

CARACTERIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Citrus* spp. ATRAVÉS DE MARCADORES RAPD

CHARACTERIZATION OF CITRUS GENOTYPES (*Citrus* spp) USING RAPDs MARKERS

Marinês Bastianel¹ Ana Lúcia Cunha Dornelles¹ Marcos Antonio Machado² Ester Wickert¹
Simone de Farias Maraschin¹ Helvécio Della Coletta Filho² Gilmar Schäfer¹

RESUMO

Em programas de melhoramento de citros, a caracterização adequada dos recursos genéticos disponíveis é de grande importância, principalmente devido às características biológicas da cultura, como a heteroziguidade, a embrião nucelar e o longo ciclo reprodutivo. A facilidade com que ocorrem hibridações (interespecíficas e intergenéricas) e a embrião nucelar favoreceram a formação e a preservação de novas combinações, classificadas como espécies. Neste estudo, marcadores RAPDs foram utilizados para analisar 15 acessos de *Citrus* spp., sendo quatro variedades de laranjeiras doce (*C. sinensis* Osbeck), quatro tangerineiras (*C. reticulata* Blanco, *C. nobilis* Loureiro, *C. sunki* Loureiro e *C. deliciosa* Tenore), uma laranjeira azeda (*C. aurantium* L.), um pomeleiro (*C. paradisi* Macf.), uma torangeira (*C. grandis* Osbeck), uma cidreira (*C. medica* L.), uma limeira ácida (*C. latifolia*) e dois híbridos (*Citrus clementina* T. x *C. tangerina* T. x *C. paradisi* Macf.). Doze sequências iniciadoras aleatórias foram utilizadas para estudar os 15 genótipos, encontrando-se um grau de similaridade mínimo de 0,81 ("Simple Matching") entre as tangerineiras. Os menores graus de similaridade foram encontrados entre as espécies de *Citrus* menos aparentadas (*C. medica*, *C. grandis* e *C. latifolia*). As quatro cultivares de laranjeiras doces não puderam ser diferenciadas pelos marcadores RAPD utilizados, apresentando similaridade máxima.

Palavras-chave: *Citrus*, melhoramento, diversidade.

SUMMARY

In citrus improvement programs the characterization of the available genetic resources is of great importance, mainly concerning biological characteristics of the culture, as the heterozygosity, nucellar the embryo and long reproductive cycle. Favored by nucellar embryo interspecific and intergeneric hybridizations and genotypes preservation happen easily. RAPDs markers were used to analyze 15 *Citrus* spp., four sweet orange (*C. sinensis* Osbeck), (*C. medica*, *C.*

grandis e *C. latifolia*), four mandarins (*C. reticulata* Blanco, *C. nobilis* Loureiro, *C. sunki* Loureiro e *C. deliciosa* Tenore), a sour orange (*C. aurantium* L.), a grapefruit (*C. paradisi* Macf.), a pummelo (*C. grandis* Osbeck), a cidra (*C. medica* L.), a lime (*C. latifolia*) and two hybrids (*Citrus clementina* T. x *C. tangerina* T. x *C. paradisi* Macf.). Genetic similarities of 15 *Citrus* genotypes obtained with twelve random primers, indicated a minimum similarity degree of 0.81 (simple matching) among the mandarins. Lower similarity degrees were obtained among less related *Citrus* species (*C. medica*, *C. grandis* e *C. latifolia*). The four varieties of sweet oranges (*C. sinensis* Osbeck) could not be differentiated by RAPD markers, showing maximum similarity.

Key words: *Citrus*, breeding, diversity.

INTRODUÇÃO

Os citros apresentam uma taxonomia muito complexa, principalmente com relação ao número de espécies que constituem o gênero *Citrus* e gêneros correlacionados. É possível que a grande diversidade observada entre as plantas cítricas cultivadas, responsável pela sua complexa taxonomia, seja oriunda de mutações e de alterações cromossômicas estruturais ancestrais, preservada através da embrião nucelar (IWAMASA & NITO, 1988). Muitos biótipos, classificados como espécies podem ter sido originados de hibridizações interespecíficas. A embrião nucelar foi provavelmente responsável pela preservação destes híbridos, possibilitando um isolamento reprodutivo destas novas combinações (CAMERON & FROST, 1968).

¹ Departamento de Horticultura e Silvicultura, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CP 776, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil. Correspondências para Ana Lúcia Cunha Dornelles. E-mail: alcunha@vortex.ufrgs.br

² Centro de Citricultura Sylvio Moreira, IAC, Cordeirópolis, SP, Brasil.

Vários sistemas de taxonomia para o gênero *Citrus* têm sido propostos. Esses sistemas diferem principalmente quanto ao número de espécies que compõem os vários gêneros. Hoocher, de acordo com a revisão de SWINGLE & REECE (1967), em 1875 classificou o gênero *Citrus* em somente quatro espécies, enquanto Engler, em 1931, propôs 11 espécies para o gênero e Swingle, em 1943, subdividiu o gênero *Citrus* em dois subgêneros: *Papeda* e *Citrus*, com 16 espécies. Tanaka, citado por SCORA (1975), em 1961 propôs a existência de 159 espécies para os citros. Essas diferenças com relação ao número de espécies deveram-se ao fato de que Swingle considera muitos dos representantes desse grupo como híbridos, enquanto Tanaka os considera como espécies verdadeiras.

Embora estes dois últimos sistemas de classificação tenham sido os mais utilizados na sistemática dos *Citrus*, vários autores sugerem números de espécies diferentes daqueles propostos por Swingle e Tanaka, baseados em estudos químicos, bioquímicos, morfológicos e moleculares (BARRET & RHODES, 1976; HANDA *et al.*, 1986; GREEN *et al.*, 1986).

BARRET & RHODES (1976), estudando a morfologia das plantas, sugeriram, baseados em 146 marcadores, a existência de três grupos de importância comercial em *Citrus*: O grupo de *Citrus medica* L. (*C. medica* L., *C. aurantifolia* L. e *C. limon* Burm.f.), o grupo de *Citrus reticulata* Blanco (*C. reticulata* Blanco, *C. sinensis* L. Osbeck, *C. paradisi* Marcf., *C. aurantium* L. e *C. jambhiri* Lush.) e o grupo *C. grandis* (L.) Osbeck.

Estudos da Fração I das proteínas de folhas também levaram HANDA *et al.* (1986) a considerarem que *Citrus medica* L., *C. reticulata* Blanco e *C. grandis* (L.) Osbeck são as espécies originais dos citros. Estes resultados foram apoiados por estudos com isoenzimas e marcadores baseados em DNA (GREEN *et al.*, 1986; TORRES *et al.*, 1978; ROOSE, 1988; LURO *et al.*, 1992; YAMAMOTO *et al.*, 1993, COLETTA FILHO *et al.*, 1998).

Em citros, marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados em um grande número de espécies para fins de caracterização de germoplasmas, estudos taxonômicos e filogenéticos, mapeamento e identificação de mutantes, entre outros (LURO *et al.*, 1992; CAI *et al.*, 1994; LURO *et al.*, 1995; MACHADO *et al.* 1996; BASTIANEL *et al.*, 1998; COLETTA FILHO *et al.*, 1998).

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização de 15 genótipos de citros, presentes na coleção de citros da Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA/UFRGS), em Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul (Brasil) com a utilização do marcador molecular RAPD.

MATERIAIS E MÉTODOS

As plantas utilizadas no presente estudo pertencem à coleção de citros da EEA/UFRGS (Tabela 1). Aproximadamente 100mg de folhas jovens foram coletadas de cada planta para a análise RAPD.

Extração do DNA total

O DNA total foi extraído segundo metodologia descrita por MURRAY & THOMPSON (1980), e utilizada por BASTIANEL *et al.* (1998). A quantificação e a qualificação do DNA genômico foram efetuadas segundo metodologia descrita por SAMBROOK *et al.* (1989).

Reações de amplificação e eletroforese

As reações de amplificação foram preparadas em um volume de 12,3µl contendo: 1,3µl de tampão 10x (100mM Tris-HCl PH 8,3; 500mM KCl; 20mM de MgCl₂ e 0,01% de gelatina); 200mM de cada nucleotídeo dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Gibco); 15ng da sequência iniciadora de 10 nucleotídeos (Operon), 15ng do DNA genômico e 1,5 unidades da enzima *Taq* polimerase (Cembiot/RS). 15µl de óleo mineral (Sigma) foi adicionado para evitar evaporação.

Tabela 1 - Genótipos presentes na coleção de citros da EEA/UFRGS que foram utilizados para análises RAPD.

Nome científico segundo TANAKA (1954)	Nome comum
<i>Citrus clementina</i> x (<i>C. tangerina</i> x <i>C. paradisi</i>)	Tangerineira 'Lee'
<i>Citrus reticulata</i>	Tangerineira 'Ponkan'
<i>C. nobilis</i>	Tangerineira 'de Umbigo'
<i>C. aurantium</i>	Laranjeira azeda
<i>C. paradisi</i>	Pomeleiro 'Foster'
<i>C. sinensis</i>	Laranjeira 'Caipira'
<i>C. latifolia</i>	Limeira ácida 'Tahiti'
<i>C. sunki</i>	Tangerineira 'Sunki'
<i>C. medica</i>	Cidreira 'of Commerce'
<i>C. grandis</i>	Toranjera 'Paraíso'
<i>C. sinensis</i>	Laranjeira 'Valência'
<i>Citrus clementina</i> x (<i>C. tangerina</i> x <i>C. paradisi</i>)	Tangerineira 'Osceola'
<i>C. sinensis</i>	Laranjeira 'Cipó'
<i>C. sinensis</i>	Laranjeira 'Pera do Rio'
<i>C. deliciosa</i>	Tangerineira 'Cai'

A amplificação foi conduzida em termocicladores MJ Research Thermocycler, programados para 36 ciclos de um minuto a 92°C, um minuto a 36°C e dois minutos a 72°C, acrescidos de 10 minutos a 72°C ao final do último ciclo.

Os padrões de amplificação foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídeo (0,5ng/ml) e fotografado no sistema Eagle eye (STRATAGENE).

Análise dos dados

O grau de similaridade entre os genótipos foi estimado através da presença ou ausência de bandas (polimórficas e monomórficas). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com o marcador 1Kb DNA ladder. O peso molecular das bandas obtidas nas duas análises foi estimado com o uso do software GEL (SCHAFFER & SEDEROFF, 1989). Os dados foram analisados utilizando-se o sistema de taxonomia numérica e análise multivariada NTSYS (Numerical Taxonomia and Multivariate Analysis System) - versão 1.7 (ROHLF, 1992). A matriz de similaridade foi gerada usando o coeficiente SM ("Simple Matching") e o dendrograma construído pelo método UPGMA ("Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average").

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os doze oligonucleotídeos iniciadores utilizados produziram um total de 85 bandas, sendo 64 polimórficas. A relação dos "primers" utilizados, bem como do número de fragmentos monomórficos e polimórficos produzidos, foram mostrados na tabela 2. Os fragmentos amplificados variaram de 300 a 3000 pares de bases.

Números diferentes de fragmentos polimórficos por oligonucleotídeo iniciador foram obtidos, variando de três (OPAB03 e OPAB05) a 10 fragmentos (OPM06) (Tabela 2). Este alto número de polimorfismo por oligonucleotídeo iniciador possivelmente tenha ocorrido devido à distância genética dos materiais estudados, tendo em vista que as três espécies consideradas por muitos autores como as espécies ancestrais dos citros (*C. medica* L., *C. grandis* [L] Osbeck e *C. reticulata* Blanco) estão incluídas neste estudo.

Marcadores espécie-específicos foram encontrados para a toranja (OPAB03_1063pb; OPN20_2168pb; e OPI11_873pb; limeira ácida 'Tahiti' (OPM06_395pb); pomeleiro (OPM06_663pb;

Tabela 2 - Relação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e número de bandas geradas por oligonucleotídeo iniciador na análise genética de 15 genótipos de citros.

Oligonucleotídeo iniciador	Seqüência	Fragmentos amplificados	Fragmentos polimórficos
OPAB02	5' CCGTCGGTAG 3'	06	05
OPAB03	5' TGGCGCACAC 3'	04	03
OPAB04	5' GGCACGCGTT 3'	09	07
OPAB05	5' CCCGAAGCGA 3'	05	04
OPB12	5' CCTTGACGCA 3'	09	07
OPG10	5' AGGGCCGTCT 3'	04	03
OPH04	5' GGAAGTCGCC 3'	07	07
OPH09	5' TGTAGCTGGG 3'	07	04
OPI11	5' ACATGCCGTG 3'	10	06
OPI12	5' AGAGGGCACA 3'	05	04
OPM06	5' CTGGGCAACT 3'	14	10
OPN20	5' GGTGCTCCGT 3'	05	04
Total		85	64

OPAB05_857pb; OPAB04_663pb); cidreira (AB05_1439pb; OPH04_2441pb), laranja azeda (OPH04_1303pb) e para a tangerineira 'Ponkan' (OPN20_872pb).

Os marcadores genéticos OPI11_934pb, OPB12_1391pb e OPB12_756pb foram encontrados nas laranjeiras doce, azeda e pomeleiro 'Foster' e também esteve presente na toranja. Esta similaridade sugere um parentesco entre estas espécies. SCORA (1975) e BARRET & RHODES (1976) sugeriram que estas espécies tenham a toranja (*Citrus grandis* [L] Osbeck) como espécie ancestral. Estes autores consideram que as laranjeiras doce (*C. sinensis* Osbeck) e a laranja azeda (*C. aurantium* L.) sejam híbridas de toranja (*C. grandis*) e tangerineiras (*C. reticulata* Blanco), enquanto o pomeleiro (*C. paradisi* Macf.) é considerado um provável híbrido de *C. sinensis* e *C. grandis*. Os marcadores OPAB02_2058pb presente nas laranjeiras, pomeleiro e em *C. reticulata*; OPAB2_2217pb presente nas laranjeiras, pomeleiro e nas tangerineiras e OPH09_1465pb presentes nas laranjeiras e em *C. grandis*, também apóiam estes resultados.

Os marcadores OPB12_1058pb e OPM06_324pb comuns à limeira ácida 'Tahiti' (*C. aurantifolia* Swing.) e à cidreira (*C. medica* L.); e os marcadores OPI11_934pb e OPG10_575pb comuns ao 'Tahiti' e à toranja (*C. grandis*) como sugerem a origem híbrida da lima ácida Tahiti, tendo a cidreira e a toranja como possíveis parentais. O marcador OPM06_395pb, específico para a limeira ácida Tahiti e não encontrado na toranja e cidreira, possivelmente é oriundo de um terceiro ancestral, como sugerido por SCORA (1975) e BARRET & RHODES (1976) que atribuíram uma

origem híbrida composta por três espécies para as limeiras ácidas (*C. grandis*, *C. medica* e uma espécie do gênero *Microcitrus*).

O agrupamento dos coeficientes SM pelo método UPGMA resultou no dendrograma (Figura 1), onde os genótipos estudados foram separados em dois grandes grupos: grupo A formado pelas tangerineiras (Lee, Sunki, Ponkan, de Umbigo, Cai e Osceola); pomeleiro Foster, laranjeiras doce (Caipira, Valência, Pera do Rio e Cipo) e laranjeira Azeda e o grupo B formado pela limeira ácida Tahiti, cidreira Of Comercio e toranjeira Paraíso. As laranjeiras doce e azeda, bem como a pomeleiro consideradas híbridas por alguns autores (SCORA, 1975; BARRET & RHODES, 1976) formaram subgrupo intermediário dentro do grupo A.

Dentro do grupo das tangerineiras, o coeficiente de similaridade mínimo foi de 0,81 (Figura 1), indicando um alto grau de similaridade genética entre os genótipos deste grupo. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por COLETTA FILHO *et al.* (1998) que, ao utilizarem RAPDs para comparar diferentes genótipos de tangerineiras, encontraram índices de similaridade (Jaccard) superiores a 0,77. As tangerineiras 'Caf' (*C. deliciosa* Tenore) e 'De Umbigo' (*C. nobilis* Loureiro) foram as espécies deste grupo que apresentaram maior grau de similaridade genética (0,90).

Estudos genéticos têm sugerido que as tangerineiras são muito próximas entre si. TORRES *et al.* (1978) observaram baixo nível de polimorfismo de quatro locos isoenzimáticos entre 33 cultivares de tangerinas. MACHADO *et al.* (1996) encontraram baixo polimorfismo RAPD entre acessos de tangerinas do Mediterrâneo (*C. deliciosa*

Tenore) sugerindo que este grupo é híbrido de tangerineira comum (*C. reticulata* Blanco). Estes autores sugeriram que hibridações e mutações possivelmente foram fatores importantes na evolução destas espécies sendo responsáveis pela grande diversidade fenotípica e genética encontrada neste grupo.

Da mesma forma, SAWAZAKI *et al.* (1992) analisando 7 sistemas enzimáticos encontraram diferenças entre as tangerineiras 'Clementina' e 'Ponkan' em relação a 'Sunki' e a 'Cleópatra', apesar do baixo número de alelos por loco e baixa heterozigosidade, confirmando que a diversidade varietal das tangerineiras é devida a hibridações.

As tangerineiras 'Lee' e 'Osceola', híbridos resultantes de um mesmo cruzamento (HODGSON, 1967), apresentaram 81% de similaridade genética. Apesar de ser um alto índice de similaridade, este valor foi inferior ao encontrado entre estas e outros genótipos de tangerinas, possivelmente devido à heterozigose das espécies genitoras destas duas variedades híbridas.

Uma maior dissimilaridade genética foi encontrada entre as espécies *C. medica* (cidreira Of Comercio), *C. grandis* (toranjeira Paraíso) e *C. latifolia* (limeira ácida Tahiti) (Figura 1). O coeficiente entre o grupo das tangerineiras e as outras duas espécies verdadeiras dos citros (*C. medica* e *C. grandis*) foi próximo de 0,6. Este índice foi superior ao índice de 0,27 encontrado por COLETTA FILHO *et al.* (1998). Esta diferença, possivelmente, deve-se ao coeficiente de similaridade utilizado neste trabalho, que considera as ausências de fragmentos como evidências de homologia e fornecem informações equivalentes as comparações presença/ausência.

Os quatro cultivares de *Citrus sinensis* analisados ('Caipira', 'Valência', 'Cipó' e 'Pera do Rio') apresentaram similaridade máxima (100%) mostrando que os oligonucleotídeos iniciadores utilizados não foram eficientes para detectar diferenças genéticas dentro desta espécie. O grau de similaridade encontrado neste estudo para as laranjeiras doce, que não permite a diferenciação entre os quatro cultivares analisados, está de acordo com aqueles encontrados por outros autores em estudos de diversidade genética para a espécie, com isoenzimas e marcadores moleculares (SAWAZAKI *et al.*, 1992; LURO *et al.*, 1995). As laranjeiras doce (*C. sinensis*. Osbek) apresentam uma estreita base genética, visto que, provavelmente a laranjeira doce seja um híbrido interespecífico (SCORA, 1975;

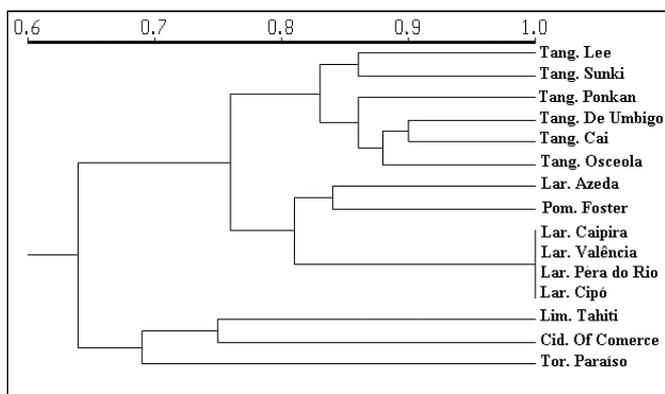


Figura 1 – Análise de agrupamento pelo método UPGMA ("Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average") entre genótipos presentes na coleção de citros da EEA/UFRGS (Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

BARRET & RHODES, 1976) e a proliferação da maioria das variedades comerciais ocorreu pela seleção de mutações somáticas (HODGSON, 1967). SAWAZAKI *et al.* (1992), analisando sete sistemas enzimáticos para caracterizar espécies de citros de laranjeiras, tangerineiras, limeiras, limoeiros e *Poncirus* encontraram grande variabilidade genética interespecífica, porém não encontraram nenhuma variedade entre os cultivares de laranja doce ('Hamlin', 'Natal', 'Valência', 'Pineapple', 'Ruby', 'Moro' e 'Pera'). Segundo estes autores, a ausência de identificação pelas isoenzimas entre variedades de *C. sinensis*, apesar do número médios de alelos por loco e alta heteroziguidade, sugere que a origem da diversidade varietal pode ter sido decorrente de mutações.

Similarmente, LURO *et al.* (1995) usaram "primers" VNTR-PCR para avaliar a diversidade genética em tangerineiras e laranjeiras e não encontraram diferenças entre as 10 cultivares de laranja doce (*C. sinensis*) analisadas. Esses autores utilizaram minisatélites como oligonucleotídeo iniciador para avaliar a diversidade genética em laranjeiras doce, mas as sequências utilizadas não foram eficientes para detectar possíveis mutações responsáveis pela ampla variação presente nesta espécie.

Desta forma, os marcadores RAPDs utilizados neste trabalho, também não foram eficientes para distinguir variedades de laranjeiras doce. A discriminação de materiais muito aparentados, no entanto, pode ser alcançado quando se aumenta o número de bandas polimórficas, por meio do uso de um número maior de "primers" (WELSH *et al.*, 1991; FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1995). Possivelmente, a utilização de um maior número de "primers", ou de outros marcadores moleculares, como microsátélites e AFLP aumentariam a probabilidade de se encontrar em sítios específicos das possíveis mutações de ponto ocorridas nesta espécie.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPERGS/RS e ao CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRET, H.C., RHODES, A.M. A numerical study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Systematic Botany*, Kent, v.1, p.105-136, 1976.
- BASTIANEL, M., SCHWARZ, S.F., COLETA FILHO, H.D., *et al.* Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus spp.*) using RAPD. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.21, n.1, p.123-127, 1998.
- CAI, Q., GUY, C.L., MOORE, G.A. Extension of the linkage map in citrus using Random Amplified Polymorphic DNA e RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, n.89, p.606-614, 1994.
- CAMERON, J.W., FROST, H.B. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: REUTHER, W., BATCHELOR, L.D., WEBBER, H.J. (Eds). *The citrus industry*. VI Berkeley: University of California, 1968. V.2. p.325-370.
- COLETTA FILHO, H.D., MACHADO, M.A., TARGON, M.L. P.N., *et al.* Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus spp.*) using RAPD markers. *Euphytica*, Berlin. n.102, p.133-139, 1998.
- FERREIRA, M.E., GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, 1995. 220p.
- GREEN, R.M., VARDI, A., GALUN, E. The plastome of *Citrus*. Physical map, variation among Citrus and species and comparison with related genera. *Theoretical Applied Genetics*, Berlin, n.72, p.170-177, 1986.
- HANDA, T., ISHIZAWA, Y., OOGAKI, C. Phylogenetic study of fraction I protein in the genus *Citrus* and its close related genera. *Japan Journal of Genetics*, Tokyo, n.61, p.15-24, 1986.
- HODGSON, R.W. Horticultural varieties of citrus. In: REUTHER, W., BATCHELOR, L.D., WEBBER, H.J. (Eds). *The citrus industry*. VI Berkeley: University of California. 1967. p.431-591.
- IWAMASA, M., NITO, N. Cytogenetics and the evolution of modern cultivated *Citrus*. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 6., 1988, Tel Aviv. *Proceedings...* Tel Aviv: International Society of Citriculture, 1988. v.1, p. 165-275.
- LURO, F., BOVÉ, J.M., OLLITRAULT, P. DNA Amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in *Citrus*. *HortScience*, Alexandria, v.30, n.5, p.1063-1067, 1995.
- LURO, F., LAIGRET, F., BOVÉ, J.M. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to *Citrus* genetic and taxonomy. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7, Italy, 1992. *Proceedings...* Italy: International Society of Citriculture, 1992. V.1, p.225-228.
- MACHADO, M.A., COLETTA FILHO, H.D., TARGON, M.L.P.N., *et al.* Genetic relationships of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. *Euphytica*, Berlin, n.92, p.321-326, 1996.
- MURRAY, M.G., THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, n.8, p.432-435, 1980.
- ROHLF, F.J. **NTSYS - PC numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 1.7. New York: State University of New York, 1992.
- ROOSE, M.L., TRAUGH, S.N. Identification and performance of Citrus trees on nucellar and zygotic rootstocks. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.113, n.1, p.100-105, 1988.

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. Não paginado.
- SAWAZAKI, H.E., SODEK, L., PIO, R.M. *et al.* Identificação de espécies de citros mediante polimorfismo enzimático. **Bragantia**, Campinas, v.51, n.2, p.121-128, 1992.
- SCHAFFER & SEDEROFF. **Annal Biochem**, n.115. p.113-122. 1989.
- SCORA, R.W. On the history and origin of citrus. **Bulletins of the Torrey Botanical Club**, v.102, n.6, p.396-375, 1975.
- SWINGLE, W.T, REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W., BATCHELOR, L.D., WEBBER, H.J. (Eds). **The citrus industry**. Berkeley : University of California, 1967. p.190-430.
- TANAKA, T. Species problems in *citrus*. Tokyo : Japanese Society for the Promotion of Science, 1954. 152p.
- TORRES, A.M., SOOST, R.K, DIEDENHOFEN, U. Leaf isozymes as genetic markers in *citrus*. **American Journal of Botany**, n.65, p.869-881, 1978.
- WELSH, J. HONEYCUTT, R.J., McCLELLAND, M. *et al.* Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). **Theoretical Applied Genetics**, Berlin. n.82, p.473-476, 1991.
- YAMAMOTO, M., KOBAYASHI, S, NAKAMURA, Y., *et al.* Phylogenic J. Citrus revealed by RFLP analysis of mitochondrial and chloroplast DNA. **Japanese Journal Breeding**, Tokyo, n.43, p.355-365, 1993.

Ciência Rural, v. 31, n. 5, 2001.