

MARCADORES RAPD PARA MAPEAMENTO GENÉTICO E SELEÇÃO DE HÍBRIDOS DE CITROS¹

ROBERTO PEDROSO DE OLIVEIRA²; MARIÂNGELA CRISTOFANI³; MARCOS ANTÔNIO MACHADO³

RESUMO - Os marcadores moleculares apresentam várias aplicações no melhoramento de plantas, permitindo uma série de análises genéticas. Este trabalho foi realizado com o objetivo de estabelecer marcadores RAPD para serem utilizados em estudos de mapeamento genético e na seleção de híbridos entre tangerina-‘Cravo’ (*Citrus reticulata* Blanco) e laranja-‘Pêra’ (*C. sinensis* (L.) Osbeck). Extraiu-se DNA de folhas dos parentais e de seis híbridos F₁. As reações de amplificação foram preparadas em 13 µL de solução, constituída por tampão 1x GIBCO BRL; soluções 1,54 mM de MgCl₂ e 0,2 mM de cada dNTP; 15 ng de cada ‘primer’; 1,5 unidade de ‘Taq DNA Polymerase’ e 15 ng de DNA genômico. As reações foram realizadas em termocicladores programados para 36 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 36°C, 2 min a 72°C e 10 min de extensão a 72°C. Foram testados ‘primers’ decâmeros arbitrários dos ‘kits’ A, AB, AT, AV, B, C, D, E, G, H, M, N, P, Q, R e U da Operon, sendo selecionados 113 por apresentarem polimorfismo, com número de marcadores variando de 1 a 6 por ‘primer’. Esses ‘primers’ amplificaram 201 (23,13%) bandas polimórficas, aplicáveis no mapeamento genético e seleção de híbridos. A frequência de ‘primers’ com 1; 2; 3; 4; 5 e 6 bandas polimórficas foi de 49,5%, 33,6%, 9,7%, 4,4%, 1,8% e 1,0%, respectivamente.

Termos para indexação: laranja-‘Pêra’, tangerina-‘Cravo’, híbridos, marcadores moleculares

RAPD MARKERS TO GENETIC MAPPING AND SELECTION OF CITRUS HYBRIDS

ABSTRACT - Molecular markers have many applications in plant breeding, enabling some types of genetic analyses. The aim of this work was to establish RAPD markers to be used to genetic mapping studies and selection of hybrids between ‘Cravo’ tangerine (*Citrus reticulata* Blanco) and ‘Pêra’ orange (*C. sinensis* (L.) Osbeck). DNA of the parents and six hybrids F₁ was isolated from the leaves. The amplification reactions were performed in volumes of 13 µL, composed by GIBCO BRL 1x buffer, 1,54 mM MgCl₂, 0,2 mM of each dNTP, 15 ng of each primer, 1,5 unit of Taq DNA Polymerase and 15 ng of genomic DNA. These reactions were carried out in thermocyclers programmed for 36 cycles of 1 min at 92°C, 1 min at 36°C, 2 min at 72°C and 10 min of extension at 72°C. It were evaluated random decamer primers of the kits A, AB, AT, AV, B, C, D, E, G, H, M, N, P, Q, R e U from Operon. One hundred thirteen primers were selected as polymorphics, with number of markers varying from 1 to 6 per primer. These primers amplified 201 (23,13%) polymorphic fragments, with application in genetic mapping and selection of hybrids. The frequency of primers with 1, 2, 3, 4, 5 and 6 polymorphic fragments was 49,5%, 33,6%, 9,7%, 4,4%, 1,8% e 1,0%, respectively.

Index terms: ‘Pêra’ sweet orange, ‘Cravo’ tangerine, hybrids, molecular makers

INTRODUÇÃO

Fatores de natureza biótica e abiótica afetam de modo significativo a cultura dos citros no Brasil. O melhoramento genético apresenta limitações relacionadas à longa juvenildade, incompatibilidade, alta heterozigosidade, esterilidade, depressão por endogamia, apomixia e poliploidia (Gmitter et al., 1996).

Plantas híbridas entre tangerina-‘Cravo’ (*Citrus reticulata* Blanco) e laranja-‘Pêra’ (*C. sinensis* (L.) Osbeck) são potencialmente importantes por segregarem para diversas características de importância agrônômica, principalmente para o caráter resistência/suscetibilidade a doenças, entre as quais a clorose variegada dos citros (CVC). A laranja-‘Pêra’ é altamente suscetível à doença e a tangerina-‘Cravo’ não tem apresentado sintomas no campo (Machado et al., 1993).

Diversos marcadores moleculares têm sido utilizados no melhoramento genético de plantas, permitindo análises mais

completas e consistentes de sua genética. No melhoramento de citros, vêm sendo utilizados na seleção precoce de híbridos e plantas nucelares (Oliveira et al., 2000), obtenção de ‘fingerprints’ de cultivares (Deng et al., 1995), caracterização de germoplasma (Machado et al., 1996), estudos de relações filogenéticas entre espécies e gêneros (Federici et al., 1988), construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e na localização de genes de interesse econômico (Cai et al., 1994; Gmitter et al., 1996; Simone et al., 1998; Cristofani et al., 1999).

Atualmente, os RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) consistem em um dos marcadores moleculares mais usados em estudos genéticos. Os RAPDs são detectados pela amplificação, de forma arbitrária, de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos pela reação de polimerase em cadeia (PCR), na presença da enzima termoestável ‘DNA polimerase’ (Williams et al., 1990).

As principais vantagens do RAPD referem-se à fácil

¹ (Trabalho 261/2000). Recebido: 27/11/2000. Aceito para publicação: 21/09/2001. Extraído da tese de Doutorado, a ser apresentada pelo primeiro autor ao CENA-USP, Piracicaba-SP.

² Eng. Agr., M.Sc., Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (CPACT), Caixa Postal 403, CEP 96001-970, Pelotas-RS. Email: rpedroso@cena.usp.br

³ Eng. Agr., Ph.D., Centro de Citricultura ‘Sylvio Moreira’ (CCSM-IAC), Caixa Postal 04, CEP 13490-970, Cordeirópolis-SP. Email: fiac@siteplanet.com.br

execução, rápida obtenção de marcadores, necessidade de pequenas quantidades de DNA genômico (10 a 100 ng), baixo custo, ausência de hibridação, não-utilização de radioisótopos, polimorfismo ser visualizado na forma de banda amplificada de DNA visível em gel de agarose corado com brometo de etídio, polimorfismo ser detectado em regiões altamente repetitivas e um nível elevado de polimorfismo quando se compara com outros marcadores moleculares. As desvantagens relacionam-se à reprodutibilidade dos resultados, ambigüidade na interpretação das bandas, co-migração de fragmentos de igual ou tamanho muito próximo e ao caráter dominante da maioria dos marcadores obtidos (Cruz & Milach, 1998; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Este trabalho teve por objetivo estabelecer marcadores RAPDs consistentes que possam ser utilizados em estudos de mapeamento genético e seleção de híbridos entre tangerina-‘Cravo’ e laranja-‘Pêra’.

MATERIAL E MÉTODOS

Folhas frescas e maduras dos parentais tangerina-‘Cravo’ e laranja-‘Pêra’, e de seis híbridos F_1 desses genitores, obtidos por cruzamentos controlados, foram utilizadas para a extração de DNA. As folhas foram lavadas em água corrente, secas com papel toalha e trituradas em almofariz com nitrogênio líquido. A extração de DNA foi feita utilizando o protocolo de Murray & Thompson (1980), adaptado por Cristofani et al. (1999), que utilizam o método CTAB.

A quantificação do DNA foi feita em gel de agarose, corado com brometo de etídio ($0,5 \text{ ng mL}^{-1}$), comparando-se a λ -DNA intato nas concentrações de 50; 100; 150 e 200 ng μL^{-1} (Sambrook et al., 1989). De acordo com os mesmos autores, a qualidade do DNA extraído foi avaliada com base na ausência/presença e intensidade de rastro no gel após corrida eletroforética.

As reações de amplificação foram preparadas em um volume final de 13 μL , com 1,3 μL de tampão 10x (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl - GIBCO BRL); soluções 1,54 mM de MgCl_2 (GIBCO BRL) e 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP - GIBCO BRL); 15 ng de cada ‘primer’; 1,5 unidade de ‘Taq DNA Polymerase’ (GIBCO BRL); e 15 ng de DNA genômico. Adicionou-se 20 μL de óleo mineral (Sigma) por reação. As amplificações foram realizadas em termocicladores MJ Research Inc., programados para 36 ciclos de 1 min a 92°C , 1 min a 36°C , 2 min a 72°C e 10 min de extensão a 72°C . Foram avaliados ‘primers’ decâmeros de seqüência arbitrária dos ‘kits’ A, AB, AT, AV, B, C, D, E, G, H, M, N, P, Q, R e U da Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em tampão TAE 1X (0,04 M Tris-acetato + 1 mM EDTA), utilizando gel de agarose a 1,4%, contendo 5 ug mL^{-1} de brometo de etídio. A corrida foi realizada a 94 V, sendo aplicados 5 μL da solução de reação com 1 μL de tampão de carregamento (0,25% de azul de bromofenol + 40% de sacarose) por canaleta do gel. O marcador ‘DNA Ladder’ de 1 kb (GIBCO BRL) foi utilizado como padrão. A visualização das bandas foi realizada sob luz ultravioleta.

Os ‘primers’ testados foram avaliados quanto ao número total de bandas geradas, número de marcadores encontrados e intensidade das bandas polimórficas. As bandas polimórficas

foram classificadas em ‘fortes’ para amplificações de grande intensidade e nitidez, e ‘moderadas’ para amplificações de intensidade média. As amplificações polimórficas visíveis de pouca intensidade e nitidez não foram consideradas.

Os produtos polimórficos de amplificação foram designados de acordo com o ‘primer’ e tamanho da banda amplificada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo utilizado para a extração de DNA das amostras de citros apresentou uma eficiência média de 4 μg de DNA/200 mg de folha fresca, com valores variando de 2,5 a 10 μg . O DNA extraído foi de boa qualidade, pois, praticamente, não houve rastro nos géis de quantificação, indicando baixo nível de degradação.

As reações de amplificação apresentaram elevada reprodutibilidade, não havendo diferenças entre os termocicladores. Segundo Cruz & Milach (1998) e Ferreira & Grattapaglia (1998), a reprodutibilidade está fortemente associada à qualidade do DNA e à padronização das condições de reação. Keil & Griffin (1994) também obtiveram padrões de bandas RAPDs bastante consistentes, ao trabalharem com *Eucalyptus*, verificando pequena ou nenhuma variação durante as repetições. Foram amplificadas, em média, 7,8 bandas por ‘primer’, com valores variando de 1 a 16. Machado et al. (1996) e Coletta Filho et al. (1998) obtiveram, respectivamente, médias de 5,3 e 4,7 bandas

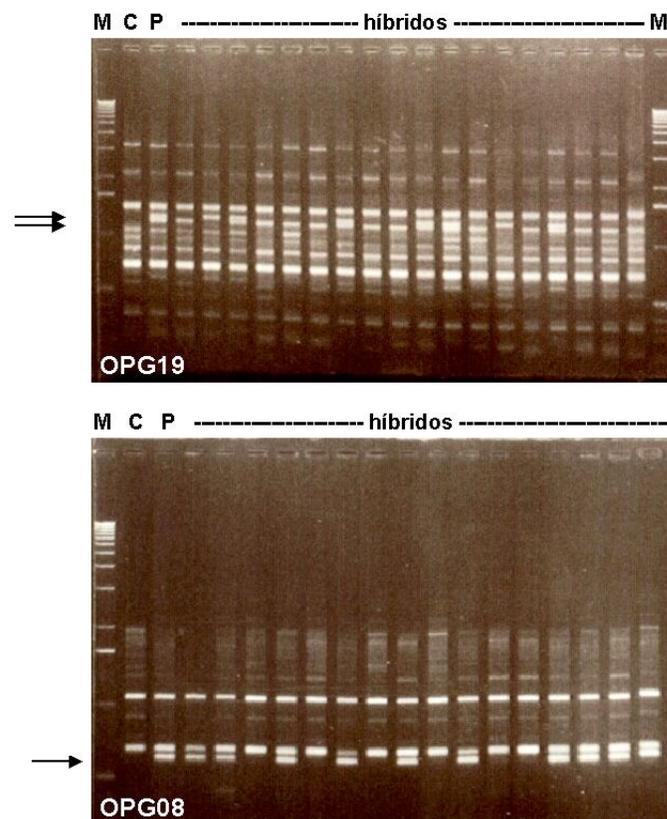


FIGURA 1- Reações de amplificação com os ‘primers’ OPG19 e OPG08, sendo M: marcador de 1 kb; C: tangerina-‘Cravo’; e P: laranja-‘Pêra’. As setas indicam os marcadores RAPDs.

TABELA 1- Número de fragmentos RAPDs amplificados e polimórficos entre tangerina-‘Cravo’ (*C. reticulata* Blanco) e laranja-‘Pêra’ (*C. sinensis* (L.) Osbeck), para 113 ‘primers’.

‘Primer’	Número de fragmentos			‘Primer’	Número de fragmentos				
	Amplificados	Polimórficos			Amplificados	Polimórficos			
		Forte	Moderado			Total	Forte	Moderado	Total
OPA01	4	0	1	1	OPC19	12	0	1	1
OPA04	7	1	0	1	OPC20	8	2	0	2
OPA05	9	1	0	1	OPD10	4	1	0	1
OPA07	10	6	0	6	OPD11	7	2	0	2
OPA08	11	5	0	5	OPD15	15	1	0	1
OPA09	8	3	0	3	OPE04	10	1	0	1
OPA10	6	0	1	1	OPE06	9	2	0	2
OPA11	7	1	0	1	OPE15	10	1	0	1
OPA12	6	1	0	1	OPE16	7	3	0	3
OPA15	5	1	0	1	OPE18	11	1	0	1
OPA19	9	2	0	2	OPE19	9	1	0	1
OPAB04	5	1	1	2	OPE20	7	0	2	2
OPAB05	6	1	0	1	OPG08	4	1	0	1
OPAB06	9	2	0	2	OPG10	6	1	1	2
OPAB07	10	2	0	2	OPG13	11	2	2	4
OPAB08	7	0	2	2	OPG17	12	3	2	5
OPAB13	7	1	0	1	OPG18	8	2	0	2
OPAB14	7	2	0	2	OPG19	10	2	0	2
OPAB15	4	1	0	1	OPH01	8	2	0	2
OPAB17	8	1	0	1	OPH02	5	1	0	1
OPAB18	5	0	1	1	OPH15	11	1	1	2
OPAT04	3	1	0	1	OPH16	6	2	0	2
OPAT05	9	1	0	1	OPH19	9	3	0	3
OPAT07	13	3	0	3	OPH20	8	1	0	1
OPAT13	7	2	0	2	OPM07	16	4	0	4
OPAT14	8	2	0	2	OPM11	10	3	0	3
OPAT18	9	2	0	2	OPM13	12	0	1	1
OPAV02	7	1	0	1	OPN05	6	1	0	1
OPAV03	8	0	1	1	OPN08	9	2	0	2
OPAV05	6	2	0	2	OPN09	8	1	0	1
OPAV08	8	1	0	1	OPN14	7	3	1	4
OPAV12	8	1	2	3	OPN15	9	4	0	4
OPAV16	9	2	0	2	OPN16	7	1	0	1
OPB02	8	2	0	2	OPP01	9	1	0	1
OPB03	6	2	0	2	OPP05	8	2	0	2
OPB04	6	1	0	1	OPP06	8	2	0	2
OPB05	8	2	0	2	OPP09	9	4	0	4
OPB08	12	2	0	2	OPP10	6	2	0	2
OPB09	6	2	0	2	OPP11	4	1	0	1
OPB10	5	1	0	1	OPP12	5	2	0	2
OPB11	9	1	0	1	OPP18	7	2	0	2
OPB12	10	1	0	1	OPP20	4	1	0	1
OPB13	4	1	0	1	OPQ04	8	1	0	1
OPB14	6	1	0	1	OPQ05	11	1	2	3
OPB17	5	1	0	1	OPQ06	6	2	1	3
OPB19	8	2	0	2	OPQ07	3	1	0	1
OPB20	4	1	1	2	OPQ08	6	1	0	1
OPC01	2	1	0	1	OPQ10	5	1	0	1
OPC03	7	3	0	3	OPQ15	10	2	1	3
OPC05	11	2	0	2	OPQ17	7	0	1	1
OPC06	6	2	1	3	OPR07	14	1	0	1
OPC07	4	1	0	1	OPR09	9	1	0	1
OPC09	7	1	0	1	OPR19	10	2	0	2
OPC10	4	1	0	1	OPU03	10	1	0	1
OPC13	6	1	1	2	OPU05	16	0	1	1
OPC14	5	1	1	2	OPU08	8	1	0	1
OPC18	1	1	0	1	Total	869	171	30	201

por ‘primer’, ao trabalharem com tangerinas e mexericas. O número de bandas amplificadas normalmente é função da espécie, do ‘primer’ e das condições da amplificação (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Para os parentais estudados, foram selecionados 113 ‘primers’ que produziram fragmentos polimórficos, com número de marcadores variando de 1 a 6 por ‘primer’. Esses ‘primers’ amplificaram 869 bandas, sendo 201 (23,13%) polimórficas, com tamanho variando de 261 a 2961 pb (Figura 1). O número médio de marcadores por ‘primer’ foi de 1,78. A frequência de ‘primers’ polimórficos com 1; 2; 3; 4; 5 e 6 marcadores foi de 49,5%, 33,6%, 9,7%, 4,4%, 1,8% e 1,0%, respectivamente (Tabela 1).

Vários trabalhos visando a selecionar ‘primers’ e marcadores RAPDs foram feitos com outras espécies de *Citrus* e gêneros correlacionados. Simone et al. (1998) trabalharam com

C. aurantium e *C. latipes*, e Cristofani et al. (1999) com *C. sunki* e *Poncirus trifoliata* obtendo, respectivamente, 1,42 e 2,18 marcadores RAPDs por ‘primer’ selecionado. Nesses trabalhos, as diferenças ocorreram, principalmente, em função da composição genética das espécies estudadas.

Em reações RAPDs, normalmente, são amplificados fragmentos entre 500 e 2500 pb (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Neste trabalho, 90,5% dos marcadores ocorreram nesse intervalo. Cai et al. (1994), Coletta Filho et al. (1998) e Cristofani et al. (1999) obtiveram fragmentos polimórficos de tamanho entre 200 e 3000 pb, ao trabalharem com mais de uma centena de marcadores RAPDs em citros.

Do total de marcadores selecionados, 85,1% (171) apresentaram intensidade e nitidez acentuadas nos géis de agarose e 14,9% (30), moderadas; todos sendo recomendados

TABELA 2- Marcadores RAPDs selecionados em tangerina-‘Cravo’ (*C. reticulata* Blanco), laranja-‘Pêra’ (*C. sinensis* (L.) Osbeck) e seus híbridos.

‘Kit’ Operon	Marcadores RAPD (Intensidade e nitidez das bandas amplificadas)	
	Forte	Moderada
A	A4-717; A5-1405; A7-1556; A7-1399; A7-1261; A7-1201; A7-868; A7-643; A8-2011; A8-769; A8-580; A8-497; A8-341; A9-1189; A9-803; A9-628; A11-495; A12-2082; A15-2373; A19-2743; A19-647	A1-678; A10-2015
AB	AB4-1226; AB5-1308; AB6-1268; AB6-655; AB7-1446; AB7-998; AB13-1674; AB14-1511; AB14-767; AB17-555	AB4-1053; AB8-1615; AB8-1544; AB18-1357
AT	AT4-750; AT5-484; AT7-2688; AT7-1476; AT7-620; AT13-1432; AT13-986; AT14-2115; AT14-846; AT18-1053; AT18-897	
AV	AV2-1107; AV5-1626; AV5-1555; AV8-822; AV12-1495; AV16-1379; AV16-1291	AV3-1308; AV12-1987; AV12-1840
B	B2-1156; B2-709; B3-1778; B3-1698; B4-1650; B5-1350; B5-939; B9-1065; B8-1484; B8-611; B9-761; B10-1986; B11-2037; B12-813; B13-1832; B14-2456; B17-2053; B19-1730; B19-1571; B20-1515	B20-2457
C	C1-1933; C3-809; C3-762; C3-690; C5-1427; C5-1232; C6-866; C6-652; C7-1779; C9-2479; C10-512; C13-1821; C14-2432; C18-854; C20-1071; C20-723	C6-1076; C13-1576; C14-1853; C19-1569
D	D10-522; D11-1203; D11-819; D15-1838	
E	E4-1397; E6-1130; E6-923; E15-1611; E16-2267; E16-1967; E16-805; E18-627; E19-1282	E20-1889; E20-576
G	G8-623; G10-1416; G13-2277; G13-327; G17-1807; G17-1101; G17-459; G18-1871; G18-1010; G19-1261; G19-1203	G10-1090; G13-2945; G13-1384; G17-2259; G17-841
H	H1-1922; H1-742; H2-1633; H15-335; H16-1349; H16-705; H19-1673; H19-1584; H19-1107; H20-607	H15-1014
M	M7-1498; M7-1426; M7-554; M7-438; M11-1421; M11-1207; M11-379	M13-1189
N	N5-1249; N8-1987; N8-1362; N9-533; N14-379; N14-295; N14-261; N15-1535; N15-1011; N15-612; N15-597; N16-1697	N14-1386
P	P1-1020; P5-1444; P5-1381; P6-1339; P6-412; P9-1692; P9-1435; P9-1014; P9-450; P10-2261; P10-1366; P11-1408; P12-1153; P12-683; P18-1145; P18-903; P20-635	
Q	Q4-608; Q5-1750; Q6-1456; Q6-738; Q7-677; Q8-657; Q10-747; Q15-1216; Q15-416	Q5-2961; Q5-2557; Q6-690; Q15-1643; Q17-1822
R	R7-1565; R9-483; R9-483; R19-2103; R19-1027	
U	U3-1107; U8-783	U5-711

para análises do genoma de tangerina-‘Cravo’, laranja-‘Pêra’ e seus híbridos (Tabela 2). As bandas polimórficas de intensidade e nitidez fracas não foram consideradas para evitar interpretações ambíguas. Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), bandas pouco consistentes ocorrem com todos os tipos de marcadores moleculares, sendo atribuídas, em ensaios RAPDs, ao baixo poder de o ‘primer’ discriminar sítios de amplificação distintos, à competição entre diferentes sítios de amplificação por substrato e enzima, e à problemas na padronização das condições de amplificação.

Os marcadores RAPDs descritos nas Tabelas 1 e 2 podem ser utilizados para a seleção precoce de híbridos, obtenção de ‘fingerprints’, estudos de diversidade genética e construção de mapas genéticos. Os ‘primers’ que apresentaram quatro (OPG13, OPM07, OPN14, OPN15 e OPP09), cinco (OPA08 e OPG17) e seis (OPA07) bandas polimórficas apresentam grande aplicabilidade na seleção precoce de híbridos entre tangerina-‘Cravo’ e laranja-‘Pêra’, pois permitem a seleção mais eficiente da maior parte dos híbridos com apenas uma única reação de amplificação, contornando as limitações relacionadas à natureza dominante dos marcadores RAPDs. Uma vez que Simone et al. (1998) e Cristofani et al. (1999) construíram mapas moleculares de espécies de citros, respectivamente, com 157 e 169 marcadores RAPDs e conseguiram localizar genes de interesse agrônômico nesses mapas, espera-se que os 201 marcadores selecionados possam ser suficientes para a mesma finalidade.

CONCLUSÕES

1. A utilização de DNA de boa qualidade, extraído por método CTAB, e a padronização das condições da PCR possibilitam a

obtenção de reações de RAPD com elevada reprodutibilidade, mesmo em diferentes termocicladores.

2. Marcadores RAPDs consistentes foram obtidos entre os parentais tangerina-‘Cravo’ e laranja-‘Pêra’ utilizando diferentes ‘primers’, que estão sendo utilizados para a seleção precoce de híbridos zigóticos, estudos de diversidade genética e construção de mapas genéticos de ligação.

3. Os ‘primers’ que amplificam um maior número de marcadores RAPDs são os menos freqüentes; existem ‘primers’ que amplificam até seis bandas polimórficas entre os parentais tangerina-‘Cravo’ e laranja-‘Pêra’.

4. Nas reações de amplificação do DNA de tangerina-‘Cravo’ e laranja-‘Pêra’, a proporção de bandas polimórficas em relação às monomórficas é de, aproximadamente, 1:4 para os ‘primers’ selecionados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAI, Q.; GUY, C.L.; MOORE, G.A. Extension of the linkage map in *Citrus* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.89, p.606-614, 1994.

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

CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance

- gene. **Euphytica**, Wageningen, v.109, p.25-32, 1999.
- CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K. Análise de RAPD. In: MILACH, S.C.K. (Ed.), **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre, 1998. p.107-116.
- DENG, Z.N.; GENTILE, A.; NICOLOSI, E.; DOMINA, F.; VARDI, A.; TRIBULATO, E. Identification of *in vivo* and *in vitro* lemon mutants by RAPD markers. **Journal of Horticultural Sciences**, Ashford, v.70, p.117-125, 1995.
- FEDERICI, C.T.; FANG, D.Q.; SCORA, R.W.; ROOSE, M.L. Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.96, p.812-822, 1988.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- GMITTER, F.G.; XIAO, S.Y.; HUANG, S.; HU, X.L.; GARNSEY, S.M.; DENG, Z. A localized linkage map of the virus tristeza virus resistance gene region. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.92, p.688-695, 1996.
- KEIL, M.; GRIFFIN, A.R. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.89, p.442-450, 1994.
- MACHADO, M.A.; COLETTA FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; POMPEU Jr., J. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v.92, p.321-326, 1996.
- MACHADO, M.A.; SILVERIO, J.L.; BAPTISTA, C.R.; LARANJEIRA, F.F.; BERETTA, M.J.G. Avaliação de transmissão e seleção de variedades à clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.14, n.1, p.167-176, 1993.
- MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v.8, p.4321-4325, 1980.
- OLIVEIRA, R.P.; NOVELLI, V.M.; MACHADO, M.A. Frequência de híbridos em cruzamento entre tangerina-‘Cravo’ e laranja-‘Pêra’: análise de marcadores morfológicos e RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.9, p.1895-1903, 2000.
- SAMBROOK, J.; FRISTSH, E.F.; MANIATS, T. **Molecular cloning**; a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- SIMONE, M.D.; RUSSO, M.P.; PULEO, G.; MARSAN, P.A.; LORENZONI, C.; MAROCCO, A.; RECUPERO, G.R. Construction of genetic maps for *Citrus aurantium* and *C. latipes* based on AFLP, RAPD and RFLP markers. **Fruits**, Paris, v.53, p.383-390, 1998.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.