	G&#P	a	MJ	\$#	G&L	a	JL	%&"L	b	Mista
\$"	G&#\$	a	P	\$#	G&L	a	G%	%&" "	b	Mista
MJ	G&#M	a	M\$	J#	G&"	a	MP	%&GP	b	Mista
JL	G&#L	a	GL	J#	G&"	a	\$J	%&GK	b	Mista
PG	G&#G	a	<b>C. 'Swingle'</b>	<b>70</b>	G&"	a	P%	%&GJ	b	Mista
L#	G&##	a	<b>L. 'Cravo'</b>	<b>60</b>	G&"	a	K	%&GJ	b	Mista
G	#&PP	a	LG	M#	G	a	J#	%&#P	c	Mista
\$J	#&PJ	a	G%	M#	G	a	L	%&#L	c	Mista
%"	#&PM	a	KG	M#	G	a	MG	%&##	c	Mista
L	#&P%	a	"	M#	G	a	LP	%&##	c	Mista
MP	#&P"	a	GG	M#	G	b	\$"	"&PP	c	Mista
KL	#&PG	a	\$	M#	G	b	K\$	"&PK	c	Mista
\$G	#&KP	a	KJ	L#	#&K	b	J"	"&PJ	c	Mista
K	#&K\$	a	ML	L#	#&K	b	JP	"&P"	c	Mista
"K	#&\$P	a	%	L#	#&K	b	%J	"&PG	c	Mista
\$\$	#&\$P	a	"\$	L#	#&K	b	LL	"&KP	c	Mista
LM	#&\$K	a	"M	L#	#&K	b	\$\$	"&KP	c	Mista
JG	#&\$M	a	"G	L#	#&K	b	GL	"&KP	c	Mista
M	#&\$L	a	"#	L#	#&K	b	"#	"&KP	c	Mista
GK	#&\$"	a	\$M	L#	#&K	b	MJ	"&KS	c	Mista
G\$	#&\$G	a	MM	L#	#&K	b	GP	"&KJ	c	Mista
L\$	#&\$G	a	%#	L#	#&K	b	PG	"&KG	c	Mista
KG	#&\$G	a	KK	%#	#&J	b	JJ	"&KG	c	Tri0oliada
LK	#&J\$	a	\$L	%#	#&J	b	JG	"&K#	c	Mista
G"	#&JJ	a	JP	%#	#&J	b	"P	"&SP	c	Mista
P	#&JL	a	L\$	%#	#&J	b	M"	"&SS	c	Mista
K\$	#&J"	a	G#	%#	#&J	b	%L	"&SS	c	Mista
K"	#&JG	a	G	%#	#&J	b	%#	"&SS	c	Mista
L"	#&JG	a	\$J	%#	#&J	b	K%	"&SJ	c	Mista
"	#&JG	a	%"	%#	#&J	b	JM	"&SJ	c	Tri0oliada
M\$	#&M\$	a	M	%#	#&J	b	P"	"&SM	c	Mista
"G	#&M\$	a	PG	"#	#&L	c	"%	"&S%	c	Mono0oliada
L%	#&MJ	a	K%	"#	#&L	c	GG	"&S#	d	Mono0oliada
J\$	#&MJ	a	LJ	"#	#&L	c	G"	"&JK	d	Mono0oliada
G#	#&MM	a	L#	"#	#&L	c	<b>L. 'Cravo'</b>	"&JJ	d	Mono0oliada
JM	#&ML	a	%G	"#	#&L	c	ML	"&JL	d	Mista
%%	#&LJ	b	"K	"#	#&L	c	\$P	"&JL	d	Mista
"#	#&LM	b	GP	"#	#&L	c	"K	"&JL	d	Mono0oliada
\$K	#&LM	b	K	"#	#&L	c	J%	"&J"	d	Mista
J%	#&L%	b	J	"#	#&L	c	KJ	"&MP	d	Mista
"M	#&LG	b	L	"#	#&L	c	\$	"&MP	d	Mista
\$L	#&L#	b	\$P	"#	#&L	c	M	"&MP	d	Mista
"J	#&L#	b	JK	"#	#&L	c	"\$	"&MK	d	Mista
LG	#&%P	b	MP	"#	#&L	c	L"	"&MJ	d	Mono0oliada
%P	#&%P	b	%P	"#	#&L	c	GJ	"&MJ	d	Mista
J#	#&%P	b	%K	"#	#&L	c	JK	"&MM	d	Mono0oliada
LP	#&%K	b	G\$	"#	#&L	c	\$M	"&MM	d	Mista
J"	#&%\$	b	PL	G#	#&"	c	LK	"&ML	d	Mista

**Tabela 3** Resultados médios obtidos da mensuração das variáveis: altura de CT, índice de morfologia foliar e tipo de folha em plantas de PL híbridos de limão [Cravo] e citrumelo [S] e genitores. (Continuação)

Planta/ Híbrido	CTV <sup>[1]</sup>	Planta/ Híbrido	E [%]	E <sup>[2]</sup>	Planta/ Híbrido	IF <sup>[3]</sup>	Tipo de folha
%#	#%\$ b	P"	G#	#" c	"M	"M% d	Monofofoliada
\$M	#%J b	KP	G#	#" c	GM	"M" d	Monofofoliada
"%	#%# b	KM	G#	#" c	%P	"MG d	Monofofoliada
LJ	#%# b	\$#	G#	#" c	\$L	"M# d	Monofofoliada
MK	#%"P b	JJ	G#	#" c	\$#	"M# d	Trifofoliada
G%	#%"M b	JM	G#	#" c	"J	"M# d	Monofofoliada
J	#%"L b	J"	G#	#" c	%G	"LP d	Monofofoliada
GG	#%"G b	M#	G#	#" c	KL	"LK d	Monofofoliada
M#	#%GM b	%J	G#	#" c	M\$	"LK d	Mista
K#	#%GG b	%M	G#	#" c	"L	"LK d	Mista
M"	#%G# b	%L	G#	#" c	G	"LK d	Monofofoliada
"L	#%G# b	"J	G#	#" c	GK	"LK d	Mista
%G	#%G# b	GJ	G#	#" c	PL	"L\$ d	Mista
%L	#%G# b	GM	G#	#" c	LM	"L\$ d	Mista
"\$	#%#K b	G"	G#	#" c	"	"LM d	Monofofoliada
MG	#%#\$ b	P%	#	# c	\$G	"LM d	Monofofoliada
"P	#%#\$ b	P#	#	# c	L\$	"LM d	Mista
GL	#%#\$ b	K\$	#	# c	G\$	"LL d	Mista
PL	#%#J b	KL	#	# c	LG	"LL d	Monofofoliada
JP	#%#J b	K"	#	# c	M%	"L% d	Monofofoliada
P#	#%#M b	K#	#	# c	KP	"L% d	Monofofoliada
P"	#%#L b	\$K	#	# c	%K	"L% d	Monofofoliada
GM	#%#L b	\$%	#	# c	M#	"L# d	Monofofoliada
KM	#%#L b	\$"	#	# c	KG	"L# d	Mista
M%	#%#L b	\$"	#	# c	KM	"%K d	Monofofoliada
KP	#%#L b	\$G	#	# c	P#	"%K d	Monofofoliada
JJ	#%#L b	J\$	#	# c	J	"% " d	Monofofoliada
\$	#%#% b	JL	#	# c	P	"%# d	Mista
LL	#%#% b	J#	#	# c	%"	"%"P d	Mista
%M	#%#% b	J#	#	# c	L%	"%"\$ d	Mista
MM	#%#" b	M%	#	# c	KK	"%"J d	Mista
%K	#%#" b	M"	#	# c	"G	"%"J d	Mista
KK	#%#" b	MG	#	# c	K"	"%"L d	Mista
<b>C. 'Swingle'</b>	#%#G b	LP	#	# c	K#	"%GP d	Mista
JK	#%#G b	LK	#	# c	\$K	"%GP d	Mista
%	+	LM	#	# c	MM	"%GM d	Mista
GJ	+	LL	#	# c	G#	"%G% d	Mista
GP	+	L%	#	# c	LJ	G%KG e	Mista
" "	+	L"	#	# c	J\$	G%\$% e	Monofofoliada
%J	+	%\$	#	# c	<b>C. 'Swingle'</b>	G%%" 0	Trifofoliada
\$%	+	"L	#	# c	%	+	+
\$%	+	"%	#	# c	" "	+	+
\$P	+	" "	#	# c	\$%	+	+
K%	+	%	#	# c	\$%	+	+

<sup>[1]</sup> média de tr/s medidas de absorção a L#M nm ap#s J# min de reação com substrato no 657SA

<sup>[2]</sup> média de M repetições

<sup>[3]</sup> média de % repetições

Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Scott's ?nott a Mb & Vale ressaltar que o teste de Scott's ?nott empregado não utiliza DMS (diferença mínima) significati#a entre um tratamento e outro.

**Tabela 4.** Estimativas de parâmetros genéticos obtidos para as características número médio de estacas enraizadas, absorvência QCTVT e índice de morfologia foliar em uma progênie de PL indivíduos do cruzamento entre limão [Crato] e citrumele [S]

Característica	$\sigma^2_{PI}$	$\sigma^2_{PE}$	Acclon	$\sigma^2_{TA}$	$\sigma^2_{TE}$	f	Média
Número médio de estacas enraizadas	# P	# J\$	# KG	K%	G"P	# JL	# LL
Absorvência QCTVT	# LL	# \$\$	# KL	JL	\$"	# KK	# L\$
Índice de Morfologia foliar	# J"	# K%	# PG	G"#	G##	G "	" J%

Legenda:  $\sigma^2_{PI}$  = herdabilidade individual no sentido amplo (ou seja) efeitos genotípicos;  $\sigma^2_{PE}$  = herdabilidade média;  $\sigma^2_{TA}$  = coeficiente de variação ambiental em porcentagem;  $\sigma^2_{TE}$  = coeficiente de variação genotípica em porcentagem; **Acclon** = acurácia da seleção; **Média** = média geral do experimento.

Os coeficientes de herdabilidade individual no sentido amplo  $\sigma^2_{PI}$  para todas as características estudadas variaram de # P a # J. A variabilidade genotípica é pressa pelo coeficiente de variação genotípica  $\sigma^2_{TE}$  foi alta para todas as variáveis (K% a G"#) (Tabela 4).

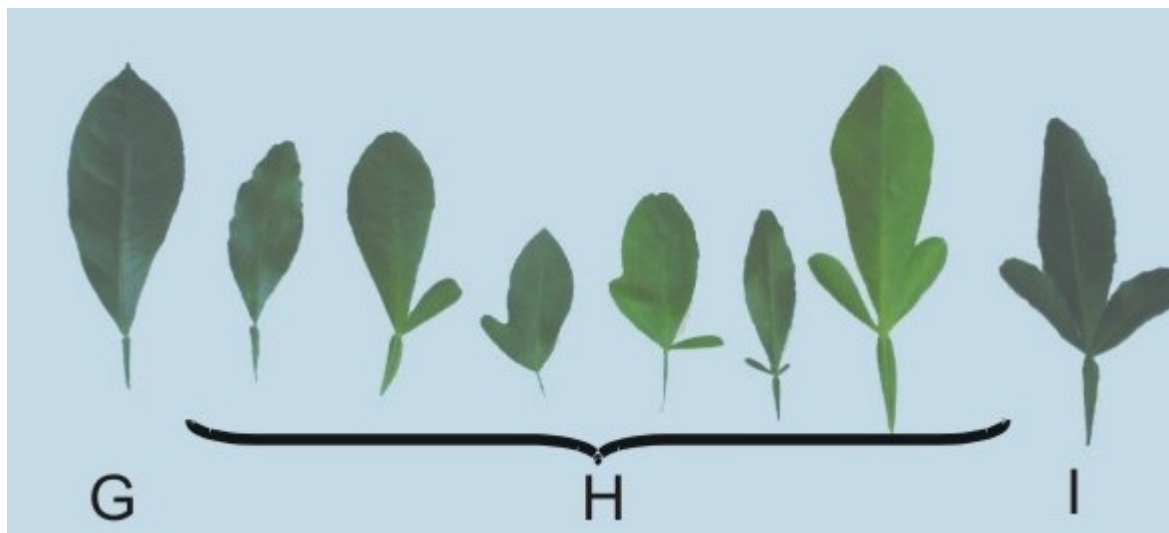
A precisão experimental inerida pelo coeficiente de variação experimental em associação com o coeficiente de variação genotípica por meio da razão

$$f = \frac{\sigma^2_{TE}}{2 \sigma^2_{TA}} \text{ variou de } \# \text{ JL a } G \text{ " (Tabela 4)}$$

A herdabilidade em nível de média de clone  $\sigma^2_{PE}$  variou de moderada a alta para as variáveis # J\$ a # K%. A acurácia na seleção genotípica (**Acclon**) que se refere: correlação entre o valor genotípico verdadeiro e aquele predito pelo método estatístico (35D) no caso  $\sigma^2_{PE}$  foi alta para todas as características.

## 4.1 Caracterização Morfológica dos Híbridos

### 4.1.1 Padrão foliar



**Figura 2.** Padrão de folíolos e folhas em h-íbridos de limão [Crataegus] com citrumelo [Citrus]. G - limão [Crataegus] H - h-íbridos I - citrumelo [Citrus]

Figura 2 apresenta folhas subdivididas em três folíolos (Figura 2) caracter considerado dominante sobre folhas simples de citros (CAM6@FB e @FST GPJKT).

Dos PL h-íbridos em L indivíduos houve perda de material foliar. Portanto foram avaliados P# h-íbridos e seus " genitores (Tabela 2). Quando se considera a quantidade de h-íbridos com folhas trilobadas (englobando as folhas mistas + bilobadas e suas variações) o experimento resultou em uma taxa de 60% de folhas trilobadas para folhas simples (JM" "P(  $\chi^2$  - G \$#  $\alpha$  - # #M T). Esta taxa de segregação é consistente com dois genes dominantes segregando independentemente. O notável a grande variação no padrão da morfologia foliar (Figura 2) nos h-íbridos com folhas trilobadas.

F - índice de morfologia foliar (comprimento/largura foliar) foi de " JJ para o limão [Crataegus] e G %% para o citrumelo [Citrus] indicando que as folhas de citrumelo [Citrus] apresentam uma relação comprimento/largura menor que as folhas de limão [Crataegus]. Alguns h-íbridos apresentam folhas com relação

comprimento largura semelhantes ao do limão [Cra\*o\ e alguns apresentam esta relação superior com folhas com largura menor e comprimento maior. De qualquer forma parece que todos os h-bridos apresentam folhas mais estreitas que o genitor citrumelo [S ] ingle\.

F -ndice utilizado representa um marcador morfológico como análise suplementar para avaliar o quanto estatisticamente os h-bridos e os genitores podem ser diferentes entre si por uma abordagem comprimento dividido pela largura. Este índice foi contrastado com um outro índice que multiplica essas medidas que se aproxima : área foliar. Contudo foi observado que o índice obtido por multiplicação não é aplicável para a análise em questão. Porque considerando o fator juvenalidade das plantas em estudo as diferenças morfológicas neste último caso são superestimadas por apresentarem nesta fase tamanhos variados de folhas com distribuição aleatória em diferentes locais da planta.

As médias estatisticamente diferentes dos índices não tiveram correlação com a morfologia trilobada e monofoliada possivelmente por apenas o lobo central foliar ter sido considerado para as medidas dimensionais comprimento e largura. Bianco et al. (2007) utilizaram-se das mesmas medidas dimensionais multiplicadas para estudar a área foliar na avaliação de crescimento vegetal de milho por meio de equações de regressão entre a área foliar real e os parâmetros dimensionais lineares de suas folhas.



#### 4.1.2 Enraizamento de estacas



**Figura 3** Imagem de enraizamento de estacas de limão [Crato] (AT citrumelo [S] ingles] (CT e h-brido Q3T

Bo presente trabalho foram avaliadas PL plantas h-bridas e seus " genitores com cinco repetiç9es e duas estacas por parcela. F citrumelo [S] ingles] e o limão [Crato] apresentaram as mesmas médias (G "T de enraizamento de estacas considerando médias de duas plantas por parcela e cinco repetiç9es sendo que alguns h-bridos mostraram médias de enraizamento semelhantes aos dos genitores sem apresentar diferença estat-stica signifiicati\*a. Grande parte dos h-bridos apresentou enraizamento de estacas menor que os genitores e \*4rios gen<tipos mostraram dificuldade em enraizar (Tabela %T

A estaquia é um método de propagação em que segmentos destacados de uma planta sob condições adequadas emitem ra-;es e originam uma no\*a planta com características id/nticas : quella que lhe deu origem (M656TT7 "###T 6m citros a propagação \*vegetati\*a ou clonal de porta-en.ertos é realida por meio do uso das sementes devido : e.ist/ncia da apomi.ia e embrionia nuclear. Entretanto a estaquia é um método interessante de propagação para os trabalhos de melhoramento quando se pretende avaliar uma prog/nie h-brida sem a necessidade de esperar que os h-bridos produzam frutos para a obtenção de repetiç9es.

!7F et al<sup>1</sup> Q"###LT obti<sup>eram</sup> porcentagens de enraizamento de " M a MK b em diferentes variedades de marmeleiros<sup>6</sup> m citros estudos conduzidos por SA33AV et al<sup>1</sup> QGPPGT mostraram que LL e \$\$ b das estacas de tangerina Cleopatra e respectivamente enraizam ap<sup>s</sup> tratamento com 4cido indol but-rico<sup>6</sup> S7V76@F et al<sup>1</sup> Q"###T encontraram G# b de enraizamento para \$# b para e M# a G## b de enraizamento entre os h-bridos do cruizamento entre ambos<sup>6</sup>

Bo presente trabalho foram obser<sup>adas</sup> porcentagens de \$# b para citrumelo [S]ingle\ J# b para limão [Cra\*o\ e de # a P# b para os h-bridos<sup>6</sup>

#### 4.2 Avaliação de Resistência ao CTV

F 657SA tem sido utili<sup>ado</sup> em outros estudos para medidas quantitati<sup>as</sup> de populaç<sup>ões</sup> de fungos bactérias e \*-rus QAD56@576ST6 e VAB 66D h7>? GPP"( 7?DTA et al<sup>1</sup> "###( M626@ et al<sup>1</sup> "###T<sup>6</sup> m estudos reali<sup>ados</sup> por A53A@ et al QGPPKT a técnica foi utili<sup>ada</sup> para quanti<sup>ficar</sup> ac<sup>umulo</sup> de \*-rus em tecidos de plantas com a finalidade de mapear NT5s para resist<sup>ncia</sup> a \*-rus em arro<sup>6</sup> m u<sup>a</sup> o uso do 657SA no estudo da quanti<sup>ficac</sup>ão do n<sup>umero</sup> células de bactéria causadora da nos tecidos dos \*asos condutores pro<sup>ou</sup> ser um instrumento e<sup>eti</sup>o para a detecç<sup>ão</sup> de NT5 associado : resist<sup>ncia</sup> Q?@7VAB6? et al<sup>1</sup> "###JT

Bo presente trabalho as PL plantas h-bridas e seus genitores limão [Cra\*o\ e citrumelo [S]ingle\ com tr/s repetiç<sup>ões</sup> cada foram inoculadas com o isolado se<sup>ro</sup> do \*-rus da triste;a mantido na variedade de laranja [3arão 3\ m Q5KT Fsbecdn por meio da en<sup>ertia</sup> de borbulhas contaminadas<sup>6</sup> m no\* e h-bridos não hou<sup>e</sup> pegamento das borbulhas utili<sup>adas</sup> como fonte de in<sup>culo</sup> assim sendo foram a<sup>aliadas</sup> KM plantas h-bridas e os " genitores<sup>6</sup> Fs resultados médios obtidos da mensuraç<sup>ão</sup> desta \*ari4\*el encontram<sup>se</sup> resumidos na tabela %<sup>6</sup> A análise pelo teste Scotta ?nott das médias de tr/s leituras de absorb<sup>ncia</sup> do 657SA resultou na separaç<sup>ão</sup> da populaç<sup>ão</sup> de h-bridos em plantas com médias de leitura de absorb<sup>ncia</sup> que não di<sup>eriram</sup> estatisticamente da média do genitor limão [Cra\*o\ Qmédias acima de # MT e plantas com médias que não di<sup>eriram</sup> estatisticamente da média obtida para o genitor citrumelo [S]ingle\ Qmédias abai<sup>o</sup> de # MT<sup>6</sup>

Até J# dias de inoculaç<sup>ão</sup> poucas plantas multiplicaram o \*-rus com a maior parte das amostras apresentou resultados negati<sup>os</sup> Qdados não

apresentados. De modo geral a presença do vírus após inoculação com borbulhas infectadas pode ser detectada por ELISA cerca de 7 a 14 dias após a infecção e 14 a 21 dias por RT-PCR (TAS+AST) (A et al., 2003).

Após 7 dias de inoculação o vírus se replicou suficientemente para ser detectado em RT-PCR e a infecção de 100 plantas resultou em uma taxa de 100% de híbridos resistentes e suscetíveis (Lima et al., 2003) caracterizando que possivelmente apenas o gene *CTV* está controlando a resistência a CTV.

As estirpes de CTV segundo Cordignon et al. (2003) se classificam genericamente em 03 variedades: Bo caso do porta-enxerto limão [Cravo] este apresenta tolerância em relação às estirpes 03 variedades de CTV denominadas normais com exceção daquela denominada extremamente severa como o complexo 3A e apenas tolerada pelas tangerinas e alguns outros tipos de citros (Muller et al., 1998; Cordignon et al., 2003). Deve ser destacado que a inoculação por enxertia é considerada uma forma intensa de infecção pelo fato de a planta receptora estar sob contínua e posição ao vírus que está sendo gerado no tecido utilizado como fonte de inoculo (Garnsey et al., 1998).

Muitos autores apontam duas classes fenotípicas ocorrendo na tolerância a CTV mas com proporções de 10% e 90% diferentemente da que pode ser encontrada no presente trabalho (Lima et al., 2003) onde foram considerados aqueles indivíduos com médias que não diferiram estatisticamente do genitor masculino citrumelo [S]ingle. Os seis genótipos destes indivíduos podem ser considerados resistentes pelo fato de não permitirem a replicação do vírus sendo que os resultados do RT-PCR poderiam ser atribuídos ao vírus residual do inoculo (borbulha) que não foi retirado posteriormente (ou representar um atraso na infecção e replicação do vírus em relação às plantas suscetíveis).

Portanto o limão [Cravo] é considerado tolerante ao CTV enquanto o citrumelo [S]ingle resistente sendo essa característica herdada do genitor

Esta resistência de [Cravo] ao vírus da tristeza dos citros foi corroborada por exemplo por Mestre et al. (1998) em que os autores testaram a resistência de cultivares de [Cravo] para três isolados severos de CTV e todos mostraram resistência aos isolados do vírus não desenvolvendo a doença em qualquer situação (Oshida et al., 1998; Garnsey et al., 1998; Oshida, 1998; Mestre et al., 1998; Cordignon et al., 2003). Os dados de segregação de progenies

resistentes e suscetíveis analisadas por Mestre et al. (1988) são consistentes com um controle monogênico da característica de que o alelo de resistência é dominante permitindo que híbridos resistentes a CTV possam ser obtidos entre

e spp. Demais pesquisadores como Joseph et al. (1987) e Gmitter et al. (1988) também encontraram semelhantes resultados.

Entretanto em análises posteriores Mestre et al. (1988) observaram que CTV é capaz de se mover passivamente com o fluído do floema quando inoculados em progênies autopolinizadas de *Ipomoea pes-caprae* Dragonj possuidoras de genótipos resistentes e diferenças com relação à acumulação de CTV primárias ao inoculo foram encontradas em indivíduos da progênie indicando que não é o único loco responsável por resistência a CTV em *I. pes-caprae* e que pelo menos um outro gene está envolvido. Somando-se a isso os autores observaram desvios nas taxas de segregação Mendeliana abrindo possibilidades de interação entre e apontando inclusive para uma possível dominância incompleta e em que doses diferentes de possa ser ou não efetiva no controle da resistência. Contudo diante do fato de isolados de CTV capazes de se multiplicarem em nunca terem sido encontrados os resultados de Mestre et al. (1988) deixam margens para dúvidas sobre a atuação de dois genes no mecanismo de resistência a CTV uma vez que um largo espectro de resistência pode ser devido à interação de muitos domínios gênicos conservados com ou devido à incapacidade do CTV de se sobrepor a dois ou mais genes de resistência diferentes supostamente presentes em.

Seguindo esse raciocínio três genes independentes foram identificados segundo Ordignon et al. (1990) conferindo resistência ou imunidade ao CTV que se manifestam nas plantas como a incapacidade de multiplicar o vírus (Gmitter et al. 1988) (Cristofani et al. 1988) presente em *I. pes-caprae* e *I. pes-caprae* (ambos dominantes não permitindo a multiplicação do vírus e Mestre et al. 1988) que restringe a movimentação do vírus na planta.

Ordignon et al. (1990) divergem nas hipóteses quanto à tolerância/resistência apresentada por Mestre et al. (1988) quando estes afirmam a resistência: tristeza do os primeiros propõem um modelo de epistasia dominante/recessiva para tolerância: CTV. Assim análises de diferentes híbridos reais por Ordignon et al. (1990) sugerem que tolerância é

uma característica dominante inclusive sugerindo que *limão* e *laranja* são tolerantes. Análises cuidadosas desse mecanismo genético realizadas pelos mesmos autores e proporções modificadas de locos segregantes observadas indicam que nenhuma hipótese testada baseada em herança quantitativa ou na ação de um único gene ou dois ou mais locos poderia ser aceita sem considerar a epistasia. Análises de muitos sistemas interagindo conhecidos demonstram uma alternativa de que um modelo de epistasia dominante+recessiva esteja ocorrendo envolvendo dois locos designados como *CTV* e *NT5* que controlam a tolerância de plantas de *Citrus*. Desta forma genótipos intolerantes poderiam ser *CTV<sup>1</sup>NT5<sup>1</sup>*; enquanto que aqueles tolerantes poderiam ser *CTV<sup>2</sup>NT5<sup>2</sup>*. Assim o genótipo da laranja intolerante seria *CTV<sup>1</sup>NT5<sup>1</sup>* enquanto *CTV<sup>2</sup>NT5<sup>2</sup>* e *CTV<sup>1</sup>NT5<sup>2</sup>* tolerantes poderiam ser *CTV<sup>2</sup>NT5<sup>1</sup>* e triótipos *CTV<sup>1</sup>NT5<sup>1</sup>NT5<sup>2</sup>* (Ordignon et al. 1991). Ressaltam ainda que análises adicionais de cruzamentos e análises de NT5 dessas populações poderiam auxiliar a explicar diferenças genéticas entre indivíduos com graus diferentes de intolerância.

Ademais um outro aspecto a ser considerado pelos mesmos autores para explicar alterações nas proporções observadas de indivíduos tolerantes/intolerantes diz respeito não a modelos de epistasia mas sim a desvios de segregação de raças teoricamente esperadas. Uma razão para isso poderia ser seleção pré-igênica de indivíduos e uma desigual viabilidade de embriões particularmente quando se considera a natureza de cruzamentos intergenéricos e interespecíficos. Futuramente o ponto de distorção na segregação nos trabalhos de Ordignon et al. (1991) poderia ser a transmissão diferencial de alelos como um resultado de meiose irregular passível de ser considerada quando se trata de híbridos interespecíficos. Contudo tais observações não influenciam sobremaneira nas conclusões concernentes ao controle genético monogênico encontrado no presente trabalho com proporção 3:1.

#### 4.3 Mapas de Ligação

A possibilidade de identificar, mapear e medir os efeitos dos genes controladores dos caracteres quantitativos utilizando-se marcadores moleculares é uma importante contribuição para o melhoramento dos citros. A relativa facilidade com que se obtêm híbridos entre espécies e/ou gêneros de citros, sua condição predominantemente diplóide, reduzido número cromossômico (n = 11) e pequeno

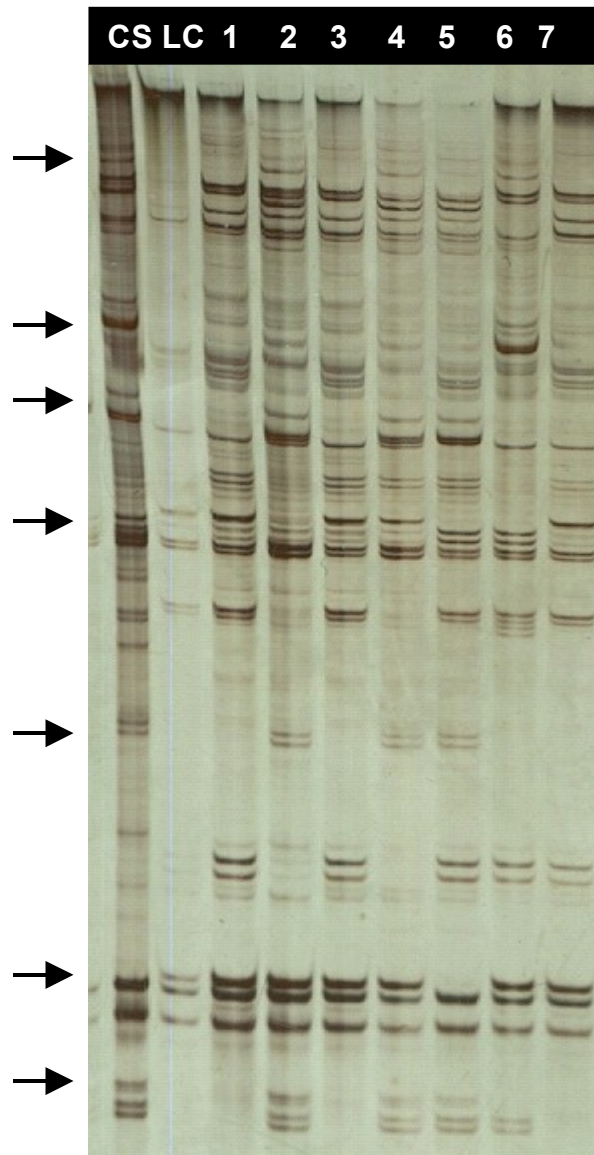
tamanho do genoma (1,2 x 10<sup>8</sup> pb de DNA por nucleotídeo) permitem a construção de mapas genéticos para esse grupo (Coutinho et al., 1997) e para o citrumeleiro (Coutinho et al., 1997).

#### 4.3.1 Marcadores moleculares

Para a seleção de primers na análise de DNA um total de 10 primers com seqüência arbitrária de 6 nucleotídeos (Coutinho et al., 1997) e 2 da Peron Technologies foram aliados utilizando-se os dois genitores (Citrão e citrumeleiro) e uma amostra de seis indivíduos.

Por intermédio da técnica T@A! foram a\*aliadas J combinações de RprimersS Q" 0i.os` !G e !" e % aleatórios` @G( @" e @%T e uma amostra de \$ indivíduos da prog/nie Q=igura MT. Duas combinações Q!"@G e !"@%T não apresentaram produtos de amplificação do DBA após !C@. Quatro combinações Q!G@G( !G@"( !G@%( !"@"T resultaram em %G marcadores T@A!s com uma média de \$ \$M marcadores por par de RprimersS a\*aliado. Portanto o número de marcadores por par de RprimersS T@A!s foi quase quatro vezes maior que o número de marcadores por RprimersS @A!D.

M7?5AS et al. Q"##JT estudaram a aplicação de marcadores T@A!s para mapeamento e localização de marcas associadas a genes de resistência :s doenças em leishão Q T. Grande parte dos T@A!s desenvolvidos a partir de genes de resistência mapearam primeiro ou dentro de RclustersS de genes relacionados : resistência a doenças. Outros mapearam primeiros a NT5s relacionados : resistência a doenças. Os autores encontraram de G% a "# marcadores T@A!s por reação !C@ 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 T@A!s.



**Figura 5.** Teste de Rprimers S T@A!s Q!G@GT para a\*aliação da segregação utilizando os genitores Q5C e CST e h-bridos QG " % L M J e \$T&

Desde que marcadores T@A! foram desenvolvidos por VD e V7C? Q"##%T suas aplicações foram direcionadas para acessar \*ariabilidade genética entre girass<is Q 5&T QVD et al& "##%T em R0ingerprintS em culti\*ares de al0ace Q 5&T QVD et al& "##MT em mapeamento de NT5s Q57D et al& "##MT entre outras&

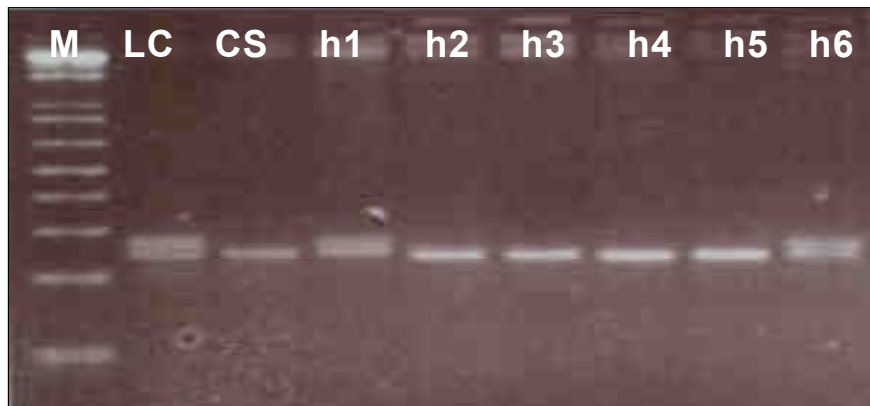
Ba análise @A!D os "\$ RprimersS rand, micos \*alidados geraram pelo menos um 0ragmento polim<r0ico na etapa pré+seleti\*a reali;ada com os genitores e



seis indivíduos da prog/niel Fs RprimersS selecionados (F!CP #!CGP F!7\$ F!7G# F!@G F!@" F!@M F!@J F!@\$ F!@P F!@G# F!@G% F!@GL F!@GM F!2GL F!7G F!@G" F!=% F!=G F!=L F!7G% F!CG# F!7GL F!=G% F!CJ F!@\$ F!C\$ T possibilitaram a ampliação de MK 0ragmentos sendo %J e "" com padrão de segregação hetero;igoto para o citrumelo [S]ingle e limão [Cra\*o\ respectivamente

6m mapas de ligação de tangor [Murcott\ 3AST7AB65 Q"##MT encontraram uma alta porcentagem (M# bT de 0ragmentos A=5! com mesmo tamanho em ambos genitores e que segregaram na proporção %`G na prog/nie sugerindo uma elevada similaridade genética entre os genitores tangor [Murcott\ e laranja [! /ra\& 7sso estaria de acordo com a origem h-brida do tangor [Murcott\ que tem na laranja doce um dos genitores (VFDGSFB GPJ\$( A@A i>F et al& "##%T& Beste trabalho nenhum marcador @A!D foi encontrado apresentando segregação %`G& 6nquanto que para os marcadores T@A!s dois marcadores foram encontrados apresentando esta proporção de segregação&

F n^mero de marcadores SS@ aliados foi de M\$ pares de RprimersS obtidos de seqZ/ncias de 6STs e G\$G obtidos a partir de DBA gen,mico total;ando ""K pares de RprimersS aliados utilizando-se os dois genitores uma amostra de seis indivíduos da prog/nies (igura JT&Vinte e cinco pares de RprimersS foram selecionados com base no polimorfismo entre os genitores e segregação na prog/nie para os primers SS@ provenientes de seqZ/ncias de 6STs e L# pares de RprimersS foram selecionados das bibliotecas gen,micas&



**Figura 6** Teste de Rprimers SS@ QCCSM6PT para a\*aliação da segregação utilizando os genitores Q5C e CST e h-bridos QG " % L M e JT&

A porcentagem de pares de RprimersS polim<r0icos selecionados a partir dos SS@ de bibliotecas de 6STs foi maior QL% KM b T do que os pares de RprimersS selecionados das bibliotecas gen, micas Q" % %P b T& Segundo a literatura os SS@ derivados de bibliotecas de 6STs t/m se mostraram menos polim<r0icos que aqueles derivados de seqZ/ncias gen, micas QSCFTT "##GT& Assim era de se esperar maior polimor0ismo de RprimersS de bibliotecas gen, micas no presente trabalho& 6ntretanto para o desenho dos RprimersS a partir de seqZ/ncias 6STs do Cit6ST foi realizada uma seleçãõ in silicoS de RprimersS que apresentassem maior polimor0ismo Q!A5M76@7 et al& in pressT& Para esta seleçãõ um !C@ \*irtual foi simulado com \*4rias espécies de citros( o primer sinteti;ado foi aquele polim<r0ico para uma ou mais espécies& R7n silicoS é uma e.pressãõ 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 laborat<rio QDABCV7B et al& GPPGT& Esta seleçãõ pro\*a\*elmente contribuiu para o desen\*ol\*imento de marcadores SS@ mais polim<r0icos nas bibliotecas 6STs quando comparados aos das bibliotecas gen, micas&

6m uma análise reunindo os marcadores selecionados @A!D SS@s e T@A!s a hip<tese nula de segregação foi testada Q $\chi^2$  r # #M T para as proporç9es mendelianas esperadas QG`G( G`" `G G`G`G e %`GT empregando-se o teste estat-stico do Nui+quadrado indi\*idualmente para todos os marcadores selecionados& Fs resultados encontram-se nos ane.os 777 7V e V& Dma 0reqZ/ncia de %Gb dos

marcadores apresentou segregação distorcida em relação às proporções mendelianas de segregação esperada.

A literatura relata desvios de segregação em marcadores em mapas de ligação genética em vários níveis em híbridos intergenéricos e interespecíficos com alores entre *P. b. QG@ATTA!AG57A* e *S6D6@F== GPPLT* e *G##b QB76BVD7S* et al. *GPK\$T F57V67@A* et al. *Q"##MT* observaram JG Mb de desvio de segregação em marcadores de laranja [! /ra\ e "M Mb em tangerina [Cra\*o\ quando comparado com a segregação mendeliana esperada de *G`G Q r # #MT* sendo que marcadores heterocigóticos em ambos os genitores mostraram L# b de desvio de segregação esperada de *%`G Q r # #MT* 6m c\* @ubidou. @D78 e AS7BS *Q"##%T* encontraram %P \$ b dos marcadores com desvio de segregação. TAB ?S562 et al. *QGPP" T* sugeriram que rearranjos cromossômicos, seleção gamética ;ig<tica e/ou p<s+; ig<tica podem causar desvios de segregação em várias espécies. Segundo @D78 e AS7BS *Q"##%T* a presença de fatores letais recessivos e o aumento de alguns alelos na seleção gamética ou aborto do embrião por exemplo são possíveis causadores de segregação distorcida em citros em nível gamético e ;ig<tico.

### 4.3.2 Análise de ligação

Os JM pares de Rprimers *SS@ "\$ Rprimers @A!D* e L pares de Rprimers *T@A!* selecionados resultaram em GML marcadores. Os marcadores polimórficos e segregantes foram aliados em um total de PL indivíduos da prog/niê. Dma matriz de dados foi então gerada onde as colunas representam os diferentes indivíduos da prog/niê e as linhas constituem os marcadores moleculares. As relações de ligação dos marcadores segregantes foram estabelecidas utilizando-se o programa *>oinMap*.

Com base na análise de ligação os marcadores dos GML encontrados se agruparam em K grupos de ligação de citrônio [S]ingle\ *Q=igura \$T* e %% marcadores se ligaram em \$ grupos de ligação de limão [Cra\*o\ *Q=igura KT LL* marcadores não se ligaram em nenhum dos mapas. Contudo com um grau de saturação maior do mapa alguns destes marcadores poderiam estar ligados além de poderem ser utilizados em outras análises empregando-se ABAVA para encontrar associações significativas com outras características.

A distância entre os marcadores nos grupos de ligação variou de # Qisto é

dois marcadores que co-segregam a completamente ligados a LM cM com média de 10 cM entre marcadores para o citrumelo [S] e para o mapa de limão [Cra\*o] a distância entre marcadores de 10 a LM cM com média de 10 cM entre marcadores. Os tamanhos individuais dos grupos de ligação variaram de ML a G" P cM para citrumelo [S] e % " a G#M cM para o limão [Cra\*o]. O comprimento total dos mapas foi de 10 cM para citrumelo [S] (Tabela MT e LMM cM para o limão [Cra\*o] (Tabela JT).

**Tabela 5** Número e tipo de marcadores e a distância em centimorgans (cM) de cada grupo de ligação do mapa de citrumelo [S]

Grupo de ligação <sup>Y</sup>	Número e tipo de marcadores	Distância (cM)
G5G	% @A!D L SS@ e G T@A!	G" P
G5"	P @A!D e G SS@	GGK
G5%	" @A!D L SS@ e % T@A!	GGJ
G5L	K @A!D e " T@A!	G#M
G5M	% @A!D K SS@ e J T@A!	P#
G5J	\$ SS@ e L T@A!	K#
G5\$	J @A!D	\$%
G5K	M @A!D e G SS@	ML
Total	\$\$	\$JM

<sup>Y</sup> Os grupos de ligação foram numerados seqüencialmente do mais longo para o mais curto.

**Tabela 6** Número e tipo de marcadores e a distância em centimorgans (cM) de cada grupo de ligação do mapa de limão [Cra\*o]

Grupo de ligação <sup>Y</sup> (cM)	Número e tipo de marcadores	Distância
G5G	G" @A!D	G#M
G5"	% SS@ e G T@A!	KM
G5%	M @A!D e G SS@	K"
G5L	G @A!D e G SS@	JK
G5M	L @A!D	LM
G5J	" SS@	%K
G5\$	% SS@	%"
Total	%%	LMM

<sup>Y</sup> Os grupos de ligação foram numerados seqüencialmente do mais longo para o mais curto.

Do mapa com menor número de marcadores foi obtido para o limão

[Cra\*o\& 6m estudos reali;ados por @D78 e AS7BS Q"##%T mapas de ligação genético constru-dos para os cru;amentos . e o genitor da espécie 0oi hetero;igoto em mais locos que 0a;endo com que a densidade dos mapas de spp 0ossem maiores do que qualquer mapa com & Bo presente trabalho o genitor citrumelo [S ]ingle\ por se tratar de um h-brido entre apresentou maior n^mero de locos em hetero;igose e portanto um mapa mais denso em marcadores pode ser obtido para este genitor&

Considerando o tamanho do genoma de citros estimado utili;ando o programa Mapmader Q5ABD6@ et al& GPK\$T como sendo entre G&M## cM e G&\$## cM Q>A@@65 et al& GPP"T os mapas de ligação constru-dos no presente trabalho utili;ando o aplicati\*o >oinMap cobriram de LM a MG b o mapa de citrumelo [S ]ingle\ e "\$ a %#b o mapa de limão [Cra\*o\&

Bo caso de mapeamento utili;ando Rpseudo+testcrossS a ocorr/ncia de marcadores comuns aos dois genomas em um mesmo grupo de ligação depender4 da presença do mesmo marcador em ambos os genomas e do seu estado alélico& 6nquanto em n-\*el interespec-0ico a sobreposição é muito bai.a em n-\*el intraespec-0ico ir4 aumentar : medida que indi\*-duos da mesma população 0orem utili;ados QG@ATTA!AG57A e S6D6@F== GPPLT&

!ara integrar mapas de ligação constru-dos com a estratégia Rpseudo+testcrossS marcadores codominantes multialélicos com alelos de ambos os genitores segregando são mais e0icientes 0ornecendo um con)unto de locos que podem ser utili;ados como ponte QG@ATTA!AG57A e S6D6@F== GPPLT&

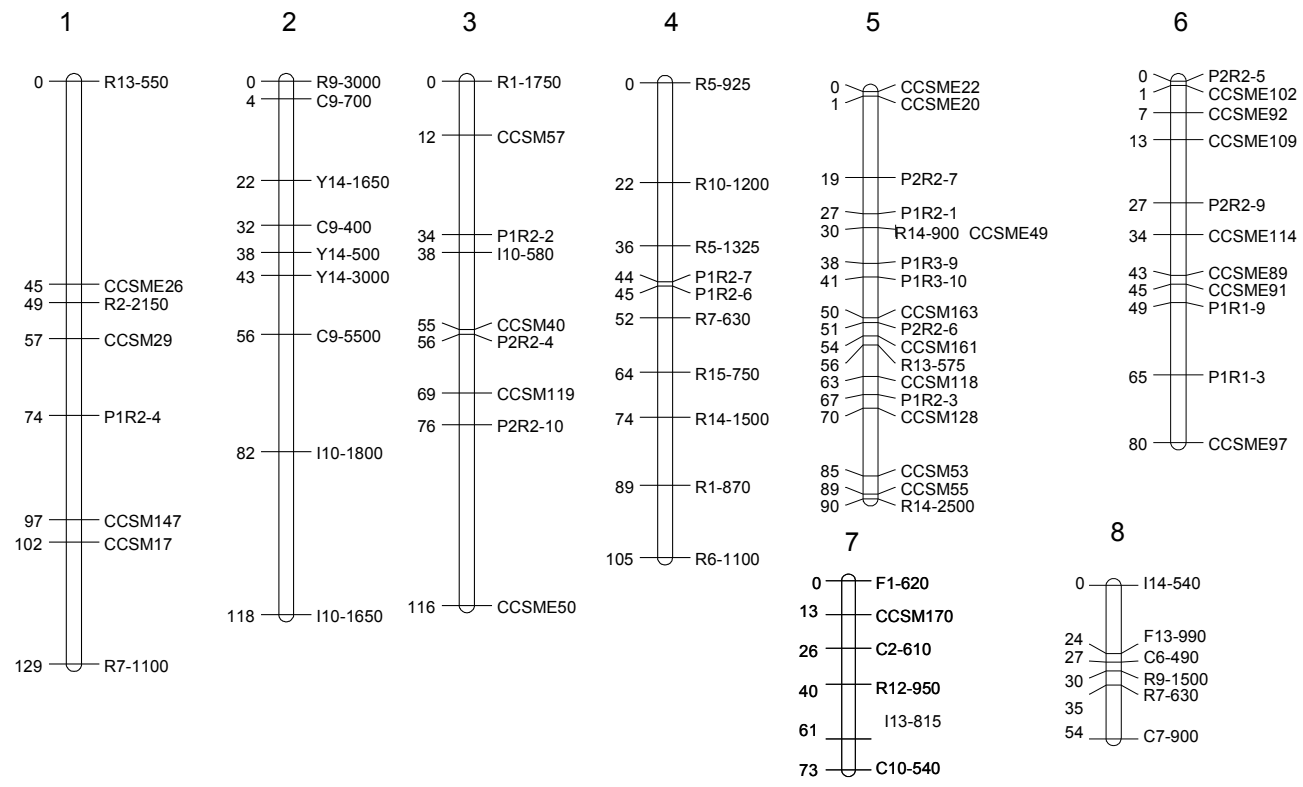
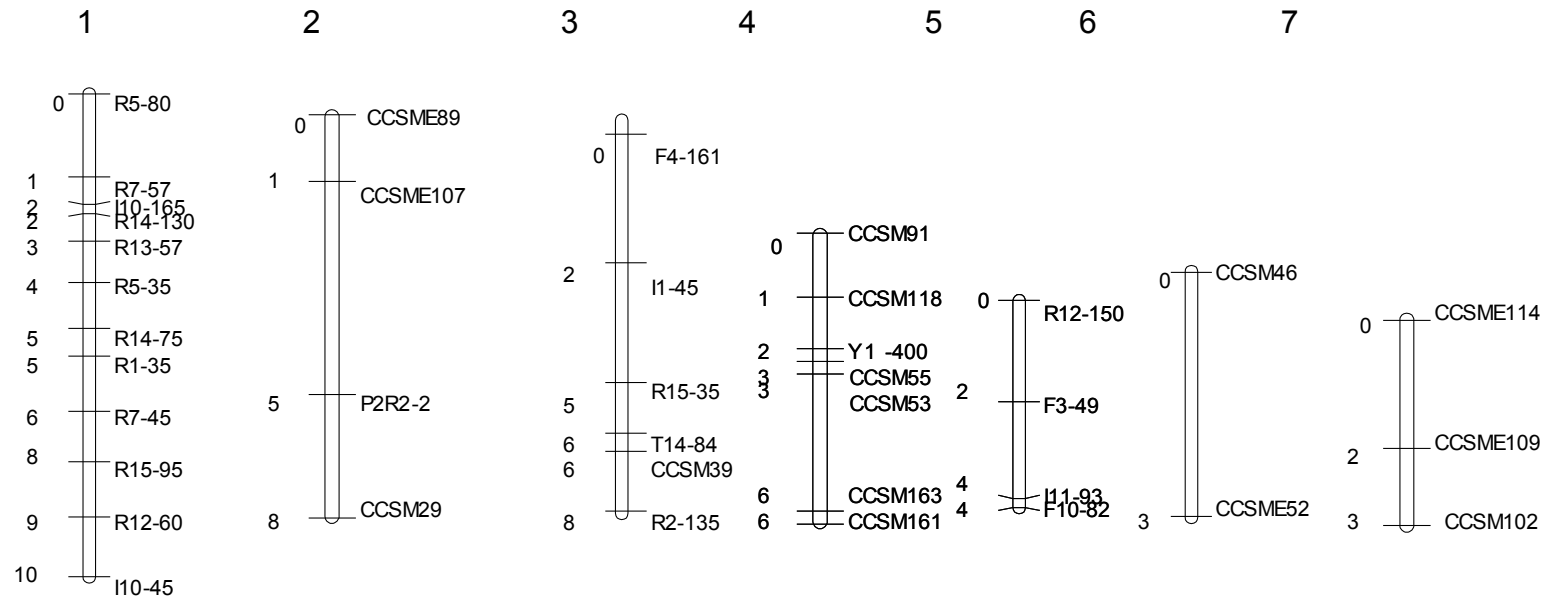


Figura 7. Mapa de ligação de citrumelo [S] com marcadores \$J @A!D "M SS@ e GJ T@A!T em K grupos de ligação.



**Figura 8** Mapa de ligação de limão [Cra\*o\ com %% marcadores Q'' " @A!D G# SS@ e G T@A!T em \$ grupos de ligação

Dos JM pares de Rprimers SS@ "pro\*enientes de seqZ/ncias de 6STs e "pro\*enientes das seqZ/ncias gen,micas 0oram inclu-dos nos mapas de ligação de citrumelo [S ] ingle\ e limão [Cra\*o\ Destes GP pares de RprimersS QAne.o 7VT produ;iram bandas que segregaram de 0orma in0ormati\*a em todas as prog/nies isto é ambos os pais são hetero;igotos e pelo menos tr/s alelos di0erentes estão segregando de modo que quatro gen<tipos di0erentes podem ser identi0icados na população. Isso possibilita o reconhecimento de grupos de ligação hom<logos entre os genitores di0erentemente de quando somente um dos pais é hetero;igoto e o marcador SS@ somente é mapeado em um dos mapas. Marcadores mapeados em ambos os genitores Qcon0iguração completamente in0ormati\*aT pode ser constatado pelos marcadores CCSMM% MM GJG e GJ% que 0oram mapeados no grupo L de limão [Cra\*o\ e no grupo M de citrumelo [S ] ingle\ mostrando marcadores SS@ em comum entre estes grupos de ligação Q=igura PT.

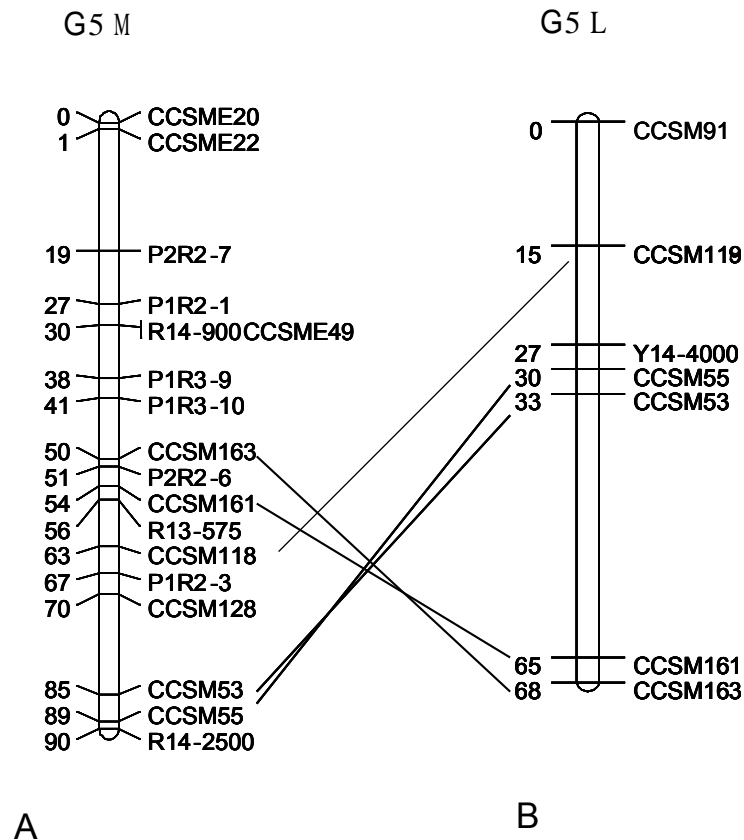
3@FBDAB7 et al. Q"##JT obser\*aram que dos "L marcadores SS@ utilizados em trabalhos de mapeamento genético em \$L eram in0ormati\*os para o genitor 0eminino Q T %" eram in0ormati\*os para o genitor masculino Q T e G"K QMM bT eram completamente in0ormati\*os isto é segrega\*am em ambos os genitores com um total de tr/s a quatro alelos. Fs autores não obser\*aram nenhum marcador SS@ segregando na proporção G""G isto é igualmente hetero;igoto em ambos os genitores. Bo presente trabalho 0oram obser\*ados GM marcadores SS@ segregando na proporção G""G Q=igura G#T.

Assim locos que 0oram hetero;igotos em ambos os genitores Qtipos de segregação hd.hd ab.cd e e0.egT podem ser considerados para a comparação de mapas possibilitando a e.ploração de relaç9es de genes colineares QsinteniaT por mapeamento comparati\*o. Mapeamento comparati\*o trata da comparação da ordem e posição relati\*a de genes e marcas em mapas de di0erentes espécies. Comparaç9es entre espécies mais pr<.imas re\*elam alto grau de sintenia e colinearidade dos mapas. Bestes casos o local de muitos genes pode ser estimado por simulação. Comparaç9es entre espécies mais distantes re\*elam perda crescente de sintenia. A colinaridade ocorre quando a ordem dos genes em um grupo de ligação ou no cromossomo é preser\*ada entre espécies distintas.

F mapeamento comparati\*o QRcomparati\*e mappingS ou RsAntena mappingST constitui outra importante aplicação dos mapas genéticos. A comparação das estruturas gen,micas de di0erentes espécies do ponto de \*ista de



homologia de genes e conservação de distâncias e da ordem de ligação nos cromossomos permite melhor compreensão da evolução dos genomas (G5M e G5L). Futura 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 (CABRERA e VILGELAND).



**Figura 9.** Grupos de ligação de citrumelo [S] e limão [C] mostrando marcadores SS em comum.

A comparação de mapas é importante para se inferir sobre diferenças e observações pontuais entre as espécies ou variedades em estudo. Como por exemplo os trabalhos de D78 e AS7BS em que foram comparados mapas de duas variedades de [L] e [U] onde as análises são feitas sobre a possível origem mutante da característica peculiar que [L] apresenta o de ser um porta-enxerto ananizante. Como dois marcadores distanciados de \$ G a K \$ cM no mapa do [L] não estão

ligados em [ @ubidou. \ os autores sugerem ou a ocorr/ncia de uma translocação ou uma in\*ersão parac/ntrica en\*ol\*endo ambos marcadores



**Figura 10.** Marcador SS@ QCCSMGPT segregando na proporção G<sup>1</sup>:G<sup>1</sup> 5C \_ limão [Cra\*o\ CS \_ citrumelo [S] ingle\ G a GK h-bridos e M \_ Marcador de peso molecular 5adder G ?b !lust

@D78 e AS7BS Q"##%T em semelhante análise para mapas comparati\*os de e obser\*aram translocaç9es a0etando a homeologia dos grupos de ligação em marcadores que se caracteri;am por uma ordenação di0erente em mesmo grupo de ligação apontando di0erenças dos mapas dos dois genitores em estudo. Bestes estudos essas di0erenças podem ser de\*ido a deleç9es di0erenças na 0ração de recombinação ou ao n^mero amostral de indi\*-duos utili;ados Q@D78 e AS7BS "##%T

Com relação : aplicabilidade dos mapas genéticos nas análises de NT5s e seleção assistida por marcadores di0erenças na ordem dos marcadores t/m conseqZ/ncias mais intensas do que di0erenças em suas dist1ncias! !or isso 0atores que a0etam a ordem dos marcadores e a colinearidade dos mapas merecem destaque a escolha do critério 5FD que pode ser mais ou menos estrigente as di0erentes 0ases de ligação dos alelos distorç9es na segregação e reorgani;aç9es cromoss,micas

De\*ido ao menor n^mero de marcadores selecionados para a construção dos mapas de limão [Cra\*o\ um critério de ligação 5FD 1 % 0oi empregado sendo que um 5FD 1 L 0oi utili;ado para o mapa de citrumelo [S] ingle\ que possuía maior n^mero de marcadores. 6sta di0erença do critério 5FD pode ter resultado na

diferença da ordem dos marcadores nos grupos de ligação L de limão [Cra\*o\ e M de citrumelo [S ] ingle\ Q=igura PT&

#### 4.4 Mapeamento de QTLs

As análises de segregação dos marcadores na prog/nie resultaram em \$\$ marcadores no mapa de citrumelo [S ] ingle\ Q%J @A!D "M SS@ e GJ T@A!T e %% marcadores no mapa de limão [Cra\*o\ Q"" @A!D G# SS@ e G T@A!T do total de marcadores mapeados& Bo mapa de citrumelo [S ] ingle\ apenas 0oram considerados grupos de ligação com mais de tr/s marcadores&

!ara a locali;ação de NT5s os dados 0enot-picos a\*aliados 0oram analisados separadamente e associados aos mapas de ligação com a utili;ação do programa MA!NT5 \*&L&# Q=igura GGT&

**Tabela 7&** Detalhes dos NT5s detectados nos grupos de ligação de citrumelo [S ] ingle\ pelo método RMultiple NT5 MappingS QMNMT associados :s caracter-sticas estudadas&

Característica	Grupo de ligação	Intervalo (cM)	LOD	LOD Crítico	Variância	Efeito (%)
Mor0ologia 0oliar	L	# # a "" #	% K\$	% K#	# #GL#	\$J G#
CTV	J	GK L a "% L	M PL	M K#	# ##JG	PM G#
6nrai;amento de estacas	J	# # a \$ #	GM PJ	\$ G#	# ##G"	M# K#
	%	\$J L a PG L	\$ KJ	\$ G#	# #" J#	%"\$ \$#

As análises pelo método de RMultiple NT5 MappingS QMNMT detectaram a presença de um NT5 para resist/ncia a CTV no grupo de ligação J QG5 JT um para mor0ologia 0oliar no grupo de ligação L QG5 LT e dois NT5s para a caracter-stica enrai;amento de estacas nos grupos de ligação % e J QG5 % e JT& F teste de !ermutação QG### repetiç9esT detectou um 5FD score cr-tico in0erior Q r # #MT ao 5FD gerado e a presença de NT5s com e0eitos de \$J G b PM G b M# K b e %\$ K b na \*ariação 0enot-pica obser\*ados para as caracter-sticas mor0ologia 0oliar resist/ncia a CTV e enrai;amento de estacas respecti\*amente QTabela \$ e =igura GG T& Tr/s NT5s de menor e0eito 0oram encontrados para enrai;amento de estacas Qdados não apresentadosT& Benhum NT5 0oi locali;ado no mapa de limão [Cra\*o\

muito provavelmente de modo : baixa densidade de marcadores no mapa

Os NT5s para resistência a CTV e morfologia foliar apresentaram grandes efeitos na expressão fenotípica. Estas características foram relatadas na literatura como condicionadas por pelo menos dois genes de grande efeito. A tolerância à tristeza dos citros está condicionada por pelo menos dois locos e interagindo em uma epistasia dominante+recessiva (3 F@D7GBFB et al. "##LT). No presente trabalho foi encontrado um NT5 para CTV e aplicando PMb da variância fenotípica no grupo de ligação J entre os marcadores CCSM6G#P e !"@"+P sendo este último marcador é um loco marcador T@A! e está relacionado a genes envolvidos com a síntese de lignina. Com aumento na expressão de genes associados com a síntese de lignina foi observado em trabalhos em que houve a comparação de genes diferencialmente expressos em plantas inoculadas e não inoculadas com *X. fastidiosa* (C@7STF=AB7 et al. in press).

Vale ressaltar que ligninas são compostos fenólicos encontrados nas paredes secundárias do sistema vascular vegetal e desempenham importantes papéis biológicos reduzindo a permeabilidade da parede celular em relação à água estando também envolvidas em mecanismos de defesa contra patógenos. A via metabólica da lignina e as enzimas envolvidas na sua síntese têm sido caracterizadas nos últimos anos. Uma série de genes que codificam diferentes enzimas envolvidas na biossíntese da lignina foram identificados em diferentes espécies de plantas. A biossíntese de lignina está acoplada ao metabolismo dos fenilpropanóides apresentando enzimas compartilhadas com outros processos metabólicos tais como ácido caoéico F+metiltransferase (CFMT) assim como enzimas específicas como cinamoyl-CoA redutase (CCR) (AMFS et al. "##GT) utilizadas no presente trabalho.

Um dos mecanismos de ataque dos fitopatógenos é a produção de enzimas lignolíticas que atuam sobre a lignina da parede celular rompendo as barreiras e defesas do hospedeiro e colocando em disponibilidade nutrientes a partir de substâncias constituintes dos tecidos vegetais inoculados (M6B876S et al. (GPPGT).

Nos trabalhos de (DVB) (###\$T) foi observado que na ausência do fitopatógeno e após a aplicação do indutor químico ASM indução mediada por acibenzolar-S-metil (ASM) indutor químico a indução de resistência foi associada ao aumento da síntese de lignina e redução no teor de fenóis (aumentos no teor de proteínas solúveis e de açúcares redutores nas folhas) redução do

crescimento e da produtividade.

Mecanismos genéticos de herança simples e oligogênica foram observados para outras doenças e patógenos dos citros como por exemplo a resistência ao nematode (S7BG et al. 1997) e ao vírus da tristeza (M6ST6 et al. 1998) e ao CTV (C7STF=AB7 et al. 1998).

Um QTL significativo associado à resistência a *Rapid decline disease* (RD) em uva causada pela bactéria foi localizado no mapa do genitor resistente e, aplicando o teste de ligação genética (VABC) et al. 1997. Os autores acreditam que a resistência seja controlada por um alelo dominante em um loco de maior efeito com algumas modificações genéticas causadas pelo ambiente ou por genes de menor efeito.

3. Resultados semelhantes com as análises de QTL para resistência à leprose em citros: encontrou um QTL e, aplicando o teste de ligação genética para leprose.

Os resultados obtidos pelo RMNM mapping sugerem um QTL para a folha trilobada e, aplicando aproximadamente o teste de ligação genética (Tabela 1 e Figura 1) entretanto a proporção de segregação de 3:1 de folhas trilobadas para folhas simples ( $\chi^2 = 0,05$ ) é consistente com dois genes dominantes segregando independentemente. A alta herdabilidade observada e a distribuição em classes genéticas distintas (monocótiplas mistas ou tricótiplas) corroboram com as análises de QTL ou seja possivelmente um gene de grande efeito esteja envolvido embora não exclua a possibilidade de outros genes de menor efeito possam estar envolvidos na herança das características.

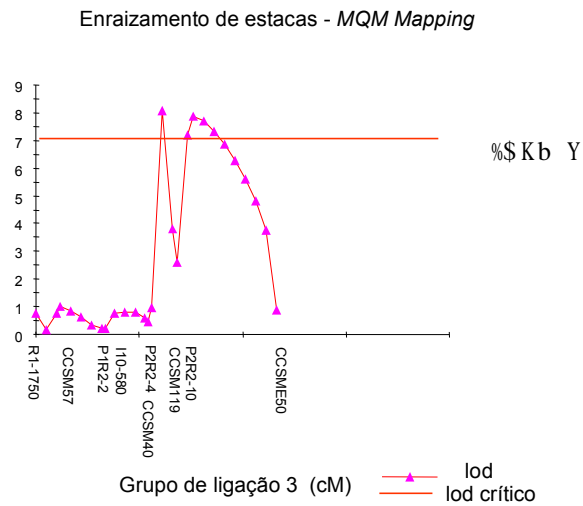
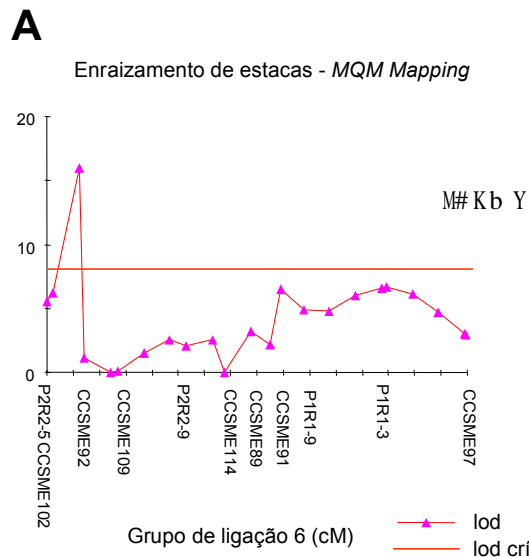
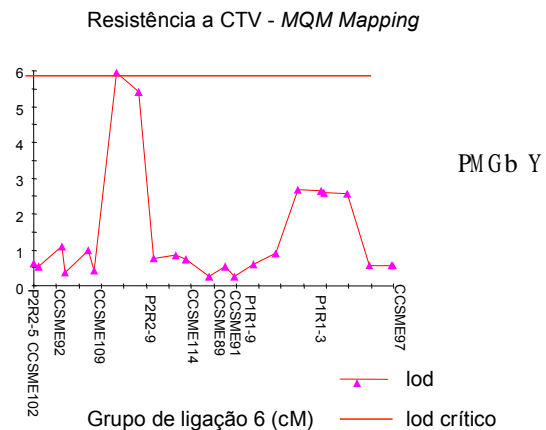
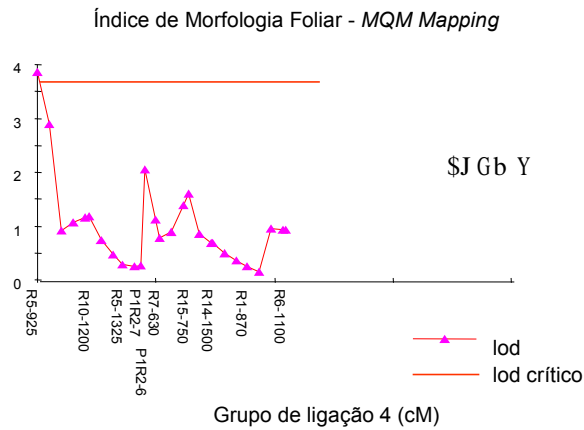
Os resultados obtidos pelo RMNM mapping utilizando as médias de índice de morfologia foliar sugerem a presença de um QTL. A alta herdabilidade observada e a distribuição em classes genéticas distintas (folhas simples e mistas ou tricótiplas) corroboram com as análises de QTL ou seja de que possivelmente pelo menos um gene de grande efeito esteja envolvido embora não exclua a possibilidade de outros genes de menor efeito possam estar envolvidos na herança da característica uma vez que observamos uma grande variação na morfologia tanto nas folhas simples como nas trilobadas (Figura 2) em relação aos genitores. F5V67A et al. 1997 obtiveram um índice de morfologia

do 4pice 0oliar onde os h-bridos e. ibiam um n-\*el intermedi4rio do -ndice em relaçaõ aos genitores tangor [Murcott\ e laran)a [!/ra\&

Es altos \*alores de coe0icientes de herdabilidade indi\*idual no sentido amplo Q " 1 # L#T a alta precisão e. perimental Q f ≥ GT e a alta acur4cia na a\*aliação 0enot-pica Q > # KMT obser\*ados para as caracter-sticas resist/ncia a CTV e -ndice de mor0ologia 0oliar indicam que o pr<prio 0en<tipo é um bom indicador do \*alor genot-pico dos indi\*-duos QV6BCFVS?2 GPK\$( @6S6BD6 GPPMT& Caracteres de alta herdabilidade apresentam controle genético mais simples sendo pro\*a\*elmente controlados por um menor n^mero de genes e assim para esses caracteres e. iste uma maior probabilidade de detecção de NT5s Q@686BD6 "##"T&

Es bai.os \*alores " Q " \_ # "PT encontrados para a caracter-stica enrai;amento de estacas e a detecção de dois NT5s em grupos de ligação de são indicati\*os de que esta caracter-stica é controlada por alguns genes de e0eito principal& 6m um trabalho \*isando mapear NT5s associados ao enrai;amento de estacas utili;ando uma prog/nie de S7V76@F et al& Q"##%T encontraram dois NT5s no mapa de ligação de

& Es NT5s identi0icados eram respons4\*eis por GM Kb e "# Pb da \*ariação 0enot-pica para a caracter-stica enrai;amento de estacas Q=igura GGT&



**Figura 11** NT5s associados : morfologia foliar (A) resist/ncia a CTV (B) e enraizamento de estacas (C e D) em mapas de ligação de citrumelo [S] (Y) ! porcentagem de \*ariação fenot-pica que cada NT5 pode explicar

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- a) A população de mapeamento analisada é considerada representativa para os estudos das características apresentadas nos genitores limão [Cravo] e citrumelo [S]ingle.
- b) O polimorfismo obtido pelos marcadores TAs com uma média de \$M marcadores por par de primers foi superior aos ATDs "GL por RprimerST permitindo aumentar de forma significativa a densidade dos mapas de ligação.
- c) A configuração completamente informativa com GP marcadores SS@ mapeados em ambos os genitores permite um maior poder de detecção de grupos de ligação com marcadores em ambos os genitores possibilitando explorar as relações de genes colineares (sintenia) por mapeamento comparativo.
- d) Os marcadores apresentando %Gb de taxa de desvio de segregação podem ser considerados para a construção dos mapas de ligação para em virtude de rearranjos cromossômicos seleção gamética ;igética e presença de fatores letais recessivos que ocorrem geralmente neste gênero e naqueles correlatos como .
- e) A alta herdabilidade para a característica morfológica foliar é confirmada com as análises dos NT5 em citrumelo [S]ingle e um gene de grande efeito estimado na determinação dessa característica.
- f) Em função da baixa densidade do mapa de limão [Cravo] não foi possível detectar NT5s para nenhuma característica.
- g) Embora existam na literatura diferentes classes fenotípicas ocorrendo na resistência ou mesmo tolerância a CTV abrindo possibilidades de uma possível dominância incompleta ou mesmo hipóteses de epistasia dominante+recessiva tais observações não influenciam sobremaneira nas conclusões concernentes ao controle genético monogênico encontrado no presente trabalho com proporção G`G.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A36C7T@DS a ASSFC7AHIF 3@AS7567@A DFS 6E!F@TADF@6S D6 CCT@7CFS [http://www.abecitrus.com.br/Arqui\\*os](http://www.abecitrus.com.br/Arqui*os) (agosto) "##GT

A3FD+@AMASV M( 65+ h A?665 V=( ?ASS6M B( MFVAM6D 6&A& Studies on the \*egetati\*e propagation o0 some citrus rootstocds 7n` Annals o0 Agricultural Science Cairo \*L% p&M"+M%\$ GPPK

AD56@576ST6 M=( >( VAB 66D h 7>? =(A& Assessment o0 concentrations o0 beet necrotic Aello ] \*ein \*irus bA en;Ame+lined immunosorbent assaA& **Journal of Virological Methods**, \*L%\$ p&GJ%+G\$J GPP"

A53A@ 5( 5F@76DE M( AVMAD7 B( @7M3AD5T 7( !7B65 A( S2 A&A&( =A@G6TT6 D& et al& Genetic basis and mapping o0 the resistance to rice Aello ] mottle \*irus` 7& NT5s identi0ication and relationship bet ] een resistance and plant morphologA& **Journal of the American Society for Horticultural Science**, \*P\$ p&GGLM+GGML GPPK

AMA@A5 A&M( ASTDA >=( 36@G6@ 7>( CAMA@GF @5&3&C( CA@5FS 6=( et al& AnalAsis o0 citrus transcriptome` Cit6ST in 3ra;il& 7n` The 7nternational Con0erence on the Status o0 !lant e Animal Genome @esearch San Diego CA Abstract p&" "##\$

AMA@F A& 6stratégias para a laranja no 3rasil& 7n` B6V6S M=( et al& 6ditora Atlasf!6BSA "##M

ABD6@SFB C&M( CAST56 h&S( MFF@6 G&A& 7so;Amic identi0ication o0 ;Agotic seedlings in S ]ingle citrumelo nurserA and 0ield populations& **Journal of the American Society for Horticultural Science**, \*GGJ p&" "+% "J GPPG

A@Ai>F 6=( ND67@ t 8 5!&( MACVADF M&A& h hat is u Ta.onomic implications 0rom a studA o0 cp+DBA e\*oluition in the tribe Citreae 0@utaceae sub0amilA Aurantioideae& **Organisms Diversity & Evolution**, \*L% p&MM+J " "##%&

A@Ai>F 6=( @FND6 B& Ta.onomia dos citros& 7n` MATTF5 >r& D( B6G@7 >&D( !7F @&M( !FM!6D >r& >& Qeds& Citros& Campinas` 7nstituto Agron,mico e =undag "##M

A86V6DF C&5&5& Sistema de !rodução` Versão 6letr,nica& 6mbrapa Mandioca e =ruticultura <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/ontesVTM5fCitrosfCitrosBordestefi.mportancia.htm> QGJ de;embro "##%T

3A!T7STA Ck@k( V6>A >k( STACV+MACVADF Dk@k( TA@GFB Mk5k!kBk( MD556@ Gk h k( MACVADF MkAkk Método simpli0icado de puri0icaçãoo \*-rus da triste;a dos citros e obtençãoo de anti+osoro de alta especi0icidadek **Summa Phytopathologica** \*k"" p k "%L+"%K GPPJk

3A@>FS6!V Mk( MA@CDS @k( 566 @k=k The continuous challenge o0 citrus triste;a \*irus controlk **Annual Review of Phytopathology** !alo Alto \*k"\$ p k"PG+ %GJ GPKPk

3A@?562 BkA k( @FFS6 Mk5k( ?@D6G6@ @k@k( =6D6@7C7 CkTk Assessing genetic di\*ersitA and population structure in a citrus germplasm collection utili;ing simple sequence repeat marders QSS@sTk **Theoretical and Applied Genetics**, \*kGG" p kGMGP+GM%G "##Jk

3AST7AB65 Mk( SCV h A@8 Sk=k( CF56TTA+=ilho V kDk( 57B 5k5k( MACVADF Mk( ?F556@ FkCk 7denti0icaçãoo o0 ;Agotic and nucellar tangerine seedlings Q sppkT using @A!Dk **Genetics and Molecular Biology**, \*k"G p kG"%+G"\$ GPPKk

3AST7AB65 Mk @esist/ncia : leprose e : mancha marrom de alternaria em citros` caracteri;açãoo de h-bridos herançaa mapeamento genético e e.pressãoo g/nica k "##Mk "PLPk Tese QDoutoradoTk 7nstituto de 3iologia Dni\*ersidade 6stadual de Campinas Campinas k

3AST7AB65 Mk( C@7STF=AB7 Mk( F57V67@A AkCk( =@67TAS+AST i A >k( GA@C7A AkA k=k( et al k Q"##JTk NT5 associated to citrus leprosis resistancek **Tree Genetics and Genomes** Qin pressTk

36BB6TT Ck h k( CFSTA AkSk Triste;a disease o0 citrusk **Journal of Agricultural Research** h ashington \*k\$K n kK p k"# \$+"%\$ GPLPk

36@6TTA Mk>kGk( !FM!6D >@k >k( D6@@7C? ?kSk( 566 @k=k( V6 h 7TT 3k( 3A@TV6 Gk 6\*aluation o0 roostocds in 3ra;il oor 0ield resistance to declinio k 7n` 7nternational Citrus Congressk **Proceedings. Acireale: International Society of Citriculture** \*k" p kK%G+KL% GPPLk

3F@D7GBFB @k( M6D7BA+=ilho V k!k( MD556@ Gk h k( S7ND67@A h k>k A triste;a dos citros e suas implicaç9es no melhoramento genético de porta+en .ertosk **Bragantia** Campinas \*kJ" n k% p k%LM+%MM "##%k

3F@D7GBFB @k( M6D7BA+=ilho V k!k( S7ND67@A h k>k( T6 t=75 F Sobrinho >k The genetics o0 tolerance to triste;a disease in citrus rootstocdsk **Genetics and Molecular Biology** \*k"\$ n k" GPP+"#J "##Lk

3FT6FB Mk( B6V6S 6kMk Citricultura 3rasileira` aspectos econ,micosk 7n`

MATTFS >rk Dk( B6G@7 >tkD( !7F @tkM( !FM!6D >rk >tk QedsTk Citrosk Campinas`  
7nstituto Agron, mico e =undag "##Mtk

3FDV7DA Mtk( 86M8AM7 Mtk( C6V7? 3tk( =63@6S Vtk>tk( 566 @tk=tk et alk  
3iological and molecular characteri;ation o0 isolates o0 citrus triste;a \*irus from  
Morocco 7n` CFB=6@6BC6 F= 7BT6@BAT7FBA5 F@GAB78AT7FB F=  
C7T@DS V7@F5FG7STS GL<sup>th</sup> Campinastk **Proceedings**tkk Campinas` 7nternational  
Frgani;ation o0 Citrus Virologists ptk%% GPPKtk

3@FAD36BT !tk( 3@5ABS?2 @tkVtk( 7BDFSTF >tk 3iological characteri;ation  
o0 Australian 7solates o0 citrus triste;a \*irus and separation o0 subisolates bA single  
aphid transmissionstk **Plant Disease**, \*tkK# ptk%"P+%% GPPJtk

3@FBDAB7 @tk!tkVtk( h7557AMS 6tk@tk( 3@FBDAB7 Ctk( G@ATTA!AG57A Dtk  
Atk Microsatellite+based consensus linkage map for species o0 and a  
no\*el set o0 "%# microsatellite markers for the genus **BMC Plant Biology**, \*tkJ  
nkt"# ptkGL\$G+"""P "##Jtk

CA7 Ntk( GD2 Ctk5tk( MFF@6 GtkAtk 6.tension o0 the linkage map in using  
random amplified polymorphic DNA Q@A!DT markers and @=5! mapping o0 cold+  
acclimation+responsi\*e loci **Theoretical and Applied Genetics**, \*tkKP ptkJ#J+JGL  
GPPLtk

CAM6@FBtk >tk htk( =@FST Vtk3tk Genetics breeding and nucelar embrAonAtk 7n`  
@6DTV6@ htk( 3ATCV65F@ 5tkDtk( h6336@ Vtk>tk QedsTk The citrus industrAtk  
@i\*erside` Dni\*ersitA o0 Cali0ornia \*tk" ptk%"M+%"\$# GPJKtk

CAM!FS AtSt Distribuição de e  
em citros no 6stado de São !aulo e estudo mor0ométrico comparati\*o de  
populaç9es an0im-ticas de spptk "##"tk Jmpk Dissertação QMestrado em  
Agronomia Área de Concentração em 6ntomologia Agr-colaT + =aculdade de  
Ci/ncias Agr4rias e Veterin4rias Dnesp >aboticabaltk

CABT6@7 Mtk Gtk A5TVADS @tk Atk V7@G6BS+=ilho >tk Stk G7G57FT7 6tk Atk  
GFDF2 Ctk Vtk SASM + Agri` Sistema para an4lise e separação de médias em  
e.perimentos agr-colas pelos métodos Sco0t + ?nott TudeA e Duncan **Revista  
Brasileira de Agrocomputação**, \*tkG ntk" ptkGK+"Ltk "##Gtk

CA@5FS 6tk=tk( TA?7TA MtkAtk( AMA@A5 AtMtk( @67S MtkStk( MACVADF  
MtkAtk in silico DisplaA o0 transcriptional 0actors transcribed in diseased citrus  
plants 7n` The 7nternational Con0erence on the Status o0 !lant e Animal Genome  
@esearch San Diego CA Abstract ptkGGL "##\$tk

CA@B67@F MtkStk( V767@A Mtk5tkCtk Mapas genéticos em plantas **Bragantia**,  
\*tkJG ptkKP+G## "##"tk

CV6B Ck( 8VFD !k( CVF5 2kAk VDABGk Sk( GM7TT6@ >rk =kGk Mining and characterizing microsatellites from citrus 6STs **Theoretical and Applied Genetics**, \*kGG" nk\$ "##Jk

CV6B >k( VD >k( V7C? 3kAk >AB CkCk Molecular mapping of a nuclear male-sterility gene in sunflower Q 5kT using T@A! and SS@ markers **Theoretical and Applied Genetics**, \*kGG% pkG""+G"\$ "##Jb

CV6BG =kSk( @FFS6 Mk5k Frigin and inheritance of dwarfing in the citrus rootstock =Ling Dragon. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, \*k G"# pk"KJ+"PG GPPM

CVD@CV755 GkAk( DFDG6 @k h k 6mpirical threshold \*alues for quantitative \*alues for quantitative trait mapping **Genetics**,

C@7STF=AB7+2A52 M( 36@G6@ 7>( TA@GFB M5!B( TA?7TA MA( DF@TA S(F et al( Q"##JT Di00erential e.pression o0 genes identi0ied 0rom tissue inoculated ] ith CTV through 6STs analAsis using an hAbrid;ation Qin pressT(

DABCV7B A M6D7GD6 C GASCD65 F SF5DABF V V6BADT A( =rom data bands to data bases( **Research in Microbiology** \*tGL" n(\$+K p(PG%+PGJ GPPG(

D6BG 8( VDABG S( E7AF S( GM7TT6@ =(G( De\*elopment and characteri;ation o0 SCA@ marders linded to the Citrus triste;a \*irus resistance gene 0rom ( **Genome**, \*L# p(JP\$+\$#L GPPS(

D6BG 8( VDABG S( 57BG !( 2D C( TAF N( =ine genetic mapping and 3AC contig de\*elopment 0or the Citrus triste;a \*irus resistance gene locus in Q@a0( **Molecular Genetics and Genomics**, \*("JM p(\$%P+\$L\$ "##G(

DD@VAM 5( GM7TT6@ M( 5indage o0 restriction 0ragment length polAmorphisms and iso;Ames in Citrus( **Theoretical and Applied Genetics**, \*tKL p(%P+LK GPP"((

=A5CIF C5( !A!!AS M(C@(( 5FD@6BHF @T( A56BCA@ M(M( 3AT7STA A@S( !A!!AS >r( G>( G@ATTA!AG57A D( Desen\*ol\*imento e mapeamento de microssatélites deri\*ados de 6STs em "##L( Circular Técnica 6M3@A!A 3ras-lia n%" "##L(

=ABG D( @FFS6 M5( 7denti0ication o0 @A!D marders linded to citrus triste;a \*irus resistance and 0ruit aciditA in citrus( 7n` =ourth 7nt !lant Genome Con0( San Diego CA( p("J GPPJ(

=ABG D(N( =6D6@7C7 C(T( @FFS6 M5( A high+resolution map o0 Citrus triste;a \*irus resistance gene region in Q5KT @a0( **Genetics**, \*tGM# p(KK%+KKP GPPK(

=ABG D(N( @FFS6 M5( A no\*el gene con0erring citrus triste;a \*irus resistance in Citrus ma.ima Q3urmT Merrill( **HortScience**, Ale.andria \*t%L n" p(%%L+%M GPPP(

=6@@67@A D(= 60ici/ncia de métodos de mapeamento de locos quantitativos QNT5sT e da seleção assistida por marcadores moleculares( GPPM( "#Pp( !iracicaba( Tese QDoutoradoT + 6scola Superior de Agricultura 5ui; de Nueiro; DS! !iracicaba(

=6@@67@A M6( G@ATTA!AG57A D( 7ntrodução ao uso de marcadores moleculares em an4lise genética( 3ras-lia` 6mbrapafCenargen GPPJ( ""#p(

=6DGDSFB >( 2 FDBG M( VA5VF@SFB > The propagation of citrus rootstocks by stem cuttings **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, \*PK p"L+%P GPKJ

=6D7556T C( ?6556@ 3 Comparative Genomics in the grass family: molecular characterization of grass genome structure and evolution **Annals of Botany**, \*KP p%+G# "##"

=7GD67@6DF >F( STDCV7 6S( 5A@AB>67@A =k( DFBAD7F 5C( =75F+sobrinho >T( S6M!7FBATF N( Mg556@ G h !ortamentos para lima ácida Tahiti em duas regiões do estado de São Paulo **Laranja**, \* " " p"#%+ "G% "##G

=@67TAS+ASTiA >( 5FCA57 6C( ABTFB7F57+5D78FB @ ( ASTiA+MFBG6 G( TA@GFB M5!B et al @T+!C@ for the simultaneous detection of citrus tristeza and leprosis viruses **Fitopatologia Brasileira** \*%# nJ pJJP "##M

=@FST V3 The chromosomes of Citrus **Journal of the Washington Academy of Sciences** \*GM pG+% GP"M

=D@@ >( @66C6 !C 7dentification of hybrid and nucellar citrus seedlings by a modification of the rootstock color test **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, \*LK pGLG+GLJ GPLJ

=D@@ >( CA@!6BT66@ >3 !rogram for breeding citrus rootstocks tolerant to *Phytophthora root rot* **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, \*GK pGK+"% GPJG

GA@C7A M( AS7BS M>( =F@B6@ >( CA@3FB655 6A Genetic analysis of pomelo and banana molecular markers **Theoretical and Applied Genetics** \*PP pMGG+MGK GPPP

GA@C7A M( ASCBS M>( CA@3FB655 6A NT5 analysis of field and seed number in Citrus **Theoretical and Applied Genetics** \*G#G pL%P+LK\$ "###

GA@BS62 S&M( 3A@@6T V( VDTCV7SFB F> 7dentification of citrus tristeza virus resistance in citrus relatives and its potential applications *Phytophthora* **Pretoria** \*GP pGK\$+GPG GPK\$

GA@BS62 S&M( SD V( TSA7 M&C Differential susceptibility of pummelo and single citrus melon isolates of citrus tristeza virus *DA G@AHA* >( MF@6BF ! ( 2F?FM7 @? QedsT !roc G<sup>th</sup> Con Citrus 7nt Virologists 7FCV& Dni\*ersita of California !ress @i\*erside C&A pG%K+GLJ GPPP

G7M7B6S Bk=( 3ASSAB687 @k3k Doença de causa desconhecida a0eta pomares c-tricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro **Summa Phytopathology**, \*k"\$ p&P% "##Gk

GM7TT6@ =kGk Applications o0 genome mapping to citrus cultivar development 7n` CFTT7B @k QedkT S&pk Mediterranean Mandarines 7B@A C7@AD San Giuliano =rance p&G GPPMk

GM7TT6@ >rk =kGk (E7A Sk2k( VDABG Sk( VD Ek5k( GA@BS62 SkMk( et al k A localised linkage map o0 the citrus tristeza virus resistance gene region **Theoretical and Applied Genetics**, \*k"P" p&JKK+JPM GPPJk

G@AHA >k( 3A@@FS >kCkSkMk( C656ST7BF @kCkA( VASCFBC655FS V&Nk !orta+en.ertos para laranja natal no Borte =luminense **Laranja**, \*k"" p&LLP+LMJ "##Gk

G@ABT T>k( MF@67@A Sk( SA5736 A&Ak Citrus varietal reaction to tristeza virus in Brazil when used in various rootstock and scion combinations **Plant Disease Reporter**, \*kLM p&LGJ+L"G GPJGk

G@ATTA!AG57A Dk( S6D6@F== @k Genetic linkage maps o0 and using a pseudo-testcross mapping strategy and @A!D markers **Genetics**, \*kG%\$ p&G\$#+G\$\$ GPPLk

GD6@@A Mk Cytogenetics o0 rutaceae 77k Nuclear DNA content **Caryologia** \*k\$% p&"GP+""J GPKLk

GD6@@A Mk Cytogenetics o0 Rutaceae V& Vigh chromosomal variability in citrus species revealed by CMA/DAPI staining **Heredity**, \*k\$G p&"%L+"LG GPP%k

GD6@@A Mk ( !6D@FSA Ak( 3A@@FS e S75VA Ak( CF@BO57F MkT&Mk( S&BTFS ?k Gk 3k( SFA@6S+=ilho h k( et al k Chromosome number and secondary constriction variation in MG accessions o0 a citrus germoplasm bank **Brazilian Journal of Genetics**, \*k"# p&LKP+LPJ GPP\$ k

GD6@@A Mk( S&BTFS ?kGk( S75VA Ak6k3k( 6V@6BDF@=6@ =k( et al k Verochromatin banding patterns in Rutaceae/Aurantioideae + a case o0 parallel chromosomal evolution **American Journal of Botany** \*kK\$ p&\$%M+\$L\$ "###k

VAMMFBDV+?FSAC? ?k6k( >FB6S >kDkGk !lant disease resistance genes **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, \*kLK p&M\$M+J#\$ GPP\$ k

V6A@B Ck5( GA@BS62 MkG( 3A@@6TT V&Ck Transmission o0 citrus tristeza virus resistance from citrus breeding line DSGGP **HortScience**, \*k"K n&M p&LK%

GPP%

VFDGSFB @h Vorticultural varieties of citrus 7n` @6DTV6@ h( 3ATCV65F@ 5D( h 6336@ V> QedsT The Citrus industrA V7 3erdeleA` Dni\*ersitA o0 Cali0ornia !ress Cali0ornia Di\*ision o0 Agricultural Sciences \*kG p&L%G+MP" GPJ\$

VD >( V7C? 3kA Target @egion Ampli0ication !olAmorphism` A Bo\*el Marder Technique 0or !lant GenotAping **Plant Molecular Biology** \*k"G p&K"+PL "##%

VD >( S6756@ G> >AB CkC( V7C? 3kA Assessing genetic \*ariabilitA among si.teen perennial species using !C@+based T@A! marders **Proceedings. 25<sup>th</sup> Sunflower Research Workshop** p&GJ+G\$ "##%

VDTCV7SFB Dk> S Jingle citrumelo + a promising rootstocd hAbrid **Proceedings of the Florida State Horticultural Society** \*kK\$ p&KP+PG GP\$

VDTCV7SFB Dk> @ootstocds de\*elopment screening and selection 0or disease tolerance and horticultural characteristics **Fruit Varieties Journal** \*kP p&"G+"M GPKM

7?DTA V( BFDA B( 6376 2( V7@ATA A( TSDB6DA S( MATSDMD@A M( 7BAMF@7 2( The rapid quanti0ication and detection o0 nitri0Aing bacteria bA using monoclonal antibodA method **Water Science and Technology** \*kL" p&G+\$ "####

76A a 7BST7TDTF D6 6CFBFM7A AG@CCF5A  
<http://www.iaespgo.br/outfbancofmenu.php> Q"J abril "##\$T

>ABS6B @kC( Controlling the tApe 7 and tApe 77 errors in mapping quantitati\*e trait loci **Genetics**, \*kG%K p&K\$G+KKG GPPL

>A@@65 DkC( @FFS6 M5k( T@ADGV S&B( ?D!!6@ @kS( A genetic map o0 citrus based on the segregation o0 iso;Ames and @=5!s in an intergeneric cross **Theoretical and Applied Genetics**, \*kKL p&LP+MJ GPP"

>FB6S Ck5k( 6DhA@DS ?k>( CAST7G57FB6 S( h7B=765D M&F( SA5A =k( VAB D6 h75 Ck et all @eproducibilitA testing o0 @A!D A=5! and SS@ marders in plants bA a net ] ord o0 6uropean laboratories **Molecular Breeding** \*k% p&KG+%P# GPP\$

?6BD87F@S?7 Ck M( CV6B M( 2DAB M( 5AB V( ATT76 A&D( Statistical Methods 0or 6.pression Nuantitati\*e Trait Soci QeNT5T Mapping& 3iometrics \*k J" nkG p&GPa"\$ "##J



?7>AS >MkV( TVFMAS Mk @k( =F h 56@ >k Ck Sk( @FFS6 Mk 5k 7ntegration o0 trinucleotide microsatellites into a linkage map o0 **Theoretical and Applied Genetics**, \*kPL p k\$#G+\$#J GPP\$ k

?7@ST Mk( M23D@G A kA k( 56FB >k!kG( SCFTT >k( S6D6@F== @k Coordinated Genetic @egulation o0 Gro ]th and 5ignin @e\*ealed bA Nuantitati\*e Trait 5ocus AnalAsis o0 cDBA MicroarraA Data in an 7nterspeci0ic 3acdcross o0 6ucalAptusk !lant !hAsiologa \*kG%M p k"JK+"%\$K "##Lk

?FB7BG Dk>k( CA@53F@G Fk VA562 CkSk The genetic dissection o0 immune response using gene+e.pression studies and genome mapping **Veterinary Immunology and Immunopathology**, \*kG#M n k%+L p k%L%+M" "##Mk

?@7VAB6? Ak=k( @7A8 Sk( h A5?6@ MkAk 7denti0ication and molecular mapping o0 a primarA resistance gene to !ierceks disease in **Theoretical and Applied Genetics**, \*kGG" n kJ p kGG"M+GG%G "##Jk

?DVB Fk>k 7ndução de resist/ncia em 0ei)oeiro Q T por aciben;olar+S+metil e ` aspectos 0isiol<gicos bioqu-micos e par1metros de crescimento e produção **Tese QDoutorado em =itopatologiaT k 6scola Superior de Agricultura 5ui; de Nueiro; DS! !iracicaba**

5ABD6@ 6kSk( G@66B !k( A3@AVAMSFb >k( 3A@5F h Ak( DA52 Mk>k( et al k Mapmader` an interacti\*e computer pacdage 0or constructing primarA genetic linkage maps o0 e.perimental and natural populations **Genomics**, \*kG p kG\$L+GKG GPK\$ k

5ABD6@ 6k Sk( 3FTST67B Dk Mapping Mendelian 0actors underlAing quantitati\*e traits using @=5 ! linkage maps **Genetics**, \*kG"G p kGKM+GPP GPKP k

56S!7BASS6 Dk( @FD76@+GFDD Mk( G@7V6T 5k( 56CFBT6 Ak( 56GBAT6 V k( S6GD7B Mk A saturated genetic linkage map o0 rubber tree QVe\*ea sppkT based on @=5! A=5! microsatellite and iso;Ame marders **Theoretical Applied Genetics** \*kG## p kG"\$+G%K "###k

57 Gk( ND7@FS Ck=k Sequence+related ampli0ied polAmorphism QS@A!T a ne ] marder sAstem based on a simple !C@ reaction` its application to mapping and gene tagging in **Theoretical Applied Genetics** \*kG#% p kLMM+LJG "##Gk

57 2k ?F@F5 Ak3k( =AV7MA Tk( 36756S Ak( B6VF 6k Microsatellites` genomic distribution putati\*e 0unctions and mutational mechanisms` a re\*ie ] k **Molecular Ecology**, \*kGG p k"LM%+"LJM "##"k

57 2k( ?F@F5 Ak3k( =AV7MA Tk( B6VF 6k Microsatellites ]ithin genes` structure 0unction and e\*olution **Molecular Biology and Evolution** \*k"G n kJ p kPPG+G##\$ "##Lk

57BG !k( DDBCAB 5kh( D6BG 8k( DDBB Dk( VD E( VDABG Sk( GM7TT6@ >r( =kG( 7nheritance o0 citrus nematode resistance and its linkage ]ith molecular markers **Theoretical and Applied Genetics**, \*kG## p(kG#G#+G#G\$ "###k

57FD !kC( A molecular study o0 the citrus genome through restriction fragment length polymorphism and isozyme mapping k GPP#k GL%p( Dissertation Q!h(kDkT + Dni\*ersita o0 =lorida D= Gaines\*illek

57TT M( 5DTT2 >kA( A hyper\*variable microsatellite revealed bA in \*inro amplification o0 a dinucleotide repeat ]ithin the cardiac muscle actin gene **The American Journal of Human Genetics**, \*k LL p(k%PK+L#G GPKP(

57D 3kV( Statistical genomics` linkage mapping and NT5 analysis Cle\*eland` Cle\*eland` C@C !ress GPPk( JGGp(

57D DkV( ?BA!! Sk( Gmendel "k#` a soft ]are 0or gene mapping k Frigon Sate Dni\*ersita GPP" k

57D 8k( ABD6@SFB >kA( VD >( =@76S6B T5k( @ASMDSS6B >k3k( =A@7S >kD( A ]heat inter\*arietal linkage map based on microsatellite and target region amplified polymorphism markers and its utility 0or detecting quantitative trait loci **Theoretical and Applied Genetics** \*kGGG p(k\$K"a\$PL "###k

5D@F =( 5A7G@6T =( 5F@76DE M( F557T@AD5T !k et al( Citrus genome mapping ]ith molecular markers` t]o maps obtained bA segregation analysis o0 progenA o0 one intergeneric cross **Proceedings. Acireale: International Society of Citriculture** \*k" p(kKJ"+KJJ GPPJ(

MACVADF M(k( CF56TTA+=ilho V(k( TA@GFB M5k(k( !FM!6D >r( >k QGPPJT( Genetic relationship o0 Mediterranean mandarins QCitrus deliciosa TenoreT using @A!D markers **Euphytica** \*kP" p(k%"G+% "J GPPJ(

MACVADF M(k( STACV+MACVADF Dk(k( TA@GFB M5k(k(k( Ck(k( 3A!T7STA Ck(k( Mg556@ Gk h k Diagn<stico do \*-rus da triste;a com di0erentes anticorpos monoclonais **Fitopatologia Brasileira** \*k"" n(k" p(kGPG+GPL GPP\$(

MACVADF M(k( C@7STF=AB7 M( AMA@A5 A(kM( F57V67@A A(kC( Genética melhoramento e biotecnologia de citros k n` MATTFS >r( D( B6G@7 >kD( !7F @kM( !FM!6D >r( >k QedsT( Citros k Campinas` 7nstituto Agron, mico e =undag "###k

MADAD M( =65T@AB >kC( CF@@XA >kC( DA7B6S6 @kC( FBF 6kF( @FD@7GD6S >kD( @ooting o0 a;4lea cuttings treated ]ith BAA concentrations and di0erent substrates **Ciência e Agrotecnologia** \*k"K n(kL p(k\$\$G+\$\$\$ "###k

M656TT7 5&M&M& !ropagação de 0rut-0eras tropicais& Gua-ba& Agropecu4ria  
"#### "%Pp&

MENZIES, J.G.; EHRET, D.L.; GLASS, A.D.M.; SAMUELS, A.L. The influence of silicon on cytological interactions between *Sphaerotheca fuliginea* and *Cucumis sativus*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.39, p.403-414, 1991.

M6ST@6 !&=&( AS7BS M&>( !7BA >&A&( CA@3FB655 6&A&( BAVA@@F 5&  
Molecular marders 0landing citrus triste;a \*irus resistance gene 0rom  
Q5&T @a0& **Theoretical Applied Genetics**, \*&PL p&LMK+LJL GPP\$&

M6ST@6 !&=&( AS7BS M&>&( CA@3FB655 6&A& BAVA@@F 5& Be ] geneQsT  
in\*ol\*ed in the resistance o0 Q5&T @a0& to citrus triste;a \*irus&  
**Theoretical and Applied Genetics** \*&PM p&JPG+JPM GPP\$b&

M6ST@6 !&=&( AS7BS M&>&( !7BA >&A&( BAVA@@F 5& 600icient search 0or ne ]  
resistant genotApes to the citrus triste;a clostero\*irus in the orange sub0amilA  
Aurantioideae& **Theoretical and Applied Genetics** \*&PM p&G"K"+G"KK GPP\$&

M626@ D&M&( S!FTTS @&A&( D6 h 62 =&M& Detection and quanti0ication o0  
3otrAtis cinerea bA 657SA in pear stems during cold storage& **Plant Disease**, \*&KL  
p&G#PP+GG#% "####

M7CV65MF@6 @& h &( !A@AB 7&( ?6SS657 @&V& 7denti0ication o0 marders  
linded to disease+resistance genes bA bulded segregant analAsis` a rapid method to  
detect marders in speci0ic genomic regions bA using segregating populations&  
**Proceedings of the National Academy of Sciences** \*&KK p&PK"K+PK%" GPPG&

M7?5AS B&!( VD >&( G@DB h A5D B&>( 5A@S6B ?&B& !otential Application  
o0 T@A! QTargeted @egion Ampli0ied !olAmorphismT Marders 0or Mapping and  
Tagging Disease @esistance Traits in Common 3ean& **Crop Science** \*&LJ p&PG#a  
PGJ "##J&

MF@67@A S&M( MF@67@A S& Vist<ria da citricultura no 3rasil& 7n`  
@FD@7GD68 F&( V7OGAS =&( !FM!6D >@ >&( AMA@F A&A& QedsT&  
Citricultura 3rasileira =undação Cargill p&G+"G GPPG&

Mg556@ G& h & A triste;a dos citros& **Summa Phytopathologica**, !iracicaba \*&"  
p&"LM+"J% GP\$J&

Mg556@ G& h ( GA@BS62 S&M& SusceptibilitA o0 citrus \*arieties species citrus  
relati\*es and non+rutaceous plants to slash cut mechanical inoculation ]ith citrus  
triste;a \*irus QCTVT& 7n` Con0erence o0 the 7nternational Frgani;ation o0 citrus  
\*iurologists @i\*erside& !roceedingsU @i\*erside` 7FCV p&%%+L# GPKL&

Mg556@ Gkh( CFSTA A&S( !FM!6D >i B7F@ >t 7mportIncia do porta+  
en.erto em relação : triste;a e outras moléstias dos citros no 3rasil& 7n` Semin4rio  
7nternacional de Citros 3ebedouro& Anais&&&& >aboticabal` =unep p&""%+"%G GPP#&

Mg556@& Gkh( B6G@7 >tD( AGD75A@+V75DFSF C&7( MATTF& >@& D( !FM!6D >@& >t et al& ND7C? 357GVT o0 s]eet orange` a ne] citrus disease in  
3ra;il& 7n` !rogramme e Abstracts o0 EV Con0erence o0 the 7nternational  
Frgani;ation o0 Citrus Virologists p&G## "##G&  
MD@@A2 V&C( TVFM!SFB h& =& @apid isolation o0 high molecular ]eight  
DBA& **Nucleic Acids Research** \*&K p&L%"G+L%"M GPK#&

B6V6S M&=( 5F!6S =&=& F comportamento do consumidor de laranja  
e suco& 7n` B6V6S M&=( 5F!6S =&=& QedsT& 6stratégias para a laranja no 3rasil&  
6ditora Atlas p&G\$#+GKM "##M&

B76BVD7S >t( V656BT>A@7S T( S5FCDM M( @DGG6@F 3( SAVA6=6@  
A& @restriction 0ragment length polAmorphism analAsis o0 loci associated ]ith

\* \$p p\$`[nPK%M GPD& Insect resistance in tomato& **MopOSAcÔHnAe**

B FST&( a( e(

MMMteHnooZUQ□

F57V67@A @!k( AGD75A@+V75DFSF Ck7k( C@7STF=AB7 Mk( MACVADF MkA Sde ]ed @A!D marders in lindage maps o0 k **Genetics and Molecular Biology** \*k"\$ nk% p&L%\$+LLG "##La

F57V67@A @!k( C@7STF=AB7 Mk( MACVADF MkA Genetic lindage maps o0 [!/ra\ s]eet orange and [Cra\*o\ mandarin ]ith @A!D marders k **Pesquisa Agropecuária Brasileira** \*k%P nk" p&GMP+GJM "##Lb

F57V67@A @!k( C@7STF=AB7 Mk( MACVADF MkA 7ntegrated genetic map o0 citrus base on @A!D marders k **Fruits** \*k#J# p&GK\$+GP% "##M

!A5M76@7 D&A( BFV6557 V&M( 3AST7AB65 Mk( C@7STF=AB7+2A52 Mk( AST iA+MFBG6 Gk et al k Q"##JT k =reque nca and distribution o0 microsatellites 0rom 6STs o0 citrus Qin pressT

!ASND A5 Mk( CVA5=DB B&B& k( @AMFS >kD( VA56 Mk( @686BD6 e S75VA Ck&k =ruticultura Comercial` propagação de plantas 0rut-0eras k 5a\*ras` D=5Af=A6!6 "##G&G%\$p

!6T6@S >k5k( CBF!S Gk( B62T !k( 86TVF= >k( CF@B657S ?k( VAB 57>S636TT6BS MkV( G6@ATS T k An A=5!+based genome+\*ide mapping strategA k **Theoretical Applied Genetics** \*kG#K p&k% "G+% "\$ "##L

!76@7BG6@ A k!( 6D h A@DS Gk>k 7denti0ication o0 nucellar and ;Agotic citrus seedlings bA in0rared spectroscopA k **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, \*kKJ p&" "J+"%L GPJ\$

!7F @k( A@Ai>F >k!kC de( SCA@!A@6+=ilho >kA( MFD@IF+=ilho =k de A&A( A5VA@6BGA A&A( A3@AVIF 6k !otencial de propagação de culti\*ares de marmeleiro por estaquis k **Revista Brasileira de Fruticultura** >aboticabal \*k"J nk" p&"K\$+"KP "##L

!7F @k( @AMFS >kD( CVA5=DB B&B& k( GFBT7>F T&C&A( CA@@7>F 6k!( M6BDFBHA V( A5VA@6BGA k A&A( A3@AVIF 6k @ooting o0 quince [!ortugal\ and [>apon/s\ cuttings in di00erent ambient and positions in the recipients k **Ciência e Agrotecnologia** 5a\*ras \*k"P nkM p&PJK+P\$% "##M

!7F @k( @AMFS >kD( GFBT7>F T&C&A( CA@@7>F 6k!( CF65VF >kV&C( A5VA@6S 3k=k( M6BDFBHA V( @ooting o0 cuttings o0 the rootstocds o0 citrus [=IA Dragon\ and [Tri0oliata\ k **Revista Brasileira de Agrociência** \*kK nk% p&GPM+GPK "##" k

!FM!6D >r k >k !orta=en.ertos k 7n` MATTFS >r k D( B6G@7 >kD( !7F @kM( !FM!6D >r k >k QedsT k Citros k Campinas` 7nstituto Agron, mico e =undag "##M

!FM!6D >r< >t( 35DM6@ S< !rodução de laranjeiras Val/ncia en.ertadas em seleç9es de citrumelo< 7n` S6M< 7BT< C7T@FS` Melhoramento 3ebedouro` ms<n<n p<G"\$ "##"b<

!FM!6D >r< >t !orta=en.ertos< 7n` MATTF5 >r< D<( B6G@7 >tD( !7F @<M( !FM!6D >r< >t QedsT< Citros< Campinas` 7nstituto Agron, mico e =undag "##M<

!@AT7 !<( MFD@IF+=ilho =<A<A<( D7AS C<T<( SCA@!A@6+=ilho >tA< 6staquia semi+lenhosa` um método r4pido e alternati\*o para a produção de mudas de lima 4cida [Tahiti]< **Scientia Agrícola** \*<MJ n<G p<GKM+GP# GPPP<

ND67@F8+VF5TAB @<3( 35DM6@ S< Mor0ologia dos citros< 7n` MATTF5>r< D<( B6G@7 >tD( !7F @<M( !FM!6D >r< >t QedsT< Citros< Campinas` 7nstituto Agron, mico e =undag "##M<

ND@6SV7 S<B<( SAVA S<( ?ABT6T2 @<V<( >6B ?7BS >tB< 6ST+SS@` A ne ] Class o0 genetic marders in cotton< **The Journal of Cotton Science** \*<K p<GG"+ G"% "##L<

@A?6SV+?DMA@ @<( G755 D<S<( ?ADSV7? @<A< 600ect o0 indole+butAric acid p+hAdro. Aben;oiic acid and season on the propagation o0 lemon c\*< 3aramasi 0rom cuttings< **Haryana Journal of Horticultural Science**, \*<"L p<G%+GK GPPM<

@AMFS @<5<3<( TFVA@ =<><( >DBND67@A @<M< et al< Sugarcane e .pressed sequences tags Q6STsT encoding en;Ames in\*ol\*ed in lignin biosAnthesis path ] aAs< **Genetics and Molecular Biology** \*<"L p<"%M+"LG "##G<

@6S6BD6 M<D<V< Delineamento de e .perimentos de seleção para a ma. imi;ação da acur4cia seleti\*a e progresso genético< **Revista Árbore** \*<GP n<L p<L\$P+M## GPPM<

@6S6BD6 M<D<V< Genética 3iométrica e 6stat-stica no Melhoramento de !lantas !erenes 3ras-lia` 6mbrapa 7n0ormação Tecnol<gica "##" P\$Mp<

@7TT6@ 6<( G63VA@DT C<( SA5AM7B7 =< 6stimation o0 recombination 0requecies and construction o0 @=5 ! lindinge maps in plants 0rom crosses bet ] een hetero;Agous parents< **Genetics**, \*<G"M p<tJLM+JML GPP#

@FCVA S<C<( ND7S6B @<C<( ND67@F8 >tA<5<( 8D==655ATF+@73AS ?<C< Vegetati\*e propagation o0 RespirradeiraS bA cuttings< **Scientia Agraria** \*<M n<G+" p<\$%+\$ "##L<

@F5=S !<V<( @F5=S C< A muda de citros< Secretaria da Agricultura do estado de Minas Gerais GP%G< G"Jp<

@FMAB M!k( CAM3@A Mkk( >DÁ@68 >k( MF@6BF !k( DD@AB+V75A Bk  
Sudden Death o0 Citrus in 3ra;il` A Gra0t+Transmissible 3ud Dnion Diseasek **Plant  
Disease** \*kKK p&LM%+LJ\$ "##Lk

@FFS6 M5k( >A@@655 DkCk( ?D!!6@ @kSk Genetic mapping in a  
= populationk **Proceedings of the International Society of Citriculture**  
\*k\$ p&"G#+G% GPP"k

@FFS6 M5k( CV6BG Tk( ?D!!6@ =k Mapping the Citrus genomek **Acta  
Horticulturae** \*kM%M p&"M+% "###k

@FFS6 M5k 7denti0ication and use o0 genetic resistance and tolerance to ne ]  
diseasesk **!roceedings of the International Society of Citriculture** \*k" p&PM"+  
PML "##%k

@FSS6TT7 Vk( GA@B76@ Mk( 36@6TTA M>kGk( T67E67@A Ak@k@k(  
NDAGG7F >kAk( 3ATTAG57A FkCk( GFM6S M!k( D6 B6G@7 >kDk( 3FVO  
>kMk @esultados preliminares de estudos sobre uma no\*a anormalidade dos citros  
obser\*ada nos 6stados de São !aulo e Minas Gerais! Congresso !aulista de  
0itopatologia São !aulo **Summa Phytopathologica** \*kGJ p&G GPP#k

@FSTF?S Bk( SCVM76@6@ Dk( ?DD@BA Dk( ?567BVF=S Ak 3arleA  
putati\*e hApersensiti\*e induced reaction genes` genetic mapping sequence  
analAses and di00erential e .pression in disease lesion mimic mutants! **Theoretical  
and Applied Genetics** \*kG#\$ p&G#PL+GG#G "##%k

@D37F 5k( A255FB M!Ak( ?FBG !k( =6@BÁBD68 Ak( !F56? Mk(  
GD6@@7 >k( MF@6BF !k( =A5? 3k h k Genetic \*ariation o0 Citrus triste;a \*-rus  
isolates 0rom Cali0ornia and Spain` 6\*idence 0or mi.ed in0ections and  
recombination! **Journal of Virology** h ashington \*k\$M nkG\$ p&k#ML+K#J" "##Gk

@D78 Ck( AS7BS M>k Comparison bet ]een and genetic lindage  
maps! **Theoretical and Applied Genetics**, \*kG#J p&k"J+K%J "##%k

SA33AV SkMk( G@FSS6@ >k h k( CVABD56@ >k5k( 5FD8ADA 6kSk The  
e00ect o0 gro ]th regulators on the rooting o0 stems o0 citrus related genera and  
intergeneric somatic hAbrids! **Proceedings of the Florida State Horticultural  
Society** \*k G#L p&LK\$+LPG GPPGk

SAB?A@ AkAk( MFF@6 GkAk 6\*aluation o0 inter+simple sequence repeat  
analAsis 0or mapping in Citrus and e .tension o0 the lindage map! **Theoretical and  
Applied Genetics**, \*kG#" p&"#J+"GL "##Gk

SCV h A@8 Gk( V6@8 Mk( VDABG E!Nk( M7CVA56? h k( >AVFF@ Ak(  
h 6B865 Gk( MFV56@ V!k **Theoretical and Applied Genetics** \*k G## p&kMLM+

MMG "###

SCFTT A>( ?BFTT M A cluster analAsis method 0or grouping means in the analAsis o0 \*ariance& **Biometrics** h ashington \*%# n " p M#\$+MG" GP\$&

SCFTT ?&D& Microsatellite deri\*ed 0rom 6STs and their comparison ] ith those deri\*ed ba other methods& 7n` V6B@2 @>& QedT& !lant genotAping` the DBA 0ingerprinting o0 plants& CA3G !ublishing F.on D? p& ""M+""\$ "##G&

SVA852 S&M&( SA3@FDT M&3&( ?ASS6M V&A& @oot 0ormation on the stem cuttings o0 6ureda lemon and 6I+Soudari loquat as a00ected ba root-promoting chemicals and mist& **Alexandria Journal of Agricultural Research** \*o& %P p&MMP+MJP GPPL&

S75VA V&!& Genética da resistencia : em milho& >aboticabal "##"& G#Mp& Tese QDoutoradoT a =aculdade de Ciencias Agr4rias e Veterin4rias Dni\*ersidade 6stadual !aulista R>^lio de Mesquita =ilhoS&

S7MFB6 M&D&( @DSSF M&!&( !D56F G&( MA@SAB !&A&( 5F@6B8FB7 C&( et al& Construction o0 genetic maps 0or and based on A=5! @A!D and @=5! marders& **Fruits** \*&M% p&%K%+%P# GPPK&

S7V76@F A& A\*aliação de métodos de inoculação de e mapeamento de NT5s de resist/ncia em h-bridos de \*s& : gomose& "##G& GG\$p& Tese QDoutoradoT =aculdade de Ci/ncias Agron,micas Dnesp 3otucatu&

S7V76@F A&( C@7STF=AB7 M&( 3FAVA 5&!&( MACVADF M&A& Mapeamento de NT5s associados : produção de 0rutos e semente em h-bridos de \*s& & **Revista Brasileira de Fruticultura**, \*&"L p&\$LG+\$L% "##"&

S7V76@F A&( C@7STF=AB7 M&( MACVADF M&A& NT5 mapping associated ] ith rooting stem cuttings 0rom \*s& hAbrids& **Crop Breeding and Applied Biotechnology** \*&% n&G p&K%+KK "##%&

S7V76@F A&( C@7STF=AB7 M& =D@TADF 6&5&( GA@C7A A&A&=( CF65VF A&S&G&( MACVADF M&A& 7denti0ication o0 NT5s associated ] ith citrus resistance to & **Journal of Applied Genetics** \*&L\$ n&G p&"%+%K "##J&

STACV+MACVADF D&@&( !6@FB7 5&A( D7AS 5&C&=( CA!F@@7BF M&C&( MD556@ G&h&( et al& Character;ation o0 monoclonal antibodies produced against se\*ere CTV isolates o0 [Capão 3onito& 7n` !roceedings o0 GMth& Con0erence o0 7nternacional Frgani;ation o0 Citrus Virologists p&GJM+G\$G "##"&



STAM ! Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package. **The Plant Journal** 1991, 3: 1-10

ST655 @GD( TF@@76 >V! Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. 2nd ed. McGraw-Hill, 1965. 300 pp. \$12.00

STD@T6VABT A!V! The linear arrangement of six linked factors in *Drosophila* as shown by their mode of association. **Journal of Experimental Zoology** 1951, 103: 1-10

SD7T6@ ?!A! ( h 6BD65 >=<( CAS6 >S! 5 linkage-G` a !ASCA5 computer program for the detection and analysis of genetic linkage. **The Journal of Heredity** 1981, 72: 1-10

Sh7BG56 h!T! The botany of Citrus and its relatives in the orange subfamily. 7th ed. h 6336@ V!>!( 3ATCV65F@ 5!D! Qeds!T! The citrus industry in Brazil and Los Angeles. University of California Press. 1968. 300 pp. \$12.00

Sh7BG56 h!T! ( @66C6 !!C! The botany of citrus and its wild relatives. 7th ed. @6DTV6@ h! ( h 6336@ V!>!( 3ATCV65F@ 5!D! Qeds!T! The citrus industry in Brazil and Los Angeles. University of California Press. 1968. 300 pp. \$12.00

TABA?A T! Species problem in citrus: a critical study of wild and cultivated units based upon field studies in their native homes. *TodaO`>apanese Society for the Promotion of Science* 1961, 10: 1-10

TAB?S562 S!D! ( GABA5 M! h! ( !@7BC6 >!!( de V7C6BT M!C! ( 3FB76@3A56 M! h! et al! High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, 1981, 88: 1-10

TAB?S562 S!D! Mapping poligenes. **Annual Review of Genetics** 1981, 11: 1-10

TA@GFB M!5! !!B! ( B7?F5A6VA F! ( MAB>DBATV ?!5! ( 566 @!<!( Mg556@ G! h! ( MACVADF M!A! Coat protein gene of a Brazilian isolate of the citrus tristeza virus: cloning, expression in *E. coli* and production of polyclonal antiserum. **Fitopatologia Brasileira** 1981, 6: 1-10

TA@GFB M!5! !!B! ( C@7STF=AB7 M! ( MACVADF M!A! ( Mg556@ G! h! Fcorrencia do complexo capão bonito do citrus tristeza virus QCTVT em tangerina [!ondan\ sobre limão [Cra\*o\ em plantio comercial em campanha QMG! **Laranja Cordeiro** 1981, 10: 1-10

TATDM >V! ( 36@@2 @!6! ( V6A@B C!>! Characterization of cultivated and separation of nucellar and agoutic seedlings by thin layer chromatography

**Proceedings of the Florida State Horticultural Society**

TF67CV A&V( S!76G65+@F2 !& Di00erentiation bet ]een nucellar and ;Agotic citrus seedlings bA lea0 shape& **Theoretical and Applied Genetics**, \*&L" p&%GL+ %GM GP\$"&

TF@@6S A&M( SFFST @&?( D76D6BVF=6B D& 5ea0 iso;Ames as genetic marders in citrus& **America Journal of Botany** \*&JM p&KJP+KKG GP\$K&

TFEF!6DS V& Botes on the genetics o0 a 0e ] lea0 characters in the genus & **Euphytica** \*&GG p&GP+"M GPJ"&

TF85D 7&( GD2 C&5&( MFF@6 G&A& AnalAsis o0 Baw and Cl+ accumulation related traits in an intergeneric 3CG progenA o0 and under saline and non+saline en\*ironments& **Genome** \*&L" p&JP"+\$#M GPPPa&

TF85D 7&( GD2 C&5&( MFF@6 G&A& NT5 analAsis o0 morphological traits in an intergeneric 3CG progenA o0 and under saline and non+saline en\*ironments& **Genome** \*&L" p&G#"#+G#"P GPPPB&

VAB FF7>6B >& h& AccuracA o0 mapping quantitati\*e trait loci in autogamous species& **Theoretical and Applied Genetics** \*&KL p&K#+KGG GPP"&

VAB FF7>6B >& h&( VFF@@!S @&6& >oinMap \*ersion %&#` so0t ]are 0or the calculation o0 genetic lindage maps (so0t ]areT& h ageningen& **Plant Research International** p&MG "##G&

VAB FF7>6B >& h&( 3F6@ M&!&( >ABS6B @&C&( MA576!AA@D C& MapNT5 x L&#` So0t ]are 0or the calculation o0 NT5 positions on genetic maps h ageningen& **Plant Research International** "##"&

V6BCFVS?2 @& Verança quantitati\*e 7n` !AT6@B7AB7 6&( V76GAS G&!& Qeds&T Melhoramento e !rodução de Milho Campinas =undação Cargill p& G%\$+ "GL GPK\$&

VFS !&( VFG6@S @( 3566?6@ M&( @67>ABS M&( VAB D6 566 T&( VF@B6S M&( =@7>T6@S A&( !FT >&( !656MAB >&( ?D7!6@ M&( 8A36AD M& A=5!` a ne ] technique 0or DBA 0ingerprinting& **Nucleic Acids Research** \*&"% p&LL#\$+LLGL GPPM&

h7557AMS >&G&?( ?D3657? A&@&( 57VA? ?&>&( @A=A5S?7 >&A&( T7BG62 S&V& DBA polAmorphisms ampli0ied bA arbitrarA primers are use0ul as genetic marders& **Nucleic Acids Research**, \*&GK n&"" p&JM%G+JM%M GPP#&

h D @k( 57B Mk =unctional mapping a ho ] to map and studA the genetic architecture o0 dAnamic comple. traitsk **Nature Reviews Genetics**, \*k\$ nk% pL""P+ "%\$ "##Jk

h DTSCV6@ Vk?k Citrus rootstocdk **Horticultural Reviews**, \*kG pL"%\$+"JP GP\$Pk

2 ABG 8kBk( 26 Ek@k( MF57BA >k( @FFS6 Mk5k( M7@?FV Tk6k Sequence analAsis o0 a "K"+?ilobase region surrounding the citrus triste;a \*irus resistance gene QCt\*T locus in @a0k **Plant Physiology** \*kG%G pLkLk"+LP" "##%k

2 FSV7DA Tk( SV7CV7>F Tk( D6BF 7k( ?7VA@A Tk( 2AMADA 2k( et al k Sur\*ea 0or resistance o0 citrus culti\*ars and hAbrid seedlings to citrus triste;a \*irus QCTV Tk **Bulletin of the Fruit Tree Research Station** Fditsu \*kG# pLkMG+JK GPK%k

2 FSV7DA Tk 7nheritance o0 susceptibilitA to citrus triste;a \*irus in tri0oliata orange Q Tk **Bulletin of the Fruit Tree Research Station** Fditsu \*kG" pLkG\$+"% GPKMk

2 FSV7DA Tk Gra0t compatibilitA o0 Citrus ] ith plants in the Aurantioideae and their susceptibilitA to citrus triste;a \*irusk **Plant Disease** Saint !aul \*kK# nkL pLkLGL+LG\$ GPPJk

2 FSV7MA@D Vk( FV3A ?k( TD@DM7 ?k( TFMA@D Bk( MD@A7 Mk( MD?A7 2k et al k Detection o0 quantitati\*e trait loci 0or )u\*enile gro ] th 0lo ]er bearing and rooting abilitA base don a lindage map o0 sugi QCrAptomeria )aponica Dk DonTk **Theoretical and Applied Genetics**, \*olkP\$ pLkLM+M# GPPKk

2 FDBG BkDk NT5 mapping and quantitati\*e disease resitance in plantsk **Annual Review Phytopathology** \*k%L pLkL\$P+M#G GPPJk

2D >k?k( TABG Sk( S5A3ADGV Mk3( V66SAC?6@ Ak( CF56 Gk To ] ards a saturated molecular genetic lindage map 0or culti\*ated sun0lo ] erk **Crop Science** \*k L% pLk%J\$+%K\$ "##%k

86BG 8k3k Theoretical basis o0 separation o0 multiple linded gene e00ects on mapping quantitati\*e trait loci k **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** \*olkP# pLkG#P\$"+G#P\$J GPP%k

86BG 8k3k !recision mapping o0 quantitati\*e trait loci k **Genetics**, \*olk G%J pLkGLM\$+GLJK GPPLk

## 7 ANEXOS

**Anexo I** Distribuição de médias para as variáveis número de estacas enraizadas mensuradas em PL h-bridos e seus genitores absorbância em 657SA CTV mensurada em KM h-bridos e seus genitores e índice de morfologia foliar mensurado em P# h-bridos e seus genitores

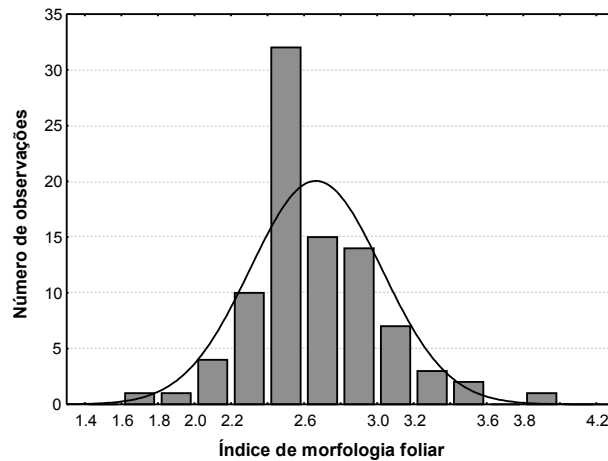
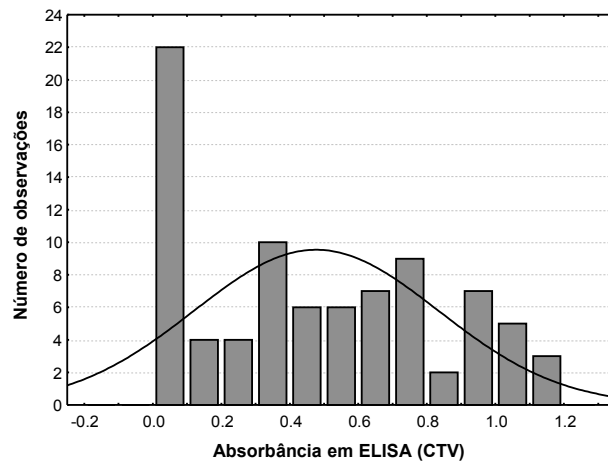
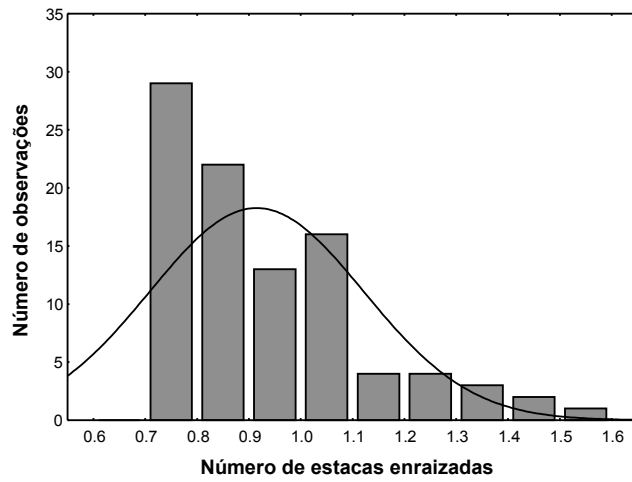
**Anexo II** Análise de variância para CTV enraizamento e morfologia foliar referentes : avaliação de uma população de h-bridos de limão [Cravo e citrumelo (S)ingle em experimento completamente casualizado em casa de vegetação Aplicativo SASM+Agri CABT67 et al

**Anexo III** Marcadores AFLD e teste de homogeneidade para segregação Mendeliana

**Anexo IV** Marcadores Microsatélites obtidos a partir de bibliotecas genômicas CCSM e bibliotecas de STs CCSM tipo de repetição seqüência dos primers tipo de segregação e teste de homogeneidade para segregação Mendeliana

**Anexo V** Marcadores AFLs seqüência dos primers tipo de segregação e teste de homogeneidade para segregação Mendeliana

Y



**Anexo I** Distribuição de médias para as variáveis número de estacas enraizadas mensuradas em PL h-bridos e seus genitores, absorvância em 657SA QCTVT mensurada em KM h-bridos e seus genitores, e índice de morfologia foliar mensurado em P# h-bridos e seus genitores. As variáveis associadas ao número de estacas enraizadas e leitura da absorvância em 657SA QCTVT mostram distribuição em classes distintas enquanto que o índice de morfologia foliar mostra uma distribuição cont-nua aproximadamente normal.

**Anexo III** Análise de variância para CTV enraizamento e morfologia foliar referentes :  
 a avaliação de uma população de híbridos de limão [Cravo] e citrumelo [S]ingle em experimento  
 inteiramente casualizado em casa de vegetação (Aplicativo SASM+Agri CABT6@7 et al  
 "###GT

	CTV				Enraizamento				Morfologia foliar			
Fonte de	G5	N&M	=	!rY1=	G5	N&M	=	!rY1=	G5	N&M	=	!rY1=
Variação	KJ	#L#\$	%M	#G%LK	PM	#G	"PP	#GL	PG	#L%	J"#M	#GM
Gen<tipo	G\$L	#G"G		%KL	#G"\$			KL	#JP			
@es-duo	\$"KG			"PP				G#				
CV<bt	%			M				%				
B° de												
repetições												

!rY 1 Mb

**Anexo III** Marcadores @A!D e teste de homogeneidade para segregação Mendeliana

Marcador	Tipo de segregação*	$\chi^2$
CP+L##	nn.np	K&L#L"MM%GPGYY
CP+\$##	nn.np	#&JK#KMG#JL
CP+L###	nn.np	%&LLJK#KMGG
CP+MM##	nn.np	M&GLKP%JG\$#"GY
CGP+PM#	lm.ll	G&#J%K"P\$K\$
7\$+J##	nn.np	#
7G#+LM#	lm.ll	#&#L"MM%GPG
7G#+MK#	nn.np	"&#KMG#J%K%
7G#+GJM#	nn.np	#&#L"MM%GPG
7G#+GK##	nn.np	L&"MM%GPGLKP%YY
@G+%M#	lm.ll	G&M%GPGLKPL
@G+K\$#	nn.np	#
@G+G\$M#	nn.np	\$&GPGLKP%JG\$#YY
@+"GM#	nn.np	"&"MG#J%K"PSYYY
@M+%M#	lm.ll	#&JK#KMG#JL
@M+K##	lm.ll	#&GS#"G"\$JJ
@M+P"M	nn.np	#&GS#"G"\$JJ
@M+G%"M	nn.np	"&#KMG#J%K%
@J+GG##	nn.np	#&%K"P\$K\$"%
@\$+LM#	lm.ll	\$&GPGLKP%J"
@\$+M\$#	lm.ll	#&#L"MM%GPG
@\$+J%#	nn.np	G&#&KP%JG\$#"G"YYY
@\$+GG##	nn.np	%&LLJK#KMGG
@P+%###	nn.np	G&#J%K"P\$K\$
@G#+G"##	nn.np	%&LLJK#KMGG
@G"+J##	lm.ll	L&"MM%GPGLP
@G%+MM#	nn.np	G&#&KP%JG\$#"G"YYY
@G%+M\$M	nn.np	%&%&JG\$#"G"\$YYY
@GL+\$M#	lm.ll	G&M%GPGLKPL
@GL+P##	nn.np	G&#J%K"P\$K\$
@GL+G##	nn.np	G"&"P\$K\$"%L#LYYY
@GL+GM##	nn.np	\$&GPGLKP%JG\$#YY
@GL+"M##	nn.np	"&#KMG#J%K%
@GM+\$M#	nn.np	M&GLKP%JG\$#"GY
@GM+PM#	lm.ll	#&GS#"G"\$JJ
2GL+M##	nn.np	#&%K"P\$K\$"%
2GL+GL##	lm.ll	P&M\$LLJK#KMG#YYY
2GL+GJM#	nn.np	#&GS#"G"\$JJ
2GL+%###	nn.np	#&%K"P\$K\$"%
2GL+L###	lm.ll	G&#&KP%JG\$#"G"YYY

B-\*eis de signiõicIncia` Yc<digos do programa >oinMap \* %&# QVAB FF7>6B e VFF@7!S "##GT reõerentes aos tipos de segregação para uma população C! QCross !ollinatorsT QTabela GT YY  $\alpha$  \_# #M YYY $\alpha$  \_# #G a G grau de liberdade QG5T

**Anexo IV** Marcadores Microsatélites obtidos a partir de bibliotecas genômicas (CCSM) e bibliotecas de 6STs (CCSM6T) tipo de repetição seqZ/ncia dos RprimersS tipo de segregação e teste de homogeneidade para segregação Mendeliana (Continuação)

“Primer”	Repetição	“Forward” (5’→3’)	“Reverse” (5’→3’)	Tipo de segregação	$\chi^2$
CCSM #G	QAGT <sub>n</sub>	cagctccaagaacccta	gccaatatcatgcagga	e0 . eg	#JK#KMG#JL
CCSM #P	QAGT <sub>n</sub>	gactggattagattctctg	atggatgtgtatctcactc	ab . cd	G"K"PSK\$"LYY
CCSM G"	QAGT <sub>n</sub>	gattgaatcttctgtagctc	atcatcatctagtgtcactg	hd . hd	J&G"\$JMPM\$LYY
CCSM G\$	QAGT <sub>n</sub>	acatggacaggacaactaag	gttatgatacgtctgtgcc	nn . np	"&#KMG#J%K%
CCSM GP	QAGT <sub>n</sub>	ggacactgtgactaa	agtaccagaccacc	hd . hd	"&MPM\$LLJKYY
CCSM "P	QTGAT <sub>GM</sub> QTAT <sub>P</sub>	ctgtgattgtgccga	cacactcacaatgtgac	hd . hd	J&G"\$JMPM\$LYY
CCSM L#	QGCAACAT <sub>G#</sub>	acaagagtcgcaacaatc	gacaacagtggaatacc	ab . cd	G&M%GPGLKPL
CCSM LJ	QGCAT <sub>J</sub> QCAAT <sub>K</sub>	ataccttatcaagtaacag	tcagaatgagtactagctcc	lm . ll	M&GLKP%JGSY
CCSM MG	QCAT <sub>G</sub>	ccaagctcccgggtaccgc	agtgtgctggaattcggc	lm . ll	#
CCSM M%	QGTTT\$	atgacgacatcgacaacg	cgttaccactcaccatac	hd . hd	#JK#KMG#JL
CCSM MM	QCAAT\$	agcatgaagagcagcaag	gcttggcctcactcta	hd . hd	G&M%GPGLKPL
CCSM #PG	QAGT <sub>GL</sub>	gagattaagatgaagac	ttctgtgactgtactcg	lm . ll	#GS#"G"\$JJ
CCSM GLJ	QAGT <sub>M</sub>	tggttagaaggtgaacag	acatagagttgtctatc	lm . ll	#
CCSM GJK	QGTI <sub>G</sub>	tcaatagaggatacactacc	tgtcaacaaggctatacac	hd . hd	M&GLKP%JGSY
CCSM G"K	QGTI <sub>J</sub> TTC QT <sub>G</sub>	atctgatagatgagccac	taacagttgtagtgtcc	hd . hd	#JK#KMG#JL
CCSM G"P	QCAT <sub>S</sub> QTAT <sub>L</sub>	gtatgtggagagatgttc	atctgctctatgaccac	hd . hd	G&M%GPGLKPL
CCSM GL\$	QAGT <sub>GK</sub>	agactcacgtaacctactc	gctatgttatgatacgtctg	nn . np	#GS#"G"\$JJ
CCSM GMG	QTCT <sub>G</sub>	acgtagagctgttatagag	ctaggattgttagatagc	nn . np	#K"PSK\$"%
CCSM GML	QAGT <sub>GP</sub>	gactccgcttctgttctatg	acaatagaccagcactcaa	e0 . eg	#L"MM%GPG
CCSM GMJ	QTCT <sub>#</sub>	gtctctgtgtgtgtcggt	acgaagtgaagtgtgaatg	nn . np	K&L#L"MM%"YY
CCSM GJG	QGAT <sub>GL</sub>	tacacatacatgcacgtaca	actcagtagctcctcaata	e0 . eg	#L"MM%GPG
CCSM GJ"	QTCT <sub>G</sub>	cagctgcagtatccatctaa	ggtgaagtcaagtgcgag	e0 . eg	#
CCSM GJ%	QTCT <sub>GL</sub>	actcagtagctcctcaata	tacacatacatgcacgtaca	e0 . eg	#
CCSM GJK	QAGT <sub>GJ</sub>	acttacatgcaaggagagtg	gagacactggaaggtatcaa	e0 . eg	L&"MM%GPGLPY
CCSM G\$#	QGAT <sub>G</sub>	agttgagtactgtgtcgaa	ctaattggctgagagagttgc	hd . hd	#K"PSK\$"%
CCSM6 #""#	QCTGCTCT <sub>M</sub>	catctcagactcctgcacca	ccctccaccatcaagaa	nn . np	#JK#KMG#JL
CCSM6 #""	QATCT <sub>K</sub>	ctatcggcaaggagcagtc	tctctgcaggaaggtggg	nn . np	G&M%GPGLKPL
CCSM6 #""L	QATT <sub>GG</sub>	gcttctggaatggagcaag	cgttttctgaggtcacggt	nn . np	G&M%GPGLKPL
CCSM6 #""J	QGTI <sub>G#</sub>	gaagaagaagcagaggagc	ccccaaaaataagcagcaa	nn . np	G&M%GPGLKPL
CCSM6 #""\$	QATAGT <sub>M</sub>	gtttgctgtttgtgtcg	caaacctctaaagcccaa	hd . hd	#L"MM%GPG
CCSM6 #LP	QTTGAT <sub>J</sub>	aataagcgtatcagcagcag	aatcatgaacgggtgaaac	nn . np	#GS#"G"\$JJ



**Anexo IV** Marcadores Microsatélites obtidos a partir de bibliotecas genômicas (CCSM) e bibliotecas de GSTs (CCSM) tipo de repetição seqZ/ncia dos RprimersS tipo de segregação e teste de homogeneidade para segregação Mendeliana (Continuação)

“Primer”	Repetição	“Forward” (5’→3’)	“Reverse” (5’→3’)	Tipo de segregação	$\chi^2$
CCSM6 #M#	(GAAT) <sub>s</sub>	gagttgggattctgctgtga	gactgtgttctgatgccga	ab.cd	#GS#"G"\$JJ
CCSM6 #M"	(TCT) <sub>GL</sub>	ctggctcagctctgctcatt	tgctgctgcttctgcttcta	lm.ll	G&M%GPGLKPL
CCSM6 #M%	(TAAT) <sub>GG</sub>	gatctccctatcatcgcaaa	tttgagggtggatggata	nn.np	"&#KMG#J%K%
CCSM6 #KP	(ATAT) <sub>S</sub>	gaggctcgaagtcaggag	acttatctgcacccgacga	e0.eg	#&JK#KMG#JL
CCSM6 #PG	(GATK)	cgtaataacgccgtcaagt	tactttaacggcgtcacc	lm.ll	#&JK#KMG#JL
CCSM6 #P"	(GCC)I	aagcatcgtaaaagttggg	ttgatgcatgttctcaagg	e0.eg	P&M\$LLJK#KMY
CCSM6 #P\$	(TCAT)J	ccattaacgagaaaaccaaaca	caaaaaggggttgcagaaga	e0.eg	#&GS#"G"\$JJ
CCSM6 #PP	(TCAT)J	caccacctcgaaaacactt	gccaactgtcgacaaaat	hd.hd	M&GLKP%JGSY
CCSM6 G##	(ATT)S	gaaggtgagccaggaccata	cctgataccggaactgaag	hd.hd	#&GKLMJK%K\$
CCSM6 G#"	(TCT)I	gccccatccaaaaccttatt	gaaggtgtgctcttcacc	ab.cd	G&M%GPGLKPL
CCSM6 G#\$	(TGG)I	ggactccaagcaagcaaaag	ggtgcgtaagtgtggaggt	hd.hd	"&\$"%L#L"MM
CCSM6 G#P	(AATK)	tcaaagtcgattctgcacg	catatggttggccgttctt	hd.hd	P&M\$LLJK#KMGY
CCSM6 GG%	(CAATK)	gtccaacaatagcagcaga	tgaattgctggcataagcg	hd.hd	G&#J%K"P\$K\$

B-\*eis de signi0ic1ncia` Y  $\alpha$  \_# #M YY  $\alpha$  \_# #G a G grau de liberdade (G5)

Anexo V Marcadores T@A!s seqZ/ncia dos RprimersS tipo de segregação e teste de homogeneidade para segregação Mendelianak

Marcadores	“Forward” (5’→3’)	“Reverse” (5’→3’)	Tipo de segregação	$\chi^2$
!G@G+G Q\$LMYYYY	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattaat	nn . np	##JK#KMG#JL
!G@G+" Q\$%MT	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattaat	lm . ll	%M&\$K\$"%L#L"MY
!G@G+% QJKMT	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattaat	nn . np	##L"MM%GPG
!G@G+L QJ#T	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattaat	lm . ll	G##KP%JG\$#"G"YY
!G@G+M QMG#T	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattaat	lm . ll	"K&\$JMPM\$LLJYY
!G@G+J Q%J#T	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattaat	nn . np	##G\$#"G"\$JJ
!G@G+\$ Q%KT	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattaat	nn . np	G"&"PSK\$"%L#LY
!G@G+K Q%GMT	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattaat	lm . ll	G##KP%JG\$#"G"YY
!G@G+P Q"LMT	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattaat	nn . np	"&MG#J%K%
!G@G+G# Q"GMT	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattaat	lm . ll	##G\$#"G"\$JJ
!G@"+G QKM#T	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattgc	nn . np	M&GLKP%JG\$#"Y
!G@"+" QJK#T	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattgc	nn . np	G&M%GPGLKPL
!G@"+% QJ"MT	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattgc	nn . np	G&#J%K"PSK\$
!G@"+L QM"MT	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattgc	nn . np	%&LLJK#KMG
!G@"+M Q%GKT	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattgc	lm . ll	"&\$"%L#L"MM
!G@"+J QG##T	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattgc	nn . np	##K"PSK\$"%
!G@"+\$ QMLT	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattgc	hd . hd	##G\$#"G"\$JJ
!G@%+GQ\$%#T	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattgac	nn . np	##L"MM%GPG
!G@%+" QJP#T	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattgac	nn . np	L&"MM%GPGLP
!G@%+% QM\$#T	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattgac	nn . np	L&"MM%GPGLP
!G@%+L QL%#T	gcccgtgctgcctgatgatt	gactgctgacgaattgac	nn . np	G&#J%K"PSK\$
!"@"+G QK%#T	acagggccaaaggtaaacaca	gactgctgacgaattgc	lm . ll	##JK#KMG#JL
!"@"+" Q\$M" T	acagggccaaaggtaaacaca	gactgctgacgaattgc	lm . ll	G&M%GPGLKPL
!"@"+% QJL#T	acagggccaaaggtaaacaca	gactgctgacgaattgc	lm . ll	G&M%GPGLKPL
!"@"+L QJ%#T	acagggccaaaggtaaacaca	gactgctgacgaattgc	nn . np	\$&GPGLKP%J"
!"@"+M QJG#T	acagggccaaaggtaaacaca	gactgctgacgaattgc	hd . hd	##JK#KMG#JL
!"@"+J QMJ#T	acagggccaaaggtaaacaca	gactgctgacgaattgc	nn . np	%M&\$K\$"%L#L"MY
!"@"+\$ QL%#T	acagggccaaaggtaaacaca	gactgctgacgaattgc	nn . np	##L"MM%GPG
!"@"+K Q"GMT	acagggccaaaggtaaacaca	gactgctgacgaattgc	nn . np	G##KP%JG\$#"G"YY
!"@"+P QGG#T	acagggccaaaggtaaacaca	gactgctgacgaattgc	nn . np	"K&\$JMPM\$LLJYY
!"@"+G# QPKT	acagggccaaaggtaaacaca	gactgctgacgaattgc	nn . np	##G\$#"G"\$JJ

B-\*eis de signi0icncia` Y  $\alpha$  \_# #M YY  $\alpha$  \_# #G a G grau de liberdade QG5T YYY n^mero de pares de bases

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)