

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS**

**Homeologia e evolução dos cromossomos marcadores
dos citros**

Aluno: Silvokleio da Costa Silva

Orientador: Prof. Dr. Marcelo dos Santos Guerra Filho

Co-orientador: Prof. Dra. Andrea Pedrosa-Harand

Recife-PE
Fevereiro de 2012

SILVOKLEIO DA COSTA SILVA

Homeologia e evolução dos cromossomos marcadores dos citros

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, área de concentração em Biotecnologia (linha de pesquisa: Biologia Celular e Molecular), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Guerra
(Depto. de Botânica, UFPE)
Co-orientadora: Prof. Dra. Andrea Pedrosa-Harand
(Depto. de Botânica, UFPE)

Recife-PE
Fevereiro de 2012

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Silvokleio da Costa

Homeologia e evolução dos cromossomos marcadores dos citros /
Silvokleio da Costa Silva. – Recife: O Autor, 2012.

175 f.: il., fig., tab.

Orientador: Marcelo Guerra

Coorientadora: Andrea Pedrosa-Harand

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências
Biológicas, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

1. Genética 2. Citogenética 3. Cromossomos 4. Plantas –
Evolução I. Guerra, Marcelo II. Pedrosa-Harand, Andrea
III. Título.

576.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-027

SILVOKLEIO DA COSTA SILVA

Homeologia e evolução dos cromossomos marcadores dos citros

Tese de Doutorado submetida à apreciação pela banca examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Guerra
Orientador (UFPE)

Prof. Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal
(UFPE)

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho
(UFRPE)

Prof. Dra. Ana Emília Barros e Silva
(UFPB)

Dra. Ana Paula de Moraes
(UNICAMP)

DEDICATÓRIA

Tudo o que sou e o que vier a ser
ofereço a Ti, ó Senhor Deus

AGRADECIMENTOS

Ao meu bondoso Deus, pelo dom da vida e a oportunidade de desfrutar este momento tão especial e enriquecedor no âmbito profissional.

À Universidade Federal Pernambuco (UFPE), pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) da Universidade Federal de Pernambuco que auxiliaram na minha formação.

À Adenilda (Adê), secretária do Doutorado em Ciências Biológicas (PPGCB), pelo apoio prestado.

Ao Prof. Dr. Marcelo Guerra pela orientação e profissionalismo durante as etapas de desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dra. Andrea Pedrosa-Harand pela orientação no âmbito profissional, pelo exemplo de integridade, pelas palavras proferidas nas horas difíceis bem como pela paciência (muitíssimo obrigado).

À Dra. Ana Paula de Moraes pela capacitação dada no início do meu trabalho.

A toda minha família, em especial a Josikleio da Costa Silva e Hudsonkléo da Costa Silva, que sem se dar conta, foram meu alicerce na construção desta obra.

Ao Sr. Fernandes Matias da Silva, meu pai, pela vida, educação e exemplo de dignidade a ser seguido. Amo você.

À Sra. Eufrásia da Costa Silva, minha mãe, pelo amor e vida dedicados ao longo dos momentos que partilhamos juntos.

Aos amigos Aridelson Joabson, Simone Vieira e Vanessa Pedrosa pelas palavras de fé e estímulos proferidos em momentos oportunos.

Aos amigos Eliane Monteiro, Carlos Alberto, Manuel Monterio (em memória) e Maria Nunes pela amizade, palavras de fé, sabedoria, carinho e acolhimento, além de tudo que vocês representam em minha vida.

Aos amigos da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (Cruz das Almas - BA), Dr. Walter dos Santos Soares Filho e Sr. Getúlio de Souza Vieira pelo valiosíssimo conhecimento compartilhado e auxílio em campo experimental.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Vegetal (Artur, Sandra, Lili, Magdalena, Nice, Joana, Aretuza, Lidiane, Gustavo, Tiago Ribeiro, Tiago

Espósito, Fernando e Fagna) pelo espírito coletivo, partilha de aprendizagem e descontração ao longo destes anos de valiosa convivência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa que possibilitou dar continuidade à tão almejada pós-graduação.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE GRÁFICOS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO 1 1. Introdução	17
CAPÍTULO 2 2. Revisão da Literatura	20
2.1. Citogenética de plantas	21
2.1.1. Aplicação da citogenética no estudo evolutivo de plantas	21
2.1.2. Hibridização <i>in situ</i> de DNAr	23
2.1.3. Bibliotecas genômicas e mapeamento físico	24
2.1.4. Mapeamento cromossômico comparativo	25
2.2. Polimorfismos moleculares e filogenia	26
2.3. O gênero <i>Citrus</i> e grupos proximamente relacionados	28
2.3.1. Origem e distribuição geográfica	28
2.3.2. Importância econômica	30
2.3.3. Taxonomia	31
2.3.4. Diversidade molecular e filogenia de <i>Citrus</i> e gêneros relacionados	33
2.3.5. Mapas de ligação em Aurantioideae	36
2.3.6. Bibliotecas de cromossomos artificiais de bactérias (BACs) e mapas físicos dos <i>Citrus</i> e gêneros relacionados	38
2.3.7. Citogenética clássica e bandeamento cromossômico em <i>Citrus</i>	40
2.3.8. Bandeamento com fluorocromos e FISH	41
2.3.9. Hibridização de sequências de DNA satélites em Aurantioideae	44
2.3.10. Citogenética molecular comparativa	46
3. Referências Bibliográficas	48

CAPÍTULO 3	4. Manuscrito I: The cytogenetic map of the <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. - A nomenclature system for chromosomes of all citric species	66
CAPÍTULO 4	5. Manuscrito II: Chromosome homeologies between <i>Citrus</i> and <i>Poncirus</i> - The comparative cytogenetic map of the mandarin <i>Citrus reticulata</i> Blanco cv. Cravo (Rutaceae)	82
CAPÍTULO 5	6. Manuscrito III: Mapa citogenético de <i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merrill (Rutaceae): evolução dos cromossomos marcadores das espécies cítricas verdadeiras e do híbrido <i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	108
	7. Conclusões	136
	8. Anexos	139
	8.1. Normas para submissão do manuscrito à revista “ <i>Tropical Plant Biology</i> ”	140
	8.2. Normas para submissão do manuscrito à revista “ <i>Tree Genetics & Genomes</i> ”	152
	8.3. Normas para submissão do manuscrito à revista “ <i>Chromosome Research</i> ”	168

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2		Pág.
Figura 1	Mapa dos principais centros de diversidade de <i>Citrus</i> . A província chinesa de Yunnan é apontada como provável centro de origem deste gênero, com exceção do pomeleiro.	29
Figura 2	Classificação dos tipos e subtipos cromossômicos de <i>Citrus</i> e gêneros relacionados baseados na distribuição das bandas heterocromáticas CMA ⁺ /DAPI ⁻ (em amarelo), assim como na localização dos sítios de DNAr 5S (em vermelho) e 45S (em verde) (adaptado de GUERRA, 1993; MIRANDA et al., 1997b; PEDROSA et al., 2000; CARVALHO et al., 2005; BRASILEIRO-VIDAL et al., 2007; MORAES et al., 2007 a,b; GUERRA, 2007; BARROS e SILVA et al., 2010).	42
Figura 3	Sequência consenso do principal DNA satélite: (a) CsSat181 de <i>C. ichangensis</i> , segundo Beridze et al. (1992), e (b) PN400 de <i>Poncirus trifoliata</i> , adaptado de De Felice et al. (2006) e Barros e Silva et al. (2010).	45
CAPÍTULO 4		
Figura 1	1 Metaphases of <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. stained with CMA/DAPI (a and d) and hybridized <i>in situ</i> with two different probe sets. In b , five BACs were used to recognize all chromosomes in combination with the CMA ⁺ bands and 5S rDNA sites. In this case, two BACs that co-localized in chromosome 9 were used, but only one would be necessary. In e , an alternative set of BACs was used including BACs for the short arms of chromosomes 1 (F _L), 2, and 4, and 45S rDNA instead of 5S rDNA probe; c and f , Karyograms based on the metaphases illustrated in a-b and d-e . Bar in e corresponds to 2.5 µm.	71
Figura 2	Idiogram of <i>Poncirus trifoliata</i> showing chromosome type, the average size of individual chromosomes (S) in µm and	72

Mbp, arm ratio (ar), percentage of CMA⁺ heterochromatin per chromosome (% Ht) and BAC location (I). The chromosomes were ordered according to the decreasing length of the short arm. 45S rDNA sites (green) are co-localized with the corresponding CMA⁺ bands, whereas 5S rDNA sites (red) are adjacent to them.

CAPÍTULO 5

- Figura 1** Mitotic metaphase from *Citrus reticulata* Blanco cv. Cravo stained with CMA/DAPI (a) and hybridized *in situ* with different BACs selected from the *P. trifoliata* library (b). (c) Karyograms based on the same metaphase illustrated in a and b. Insert in a shows C type chromosomes stained with CMA only. Inserts in b shows chromosomes with higher exposure to distinguish the minor signals from 45S rDNA on chromosome 3 and the heteromorphism for chromosome pair 5. Bar in c corresponds to 2.5 µm. 93
- Figura 2** Idiogram of *Citrus reticulata* Blanco cv. Cravo showing chromosome types, the average size of individual chromosomes (S) in µm and Mbp, arm ratio (ar), percentage of heterochromatin per chromosome (% HC) and BAC location (I). The 45S rDNA sites are identified in green, whereas the 45S rDNA site co-localized with the CMA⁺ bands on the chromosome 5 is represented in green and yellow. The CMA⁺ bands and BACs sites are indicated, respectively, in yellow and orange. In chromosome 9, BACs 55B01 and 59C23 indicate the location of the CTV locus. The heteromorphism between homeologues for the 45S rDNA site on chromosome 5 is indicated, but only part of the larger 45S rDNA cluster is represented. 94
- Figura 3** Schematic representation of chromosomes 2, 3, 5, 6, 7 and 9 showing the differences between *Citrus reticulada*, *C. medica* and *Poncirus trifoliata* chromosome types, size of CMA⁺ heterochromatic bands, distribution of rDNA sites 99

and BACs (adapted from Moraes et al. 2008; Silva et al. 2011 and Mendes et al. 2011). **a)** Gain of rDNA sites on chromosomes 2; **b)** loss of the 5S rDNA on chromosome 3; **c)** loss of the 45S rDNA on chromosome 5; **d)** pericentric inversion involving the proximal 45S rDNA site on chromosome 3; **e)** gain and loss of CMA⁺ blocks. The phylogenetic relationships among species were based on Uzun et al. (2009). Asterisks indicate a 180° rotation of the chromosomes in respect to the ideogram in order to maintain marker colinearity with *P. trifoliata*. The chromosomes are represented on the same scale.

Supplemental Fig. S1	Flow cytometric DNA content (2C value) analysis of <i>Citrus reticulata</i> cv. Cravo using <i>Raphanus sativus</i> (2C = 1.11 pg; Doležel et al. 1992) as an internal reference standard. Nuclei were isolated in Otto's buffers and stained with propidium iodide. The coefficient of variation (cv) for mandarin ranged from 3.5% to 4.3%, while the standard cv ranged from 2.8% to 3.8%.	106
Supplemental Fig. S2	Mitotic metaphases from <i>Citrus reticulata</i> Blanco cv. Cravo stained with CMA/DAPI and hybridized <i>in situ</i> with different BACs from <i>P. trifoliata</i> library. The inserts show the enlarged chromosomes pseudocoloured in gray and the BAC signals in red and green. The numbers identify the labelled chromosome pair in each case. Bar in d corresponds to 5 µm.	107

CAPÍTULO 6

Figura 1	Metáfases mitóticas de <i>Citrus maxima</i> cv. Pink coradas com CMA/DAPI (a , c e e) e hibridizada <i>in situ</i> com os BACs 24C13 _[Cromossomo 1] , 28A05 _[6] (b), 28A07 _[3] (b e f), 20C13 _[4] (b e d), 21L13 _[2] (d) e 14A12 _[3, em rosa] (f). O cromossomo 7 foi identificado como sendo do tipo A sem sinal de BAC (b). Insertos tracejados em a e b mostram três cromossomos da mesma metáfase que estavam separados dos demais. Insertos em b e d mostram os	120
-----------------	---	-----

- cromossomos com detalhes ampliados e com maior contraste. Barra em **f** corresponde a 2,5 μm .
- Figura 2** Metáfases mitóticas de *Citrus maxima* cv. Pink (**a-f**) e *C. sinensis* cv. Valencia (**g-h**) coradas com CMA/DAPI (**a, c, e e g**) e hibridizada *in situ* com o sítio de DNAr 5S_[Cromossomo 5] (**b**) e os BACs 59C23_[9] (**f**) e 21L13_[2] (**h**). Metáfase em **c e d** cujo sítio de DNAr 5S foi mapeado em um par do tipo F/D. Insetos em **b, d, f e h** mostram os cromossomos com detalhes ampliados e com maior contraste. Barra em **h** corresponde a 2.5 μm . 121
- Figura 3** Idiograma de *Citrus maxima* cv. Pink mostrando os tipos cromossômicos, tamanho médio individual dos cromossomos (S) em μm e Mpb, razão entre braços (ar), porcentagem de heterocromatina por cromossomo (% HC) e a localização dos BACs (I). Os sítios de DNAr 45S co-localizados com as bandas CMA⁺ foram representados em verde e amarelo, enquanto que o de DNAr 5S foi representado em vermelho. As bandas CMA⁺ e os sítios dos BACs estão indicados, respectivamente, em amarelo e laranja. 122
- Figura 4** Representação esquemática dos cromossomos 2, 3, 5, 6, 7 e 9 de *Citrus maxima*, *C. reticulada*, *C. medica* e *Poncirus trifoliata* mostrando as diferenças entre os tipos cromossômicos, tamanho das bandas heterocromáticas CMA⁺, distribuição dos sítios de DNAr e BACs (adaptado de Silva et al. 2011; Mendes et al. 2011, Silva et al. em preparação). As relações filogenéticas entre as espécies foram baseadas na topologia das árvores filogenéticas estabelecidas por Nicolosi et al. (2000), Barkley et al. (2006), Pang et al. (2007) e Uzun et al. (2009). Os asteriscos indicam uma rotação de 180° dos cromossomos em relação ao idiograma visando manter a colinearidade dos marcadores de *P. trifoliata*. Os cromossomos foram representados na mesma escala. 128

LISTA DE GRÁFICOS

Capítulo 2		Pág.
Gráfico 1	Representação da participação dos países na produção mundial (68.475.267 t) de laranja no ano de 2009 (Fonte: FAO, 2011).	31

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados
AgNO₃ – Nitrato de prata
AMD – Actinomicina D
BAC – Cromossomos artificiais de bactérias (*Bacterial Artificial Chromosome*)
BES – BAC End Sequence
CMA – Cromomicina A₃
cpDNA – DNA cloroplastidial
Ctv – Vírus da tristeza dos citros
DA – Distamicina A
DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA_{sat} – DNA satélite
EST – Etiqueta de sequência expressa
FISH – Hibridização *in situ* fluorescente
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
IP – Iodeto de propídeo
ISSR – Sequência simples repetitiva internas
PCR – Reação em cadeia da polimerase
QTL – Loci de características quantitativas
RAPD – DNA polimórfico amplificado aleatoriamente
RFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
RONs – Regiões organizadoras de nucléolos
SCAR – Regiões amplificadas a partir de sequências caracterizadas
SNP – Polimorfismo em nucleotídeo único
SRAP – Polimorfismo amplificado de sequências relacionadas
SSC – Tampão salino citrato de sódio
SSR – Sequência simples repetitiva
YAC – Cromossomos artificiais de leveduras

RESUMO

Recentemente, um mapa citogenético estabelecido para *Poncirus trifoliata* disponibilizou marcadores cromossomo-específicos para estudos evolutivos das espécies cítricas. Objetivando reconhecer as homeologias cromossômicas e entender as alterações cariotípicas existente entre os gêneros *Poncirus* e *Citrus* e entre os principais representantes dos citros, os mapas citogenéticos de *P. trifoliata* cv. Flying Dragon, *C. reticulata* cv. Cravo (tangerina) e *C. maxima* cv. Pink (toranja) foram construídos e comparados entre si e com o mapa previamente estabelecido para *C. medica* var. Etrog (cidra). Os cromossomos marcadores de *P. trifoliata* também foram mapeados em *C. sinensis* (L.) cv. Valencia (laranjeira doce), o principal híbrido de interesse econômico do grupo. Metáfases mitóticas destas espécies foram coradas com os fluorocromos CMA e DAPI e submetidas a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) empregando sondas de cromossomos artificiais de bactérias (BACs) e de DNAr 5S e 45S. As fórmulas cariotípicas encontradas para as cultivares analisadas de *P. trifoliata* (4B+8D+6F), *C. reticulata* (2C+10D+6F), *C. maxima* (4A+2C+4D+8F) e *C. sinensis* (2B+2C+7D+7F) corroboram com as anteriormente reportadas na literatura, entretanto, um pequeno sítio proximal adicional de DNAr 45S foi detectado em *C. reticulata*. Apenas os cromossomos 1, 4 e 8 foram conservados quanto ao tipo cromossômico e localização dos BACs entre as espécies estudadas. Nos demais casos, as posições dos BACs foram conservadas, mas não os tipos cromossômicos. Quebra de colinearidade foi observada apenas no par 3, entre BACs e um sítio de DNAr 45S, sugerindo que inversões ou transposições também podem ter ocorrido. Os resultados aqui reportados indicam uma alta sintenia no grupo. As principais divergências cariotípicas observadas provavelmente estão relacionadas a eventos de amplificação e/ou desamplificação de sequências repetitivas que compõem os blocos CMA⁺. Essas alterações foram mais frequentes em *C. medica* que nas demais espécies, porém, considerando a variabilidade encontrada, as semelhanças cariotípicas observadas entre espécies filogeneticamente distantes podem ser fruto de reversões e não da conservação de um cariótipo ancestral. Os dados de mapeamento dos BACs nos pares cromossômicos 2 e 3 de *C. sinensis*, associados aos seus tipos cromossômicos, corroboram toranja e tangerina como os prováveis parentais deste híbrido.

Palavras-chave: BAC, FISH, homeologia, sintenia, evolução cariotípica, espécies cítricas

ABSTRACT

Recently, a cytogenetic map was established for *Poncirus trifoliata* which provided several chromosome-specific markers for evolutionary studies of the citric species. Aiming to recognize chromosome homeologies and to understand the karyotypic changes that occurred between genera *Poncirus* and *Citrus*, as well as between the main representatives from citrus, the cytogenetic maps from *P. trifoliata* cv. Flying Dragon, *C. reticulata* cv. Cravo (mandarin) and *C. maxima* cv. Pink (pummelo) were constructed and compared between themselves and with the map established from *C. medica* var. Etrog (citron). Besides this chromosome markers of *P. trifoliata* were also mapped in *C. sinensis* (L.) cv. Valencia (sweet orange), the most important economically hybrid in the group. Mitotic metaphases of those species were stained with CMA and DAPI fluorochromes and subjected to fluorescent *in situ* hybridization (FISH) employing probes from bacterial artificial chromosomes (BACs) and 5S and 45S rDNA sites. The karyotypic formulae found for the analyzed cultivars of *P. trifoliata* (4B+8D+6F), *C. reticulata* (2C+10D+6F), *C. maxima* (4A+2C+4D+8F) and *C. sinensis* (2B+2C+7D+7F) are in accordance with the ones reported previously in the literature, although, a small additional 45S rDNA site was detected in a proximal position in *C. reticulata*. Only chromosomes 1, 4 and 8 were conserved in relation to type and chromosomal localization of BACs among species. In the other cases, BACs positions were conserved, but not chromosome types. Colinearity break was observed in the chromosome pair 3, between the 45S rDNA site and BACs, suggesting the occurrence of inversions or transpositions. Our results reported here are indicating a high synteny in the group. The main karyotypic divergences observed are probably related to events of amplification and/or desamplification of repetitive sequences that comprise the CMA⁺ blocks. These chromosome changes were more frequently observed in *C. medica* than in the others species. Although considering the high variability found, the karyotypes similarities observed among phylogenetically distant species may be the result of reversals and not due to the conservation of an ancestral karyotype. BACs locations in chromosomes 2 and 3 of *C. sinensis*, associated with chromosome types, corroborate pummelo and mandarin as the most provable parental species of this hybrid.

Keywords: BAC, FISH, homeology, synteny, karyotypic evolution, citrus species

1. Introdução

O gênero *Citrus* L. (família Rutaceae) ocupa atualmente o terceiro lugar dentre as frutíferas cultivadas no mundo, sendo as laranjas, os limões, as tangerinas e os pomelos as culturas de maior destaque neste grupo. Os primeiros estudos das relações taxonômicas entre as espécies de *Citrus* foram baseados principalmente em características morfológicas, o que levou à formulação de numerosos sistemas de classificação, destacando-se especialmente o de Swingle (1967) e o de Tanaka (1977). Contudo, mesmo depois de vários estudos realizados neste grupo, ainda há bastante controvérsia devido à dificuldade de delimitação de suas espécies (SWINGLE e REECE, 1967).

Citogeneticamente, as espécies de *Citrus* ($2n = 18$) são caracterizadas por apresentarem cromossomos relativamente pequenos (1 a 3,5 μm) e morfológicamente semelhantes (submetacêntricos e metacêntricos) (GUERRA et al., 2000). O emprego do bandeamento cromossômico com os corantes fluorescentes cromomicina A₃ (CMA) e 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) tem se mostrado bastante informativo, permitindo reconhecer uma alta variabilidade e heterozigosidade de bandas CMA⁺/DAPI⁻, assim como caracterizar e avaliar a origem dos híbridos de *Citrus* e gêneros relacionados (GUERRA 1993; CARVALHO et al., 2005). Esta técnica tem sido complementada com a hibridização *in situ* de genes ribossomais 5S e 45S (MATSUYAMA et al., 1996; ROOSE et al., 1998; PEDROSA et al., 2000; CARVALHO et al., 2005).

Vários autores empregaram marcadores bioquímicos e moleculares para caracterizar e analisar o nível de diversidade genética assim como as relações filogenéticas dos citros. Muitos destes estudos tiveram como alvo específico o gênero isolado ou, algumas vezes, grupos relacionados. Estes estudos, juntamente com informações citogenéticas, sugerem que a cidra (*Citrus medica* L.), a toranja [*C. maxima* (Burm.) Merrill] e quatro tangerinas (*C. reticulata* Blanco cv. Cravo, *C. deliciosa* Ten. cv. Comum ou Montenegrina, *C. reshni* hort. ex Tanaka e *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka) são as espécies básicas (ou verdadeiras) do subgênero *Citrus* (BARRET e RHODES, 1976; MOORE, 2001; MORAES et al., 2007a), enquanto que as demais são de origem híbrida.

Mesmo com as informações citogenéticas disponíveis para este grupo, nem sempre foi possível identificar cada par cromossômico dos cariótipos deste grupo, fato que impossibilitou até pouco tempo a realização de estudos de homeologia cariotípica

na subfamília Aurantioideae. Recentemente, foi estabelecido um mapa citogenético para *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., espécie proximamente relacionada ao gênero *Citrus*, utilizando FISH de BACs (Cromossomos Artificiais de Bactéria), o que tornou possível reconhecer seus nove pares cromossômicos (MORAES et al., 2008). O estabelecimento de marcadores cromossômicos adicionais tem possibilitado realizar estudos comparativos e de evolução cromossômica dentro dos citros.

Mendes e colaboradores (2011) utilizaram os marcadores empregados para *P. trifoliata* (MORAES et al., 2008) em cidreira (*C. medica*) e construíram o primeiro mapa citogenético comparativo para o gênero *Citrus*. Esses autores sugeriram que os principais eventos envolvidos na evolução cariotípica dessas espécies foram a contração e/ou expansão de sequências de DNA repetitivo, associados possivelmente a inversões pericêntricas.

Desta maneira, esses marcadores passaram a constituir importantes ferramentas para a identificação cromossômica de outras espécies de citros, assim como para a compreensão da evolução cromossômica nesse grupo. A construção dos mapas citogenéticos para a tangerineira (*C. reticulata*) e toranjeira (*C. maxima*) tornou-se de grande importância para a compreensão das homeologias e das mudanças cromossômicas envolvidas na evolução de *Citrus*, reconhecimento das quebras de sintenia e/ou colinearidade, assim como para o reconhecimento das relações parentais destas espécies (juntamente com cidra) e dos híbridos deste gênero, tal como a laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck].

2. Revisão da Literatura

2.1. Citogenética de plantas

2.1.1. Aplicação da citogenética no estudo evolutivo de plantas

O emprego de técnicas citogenéticas em espécies nativas e cultivadas tem fornecido informações importantes para a taxonomia, evolução e melhoramento genético de alguns grupos de plantas através da caracterização dos complementos cromossômicos. Comumente, a análise citogenética clássica é realizada em cromossomos metafásicos mitóticos corados com Giemsa, carmim acético ou outro corante convencional, que cora uniformemente o complemento cromossômico, sem nenhuma preferência por tipo de cromatina. Esta técnica revela aspectos como número e comprimento dos cromossomos, razão entre braços cromossômicos e padrão de condensação. Além disso, características físicas adicionais outras, como presença e posição de constrição secundária e cromossomos portadores de satélites, podem ser reveladas, fornecendo informações valiosas para comparar espécies ou identificar variações inter e intra-específicas (GUERRA et al., 1997).

Azkue (2000) verificou que as variações nos números básicos ($x = 5, 6, 7, 8, 9$ e 11) das espécies de *Oxalis* foi muito importante para o estabelecimento de relações filogenéticas no gênero, contribuindo para a subdivisão do mesmo em seções anteriormente baseadas apenas em dados morfológicos.

Muitas vezes os padrões cromossômicos revelados por colorações convencionais não são suficientes para uma análise cariotípica detalhada, especialmente se os cromossomos forem simétricos, similares e pequenos.

Desde o início de 1970 as técnicas de coloração cromossômica diferencial têm contribuído grandemente para estudos de identificação cromossômica, comparação cromossômica inter e intra-específica, bem como para a compreensão de alterações cariotípicas (GILL et al., 1991; SUMNER, 2003). Dentre estas técnicas podemos destacar, para vegetais, o bandeamento C, a impregnação com nitrato de prata (AgNO_3) e a coloração com fluorocromos com preferência por bases (BENNETT e LEITCH, 1995).

Um dos propósitos da citogenética, utilizando a coloração diferencial, é caracterizar a cromatina de acordo com a constituição (eucromatina e heterocromatina) e distribuição dos blocos heterocromáticos. Em 1882, Flemming foi o primeiro a observar o comportamento de condensação da cromatina durante a intérfase (SCHULZ-

SCHAEFFER, 1980). Entretanto, apenas em 1928, Heitz empregou os termos eucromatina e heterocromatina (SUMNER, 1990).

Muitas das técnicas diferenciais, como o bandejamento C, baseiam-se na identificação da heterocromatina constitutiva. Esta heterocromatina é caracterizada por permanecer fortemente condensada durante a maior parte do ciclo de divisão celular, replicar tardiamente na fase S e apresentar uma baixa quantidade de genes. Estes segmentos são constituídos por sequências de DNA altamente repetitivas organizadas em tandem, denominadas DNA satélite, que podem desempenhar função estrutural ou estar relacionados a mecanismos de silenciamento gênico (AVRAMOVA, 2002).

A técnica de bandejamento C se baseia na eliminação diferencial de DNA e proteínas associadas aos cromossomos principalmente em regiões eucromáticas, uma vez que a heterocromatina é mais resistente a este tipo de remoção, gerando um padrão de blocos heterocromáticos (VOSA, 1985; SUMNER, 2003). A eficácia dessa técnica tem sido comprovada em muitas espécies vegetais. Em *Triticale*, planta resultante do cruzamento entre trigo e centeio, o bandejamento C pode auxiliar na identificação de cromossomos provenientes de cada um dos genitores, através da observação de bandas específicas (SEAL e BENNETT, 1982). Em *Nicotina plumbaginifolia* ($2n = 20$) os homólogos puderam ser pareados através do padrão de bandas intersticiais (MOURAS et al., 1986).

Diferenças na composição de bases (regiões ricas em AT e GC) da heterocromatina podem ser reconhecidas por técnicas de bandejamento cromossômico com fluorocromos. Os fluorocromos são substâncias que apresentam propriedades fluorescentes a determinadas sequências de bases do DNA. Dentre os que possuem maior afinidade pelo par de bases adenina e timina (AT) destacam-se o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Hoechst 33258 e a quinacrina. Já a cromomicina A₃ (CMA) e a mitramicina apresentam afinidade por regiões ricas em guanina e citosina (GC). Outros como distamicina A (DA), o iodeto de propídeo (IP), a actinomicina D (AMD) além do DAPI podem ser empregados como contra corantes visando potencializar o contraste durante a visualização de um fluorocromo primário (SCHWEIZER, 1976; SUMNER, 1990; SCHWEIZER e AMBROS, 1994; KIM et al., 2002).

A caracterização citogenética da heterocromatina constitutiva realizada a partir de colorações empregando fluorocromos pode auxiliar na caracterização de espécies e variedades. Diferenças no padrão de bandas DAPI foram observadas na espécie *Dioclea*

virgata quando comparadas a outras espécies da subfamília Papilionoideae (SOUZA e BENKO-ISEPPON, 2004).

A coloração com fluorocromos base-específicos CMA e mitramicina pode ser empregada para a detecção das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) visto que essas regiões apresentam sequência em geral rica em pares de bases GC (SALVADORI et al., 1995). As RONs são de sequências de DNA repetidas em tandem que codificam os RNA ribossomais (RNAr) 5,8S, 18S e 26S. Citologicamente, estas regiões são normalmente associadas a constrições secundárias de cromossomos profásicos a metafásicos, sendo responsáveis pela formação dos nucléolos na intérfase. Além disso, as RONs funcionalmente ativas podem ser detectadas pela impregnação das proteínas nucleolares argirofílicas (ácidas) aderidas a essa região com nitrato de prata (HOWELL e BLACK, 1980; RUFAS et al., 1982). Em *Allium communtatum* (Alliaceae) a aplicação sequencial das técnicas CMA/DAPI e nitrato de prata (AgNO_3) revelaram que as marcações com o fluorocromo CMA correspondiam às RONs desta espécie (BESENDORFER et al., 2002).

O tamanho da deposição de prata está relacionado ao grau de atividade transcricional, evidenciando o número e a posição dos DNA ribossomais ativos (CERMEÑO et al., 1984; MELLINK et al., 1994; ZURITA et al., 1997). Tais informações podem ser utilizadas na diferenciação intra e interespecífica em termos de evolução do cariótipo (KLINKHARDT, 1998). Entretanto, esta técnica limita-se apenas à detecção das RONs transcionalmente ativadas durante a intérfase, uma vez que em muitos genomas coexistem genes transcionalmente ativos e inativos para a síntese de RNAr (PENDA'S et al., 1993; SANCHEZ et al., 1995; SUMNER, 2003).

2.1.2. Hibridização *in situ* de DNAr

Desde 1969, a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) tem possibilitado mapear fisicamente sequências de DNA, sejam elas ativas ou inativas, tornando-se possível, por exemplo, localizar todos os sítios de DNAr 45S, além do sítios de DNAr 5S, os quais encontram-se em regiões cromossômicas diferentes daqueles da RON (LÓPEZ-LEÓN et al., 1999).

A análise de 34 acessos do gênero *Manihot*, por Carvalho e Guerra (2002) revelou que todos os indivíduos apresentaram quatro cromossomos com blocos CMA⁺

situados na região subterminal e seis sítios de DNAr 45S dos quais quatro eram colocalizados com os blocos CMA⁺.

Melo e Guerra (2003) utilizaram sondas de DNAr 5S e 45S para investigar as relações filogenéticas e os níveis de ploidia entre espécies do gênero *Passiflora*. Os autores concluíram que o número diploide $2n = 12$ representa o provável genoma ancestral com número básico $x = 6$ para o gênero e que as demais espécies com números diploides $2n = 18, 20$ e 24 apresentariam números básicos secundários $x = 9, 10$ e 12 , respectivamente.

As análises realizadas no gênero *Ipheion* (Gilliesioideae, Alliaceae), por meio da dupla-coloração CMA/DAPI e FISH de sondas de DNAr 5S e 45S, associados a dados morfologia cromossômica, possibilitaram separar as espécies deste gênero em um grupo separados dos representantes de *Nothoscordum* analisados. Além disso, as populações de *I. uniflorum* são constituídas por indivíduos autotetraploides de origem recente (SOUZA et al., 2010).

2.1.3. Bibliotecas genômicas e mapeamento físico

Muitos estudos de citogenética molecular têm sido conduzidos usando sondas de DNA repetitivo em experimentos de FISH, principalmente os DNAr 5S e 45S. Em geral essas sondas produzem sinais facilmente visíveis devido ao abundante número de repetições, podendo estar distribuídas de forma dispersa ou em tandem, formando blocos nos cromossomos. A utilização dessas sequências de DNA repetido em tandem permitiu identificar os pares cromossômicos do cariótipo de algumas espécies (HIZUME et al., 2002). Entretanto, nem sempre o padrão de hibridização dessas sequências é suficientemente informativo para permitir a identificação cromossômica e, devido à sua estabilidade entre espécies, geralmente não permite reconhecer os pares de homeólogos entre espécies relacionadas. Para isso, sequências únicas têm sido empregadas permitindo identificar rearranjos cromossômicos, tais como translocações e inversões (JIANG e GILL, 2006).

Para se localizar uma pequena sequência como a de um gene de cópia simples, se faz necessário o emprego de métodos mais refinados associados a sistemas de captura de imagens mais eficazes (MARTINS et al., 2011). Isso porque a técnica de FISH apresenta algumas limitações, especialmente no que se diz respeito à sua sensibilidade

de detecção. Sondas com menos de 10 kb são dificilmente visualizadas em cromossomos metafásicos. Para contornar a dificuldade de localização deste tipo de sequência, clones de DNA genômico de grande inserto estão sendo utilizados como fonte de sequências para o mapeamento cromossômico. Esses clones também são utilizados para o mapeamento físico de *contigs*, análise estrutural do genoma, genômica comparativa e sequenciamento de genomas (HASTEROK et al., 2006).

Dentre as bibliotecas genômicas de grandes insertos destacam-se as de cosmídeos, cromossomos artificiais de leveduras (*Yeast Artificial Chromosome* – YAC) e cromossomos artificiais de bactérias (*Bacterial Artificial Chromosome* – BAC) (FRANSZ et al., 2000; SADDER e WEBER, 2002; TÖR et al., 2002). Os vetores BACs são baseados no fator F da bactéria *Escherichia coli*, que possui a característica de controlar sua replicação, bem como seu número de cópias (SHYZUYA et al., 1992).

Os BACs são os vetores mais amplamente utilizados no mapeamento citogenético. Em geral os BACs suportam insertos de 100-300 kb, que são muito menores quando comparados aos suportados pelos YACs. Contudo, os BACs apresentam várias vantagens sobre os YACs, tais como a ausência de quimeras, alta estabilidade do inserto e maior facilidade de manipulação (WOO et al., 1994; WANG et al., 1995; YU et al., 2000).

A hibridização de clones de bibliotecas BACs via FISH tem sido empregada com sucesso no mapeamento citogenético e tem permitido posicionar genes de interesse agrônomico e relacionar estas e outras sequências a mapas genéticos e cromossômicos de várias espécies vegetais, tais como *Oryza sativa* L. (CHENG et al., 2001), *Brassica oleracea* L. (HOWELL et al., 2002), *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen (PEDROSA et al., 2002), *Sorghum bicolor* (L.) Moench (KIM et al., 2002), *Brachypodium distachyon* L. (HASTEROK et al., 2006), *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (MORAES et al., 2008) e *Phaseolus vulgaris* L. (FONSÊCA et al., 2010).

2.1.4. Mapeamento cromossômico comparativo

A FISH de BACs tem permitido realizar comparações entre cariótipos e reconhecer rearranjos cromossômicos entre espécies relacionadas. Na família Poaceae esta técnica revelou que existe uma conservação de sintenia entre cromossomos de *Zea mays* L. e *Sorghum propinquum* L. (KOUMBARIS e BASS, 2003) bem como entre *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv. e *Hordeum vulgare* L. (MA et al., 2010).

A análise de 30 BACs ancorados a marcadores genéticos ligados ao cromossomo 6 de batata quando comparada aos dados previamente reportados para tomate (TANKSLEY et al., 1992) possibilitou o reconhecimento de uma quebra de colinearidade na porção eucromática do braço curto deste cromossomo, provavelmente associada a uma inversão paracêntrica ocorrida ao longo da evolução cariotípica destas espécies (IOVENE et al., 2008).

Estudos realizados no gênero *Brachypodium* visando-se compreender os processos evolutivos do grupo revelaram a ocorrência de vários rearranjos cromossômicos tais como deleções, duplicações, translocações e fusões (WOLNY et al., 2011). Semelhantemente, apesar da evidência de conservação de sintenia de algumas sequências dentro do gênero *Daucus*, um trabalho realizado com cromossomos paquitênicos via FISH de BACs e de DNAr 5S e 18S-25S em espécies deste gênero, permitiu reconhecer que inversões e translocações foram responsáveis pelas principais alterações cariotípicas observadas entre *D. carota*, *D. crinitus* e *D. pusillus* (IOVENE et al., 2011).

2.2. Polimorfismos moleculares e filogenia

Estudos de diversidade e evolução de genomas também têm sido realizados através de análises de sequências de DNA. Vários marcadores moleculares têm possibilitado a detecção de polimorfismos em populações naturais e materiais cultivados, permitindo o estabelecimento de agrupamentos, relações evolutivas, filogenias, construção de mapas genéticos, entre outras aplicações. Diversos marcadores têm sido utilizados em plantas. Um dos primeiros a serem amplamente empregados foi o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição), que se caracteriza pela utilização de enzimas de restrição específicas para clivar o DNA genômico gerando fragmentos de tamanhos variados (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Um outro grupo de técnicas são as baseadas na reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), as quais forneceram muitas opções adicionais para, por exemplo, o *fingerprinting* de cultivares. Os métodos de PCR que usam iniciadores (*primers*) arbitrários, tornaram-se populares entre os pesquisadores a partir da década de 90 (WELSH e MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990;

CAETANO-ANOLLES et al., 1991) e foram utilizados no auxílio dos estudos taxonômicos de várias espécies vegetais (TINGEY e TUFO, 1993; WHITKUS et al., 1994).

Dentre estes marcadores baseados em PCR, o marcador de DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente (*Random Amplified Polymorphic DNA* – RAPD) foi inicialmente um dos mais amplamente empregados (TINKER et al., 1993; MILLAN et al., 1996), pelo fato de ser mais simples e barato quando comparado ao RFLP (DOS SANTOS et al., 1994) e tem sido utilizado principalmente para estimar a diversidade genética de plantas (AHMAD et al., 2010).

Os marcadores de Regiões Amplificadas a partir de Sequências Caracterizadas (*Sequence Characterized Amplified Region* – SCAR) foram desenvolvidos a partir de outros marcadores como, por exemplo, RAPD (PARAN e MICHELMORE, 1993), porém estes marcadores geram produtos de PCR de maior especificidade e fidelidade quando comparado aos RAPDs. Os SCARs têm sido principalmente utilizados para detectar marcadores estritamente ligados a genes codificantes de interesse agrônomo, como os associados à resistência a antracnose em feijão (ADAM-BLONDOM et al., 1994) e ao vírus do mosaico do tomate (OHMORI et al., 1996).

A técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism* – AFLP) vem sendo empregada para *fingerprinting* de DNA (BUSSELL et al., 2005). Ela tem sido aplicada com sucesso para resolver relações filogenéticas em uma ampla série de grupos taxonômicos como trigo (HEUN et al., 1997), espécies de arroz (AGGARWAL et al., 1999), da batata doce e seus parentes silvestres (HUANG et al., 2002), de membros da família Rosaceae (WEN et al., 2004) bem como de árvores frutíferas (COART et al., 2003; PANG et al., 2007).

As sequências simples repetitivas (*Simple Sequence Repeats* – SSRs), também denominadas de microssatélites, são *repeats* em tandem de di-, tri-, ou tetranucleotídeos abundantes em todos os genomas eucarióticos (HAMADA et al., 1982). Esses marcadores são codominantes e altamente informativos, sendo empregados em estudos populacionais, na determinação das relações filogenéticas de táxons estreitamente relacionados, bem como para o “*fingerprinting*” de variedades e determinação do nível de diversidade genética dentro de coleções de germoplasma (BROWN et al., 1996; HOKANSON et al., 1998; LIU et al., 2003).

O marcador do tipo ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat* – ISSR) é caracterizado por usar um único *primer* composto por uma sequência microssatélite tal como (CA)₈ ancorado na extremidade 3' ou 5' por 2-4 nucleotídeos arbitrários, frequentemente degenerados. Quando comparado ao RAPD, esse marcador revela muitas vezes um número superior de polimorfismos. Os resultados obtidos por meio do emprego desta técnica permitiu investigar as origens do gênero *Eleusine* (SALIMATH et al., 1995), bem como identificar cultivares de crisântemo (WOLFF et al., 1995) e colza (CHARTERS et al. 1996).

Outro sistema de marcador baseado em PCR é o polimorfismo amplificado de sequências relacionadas (*Sequence Related Amplified Polymorphism* – SRAP) como descrito por Li e Quiros (2001). Este tipo de marcador é caracterizado por ser um marcador simples e eficiente, passível de ser adaptado a uma variedade de finalidades em diferentes culturas, incluindo construção de mapas, marcação de genes, *fingerprinting* genômico e de cDNA, e mapas baseados em clonagem. Recentemente, foi usado para determinar as relações genéticas entre Curcubitaceae (FERRIOL et al., 2003; FERRIOL et al., 2004), pêssego e nectarina (AHMAD et al., 2004), cultivares de tomate (RUIZ e GARCIA-MARTINEZ, 2005), caqui (GUO e LUO, 2006), quiabo (GULSEN et al., 2007) e ervilha (ESPOSITO et al., 2007).

A análise de sequências de DNA cloroplastidial (cpDNA) destaca-se entre os marcadores moleculares por empregarem *primers* universais bem como por serem predominantemente de herança uniparental, fato que tem possibilitado estabelecer relações evolutivas nas distintas hierarquias (família, gênero, espécie) assim como realizar estudos filogenéticos e filogeográficos de plantas, uma vez que os mesmos são evolutivamente conservados (OLMSTEAD e PALMER, 1994). A utilidade do cpDNA para examinar linhagens maternas de híbridos foi documentada, por exemplo, em *Hippophae goniocharpa* (Elaeagnaceae) (WANG et al., 2008).

2.3. O gênero *Citrus* e grupos proximalmente relacionados

2.3.1. Origem e distribuição geográfica

Os registros encontrados na literatura relatam que a domesticação e o histórico do cultivo deste gênero são anteriores a 2.100 a.C (WEBBER, 1967; SCORA, 1988). Estudos afirmam que o centro de origem e diversidade do gênero está situado no

sudoeste da Ásia, mais especificamente entre o leste da Índia, norte de Burma e Sudoeste da China (TANAKA, 1954; SCORA, 1975; MOORE, 2001; GMITTER et al., 2007). Outro estudo propõe que a província de Yunnan, situada no sudoeste da China, pode ter sido o centro de origem deste gênero, devido à existência de uma alta diversidade de espécies neste local (GMITTER e HU 1990) (ver Figura 1). Adicionalmente, o conjunto de rios desta área pode ter servido como rota de dispersão desse gênero para o sul da China (SAUER, 1993). Entretanto, nem todos os representantes deste gênero tiveram origem nessa região. O pomeleiro (*C. paradisi* Macf.), por exemplo, teve sua origem recentemente no Novo Mundo (CAMERON e SOOST 1986; MOORE, 2001).

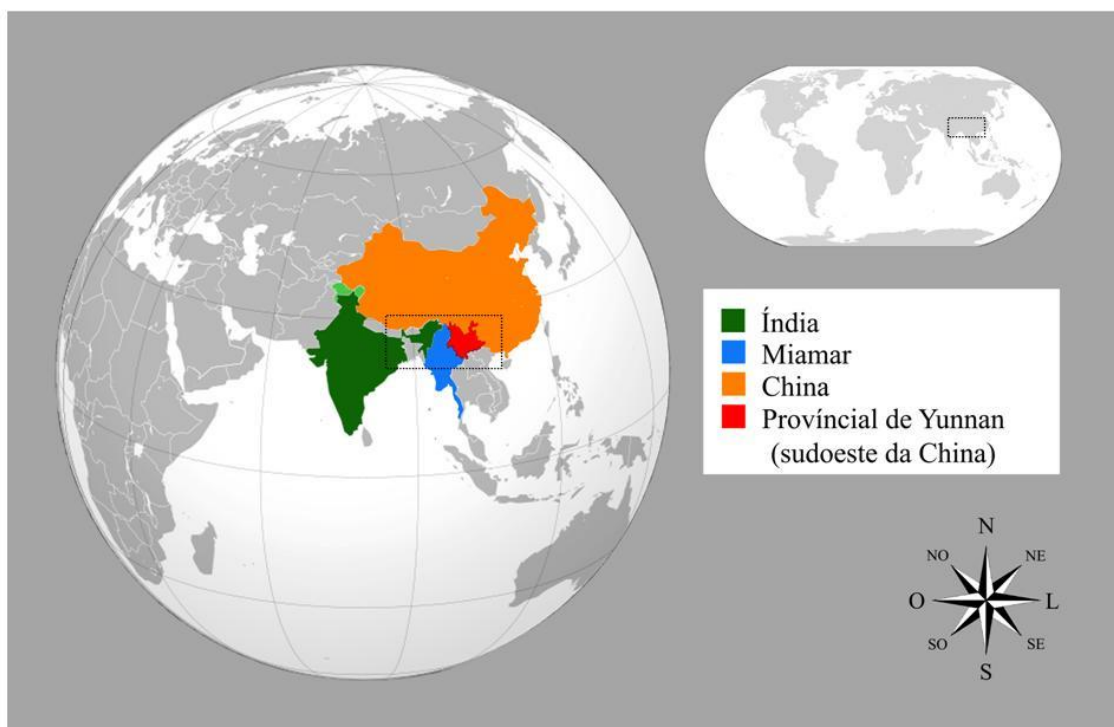


Figura 1. Mapa dos principais centros de diversidade de *Citrus*. A província chinesa de Yunnan é apontada como provável centro de origem deste gênero, com exceção do pomeleiro.

A cidreira (*C. medica* L.) é considerada uma das espécies precursora dos citros cultivados (SCORA, 1975; MOORE, 2001). Esta espécie foi a primeira do gênero a ser introduzida na Europa, sendo a única espécie conhecida por um longo período de tempo (WEBBER, 1967). Os maiores avanços da citricultura somente aconteceram por volta 1.150 d.C. quando várias espécies do gênero como a laranjeira-azedo (*C. aurantium* L.), a laranjeira doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e os limoeiros [*C. limon* (L.) Burm. f. e

C. aurantifolia (Christm) Swing.] se expandiram pela Europa e África. Já a tangerineira (*C. reticulata* Blanco), mesmo sendo cultivada na China e no Japão desde a antiguidade, só foi introduzida na Europa no início do século XIX (SCORA, 1975).

A introdução das espécies cítricas no continente americano foi realizada especialmente através dos exploradores, comerciantes e missionários da igreja (GMITTER et al., 2007). No continente americano esta introdução ocorreu por meio de sementes ou partes de plantas trazidas da Ásia durante o período das grandes navegações exploradoras (SCORA, 1975; MOORE, 2001).

No Brasil, os primeiros relatos do cultivo datam de 1.540, na ilha de Cananeia, Estado de São Paulo, e de 1.549, com a chegada dos padres jesuítas a Salvador, Bahia (WEBBER et al., 1967; CHAPOT, 1975; CAMPOS, 1976; MOREIRA e MOREIRA, 1991). Atualmente, as regiões mais favoráveis para a citricultura estão em áreas tropicais e subtropicais, situadas a aproximadamente 40° de latitude norte e sul da linha do equador, onde as temperaturas são predominantemente mais quentes (GMITTER et al., 2007; SINGH e RAJAM, 2009; LI et al., 2010).

2.3.2. Importância econômica

Os citros são plantas perenes e cultivadas em mais de 100 países ao redor do mundo (SAUNT, 1990). Suas espécies ocupam o terceiro lugar dentre as frutíferas cultivadas no mundo, ficando apenas atrás da maçã e da banana, com produção superior a 100 milhões de toneladas e com cerca de 4,2 milhões de hectares de área cultivada (FAO, 2011). Elas estão entre as espécies de maior interesse sócio-econômico cujos frutos são empregados na alimentação humana, seja para consumo *in natura* seja na forma de produtos industrializados (especialmente sucos). As plantas cítricas também são fontes de óleos essenciais e pectina, destinados principalmente à indústria de cosméticos, podendo ainda ser utilizadas na preparação de ração animal (KOLLER, 1994).

Dentre os principais representantes de interesse econômico deste gênero podemos destacar *Citrus sinensis* (L.) (laranjeira doce), *C. reticulata* (tangerineira), *C. paradisi* Mac. f. (pomeleiro), *C. limon* (limoeiro siciliano), *C. aurantifolia* (limeira ácida), *C. aurantium* (laranjeira azeda), *C. medica* (cidreira) e *C. maxima* (Brum.) Merr. (toranjeira), assim como híbridos intra- e intergenéricos, tais como Citrange (laranjeira trifoliata × laranjeira doce), Citrumelo (laranjeira trifoliata × pomeleiro), Tangor

(laranjeira doce $\times$ tangerineira) e Tangelo (tangerineira $\times$ pomeleiro). Dentre esses, a laranja doce é o principal fruto cítrico cultivado, com aproximadamente 75% do total da produção mundial, seguido pela tangerina, pomelo e limão (SINGH e RAJAM, 2009).

O Brasil ocupa atualmente o primeiro lugar em produção mundial de frutos de citros. Do total de frutos colhidos na safra de 2009, 68,5 milhões de toneladas foram somente de laranja doce. Além do Brasil, países como Estados Unidos, Índia, China e México destacam-se como principais produtores mundiais (ver Gráfico 1; FAO, 2011). No Brasil, o Estado de São Paulo destaca-se como sendo a principal região produtora de frutos cítricos, com cerca de 79% do total da produção nacional, seguido por Minas Gerais, Bahia, Sergipe e Rio Grande do Sul (ZANON et al., 2008).

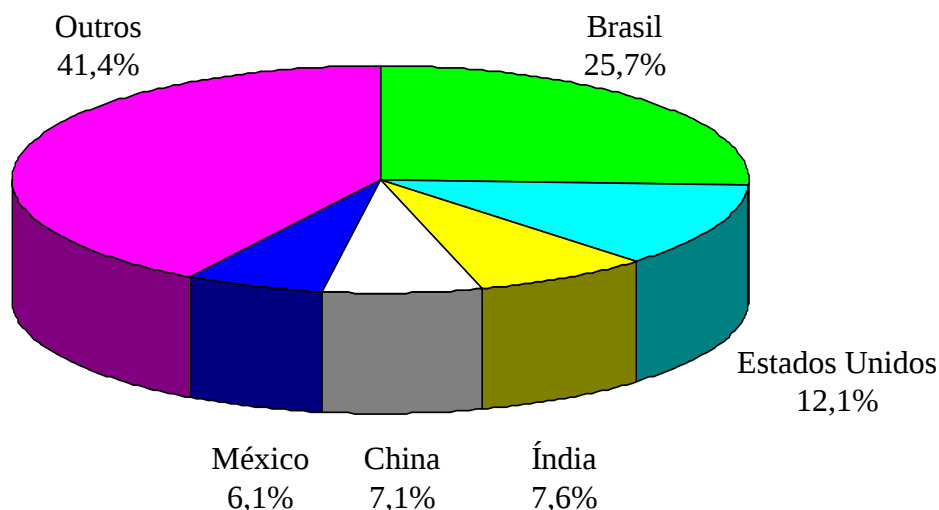


Gráfico 1. Representação da participação dos países na produção mundial (68.475.267 t) de laranja no ano de 2009 (Fonte: FAO, 2011).

Nos últimos anos, vários esforços em programas de melhoramento genético da cultura têm sido realizados visando melhorar as variedades existentes e/ou introduzir novas variedades com características favoráveis à comercialização, especialmente no que diz respeito à criação de triploides artificiais semelhantes à limeira ácida ‘Tahiti’, um triploide de origem natural altamente produtivo, com raras sementes e que atende às exigências da industrialização e do consumo *in natura* (GAYET et al., 1995; CALIXTO et al., 2004).

2.3.3. Taxonomia

Aurantioideae (Citroideae) é uma das sete subfamílias que compõem a família Rutaceae (ENGLER, 1931) sendo formada por 33 gêneros reunidos em duas tribos: a Clauseneae, com cinco gêneros, e a Citreae, com 38 gêneros, incluindo *Citrus* (WEBBER, 1967; SWINGLE e REECE, 1967). O gênero *Citrus* foi estabelecido por Carl Linneaus em 1753 (SWINGLE e REECE, 1967) e vem atraindo o interesse de vários pesquisadores (SWINGLE e REECE, 1967; TANAKA, 1977; NICOLSI et al., 2000; BAYER et al., 2009).

Os estudos das relações taxonômicas entre as espécies de *Citrus* foram baseados principalmente em características morfológicas, o que levou à formulação de numerosos sistemas de classificação. Vários taxonomistas divergem de opinião quanto ao número de representantes classificados como espécies para este gênero (SWINGLE, 1943; SWINGLE e REECE 1967; MALIK, 1973; TANAKA, 1977). Dentre os sistemas de classificação taxonômica mais comumente aceitos na atualidade para *Citrus* destacam-se o proposto pelos taxonomistas Walter T. Swingle (1943), constituído por 16 espécies distribuídas nos subgêneros *Papeda* (com seis espécies exclusivamente silvestres) e *Citrus* (demais espécies, todas de importância econômica), e Tyazôburô Tanaka (1977), que ampliou o número de espécies para 162, divididas nos subgêneros *Archicitrus* e *Metacitrus* (revisados por SWINGLE e REECE, 1967). A principal diferença encontrada entre estes taxonomistas diz respeito à classificação das tangerineiras. Enquanto Swingle reconheceu apenas três espécies (*C. reticulata*, *C. tachibana* e *C. indica*), Tanaka classificou-as em 36 espécies distintas.

A complexidade encontrada na taxonomia do gênero *Citrus* está provavelmente associada à fraca barreira reprodutiva existente entre as espécies de *Citrus* e gêneros próximos, o que permite a formação de híbridos interespecíficos férteis com características intermediárias. Outros fatores como a poliembrionia nucelar associada a modificações genéticas, a seleção de mutações somáticas, o longo histórico de cultivo assim como a ampla dispersão de seus representantes podem explicar as dificuldades encontradas pelos taxonomistas na delimitação de cada espécie (BARRET e RHODES, 1976).

Alguns estudos baseados em dados morfológicos e de taxonomia numérica sugerem que cidreira (*C. medica*), toranjeira (*C. maxima*) e tangerineira (*C. reticulata*) são espécies puras ou verdadeiras (SCORA, 1975; BARRETT e RHODES, 1976). As demais espécies cultivadas de *Citrus* pertencentes ao subgênero *Citrus* são

provavelmente híbridos derivados destas espécies verdadeiras e destas com representantes do subgênero *Papeda* ou de gêneros relacionados (MOORE, 2001). Esta ideia tem ganhado suporte a partir de estudos realizados com marcadores bioquímicos, moleculares e citogenéticos, assim como ampliado o número de espécies verdadeiras através da inclusão de novos exemplares como *C. deliciosa*, *C. reshni* e *C. sunki* a esta categoria (SCORA, 1988; FEDERICI et al., 1998; NICOLSI et al., 2000; MOORE, 2001; CARVALHO et al., 2005; MORAES et al., 2007 a,b).

2.3.4. Diversidade molecular e filogenia de *Citrus* e gêneros relacionados

Até meados dos anos 70, a taxonomia dos citros era principalmente baseada em dados morfológicos e geográficos, fato que resultou na criação de diversos sistemas de classificação. Compreender as relações taxonômicas e filogenéticas deste grupo, assim como conhecer a variabilidade genética existente entre seus representantes, são passos importantes para o aprimoramento de programas de melhoramento genético dos citros. Uma melhor caracterização do germoplasma dos citros permitirá explorar de forma mais eficiente a variabilidade existente, controlar mecanismos associados à erosão genética, além de desenhar estratégias de amostragem ou coleções de referência e registrar novas cultivares pertencentes ao gênero (HERRERO et al., 1996).

Vários estudos prévios empregaram marcadores bioquímicos e moleculares para caracterizar e analisar o nível de diversidade genética dos citros. Muito destes estudos têm como alvo específico um gênero isolado ou, algumas vezes, grupos relacionados. Os marcadores isoenzimáticos foram empregados com sucesso ao longo de vários anos em representantes da subfamília Aurantioideae, especialmente para distinguir embriões nucelares (clones da planta mãe) de zigóticos (oriundos de cruzamentos) (XIANG e ROOSE, 1988), para identificar cultivares cítricas diferenciadas pela reprodução sexual (TORRES et al., 1978; 1982) e caracterizar cultivares de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (KHAN e ROOSE, 1988), uma espécie proximamente relacionada ao gênero *Citrus* usada como porta enxerto. Adicionalmente, esta técnica foi usada para diferenciar tangerinas cultivadas e silvestres (XIAO et al., 1989; HIRAI et al., 1990), para discriminar e selecionar acessos do banco de germoplasma de laranja na China (CHEN et al., 1996), assim como para estudar a poliploidização e a endogamia em *C. volkameriana* V. Ten. & Pasq. (OLLITRAULT e JACQUEMOND, 1994).

Estudos isoenzimáticos realizados em tangerineira, laranjeira doce, limoeiro e pomeleiro revelaram uma baixa variabilidade genética entre eles. Porém, as limeiras e os limoeiros analisados apresentaram um alto percentual de heterozigosidade, fato que levou os autores a sugerir que este último grupo possui uma origem híbrida. Um dos últimos trabalhos usando isoenzimas avaliou 198 cultivares de *Citrus*, sendo que as mesmas foram divididas em dois grupos principais: um formado pelas laranjeiras e tangerineiras e outro constituído pelas limeiras, limoeiros, cidreira e pomeleiros (ASÍNS et al., 1998). Marcadores isoenzimáticos associados à RFLP e ISSR foram utilizados para investigar 48 acessos de laranjeira trifoliata propagados vegetativamente (FANG et al., 1997). Apesar do baixo polimorfismo genético detectado pelos dois primeiros marcadores, os autores conseguiram dividir esses acessos em quatro grupos baseados no polimorfismo de bandas detectado pela técnica de ISSR e sugeriram que as diferenças encontradas eram provavelmente resultantes de processos de mutação.

Vários outros marcadores moleculares derivados de PCR têm sido utilizados para analisar o nível de diversidade genética de *Citrus*. A técnica de RAPD foi utilizada para identificar limoeiros mutantes (DENG et al., 1995) e quimeras (SUGAWARA e OOWADA, 1995). Bretó et al. (2001) empregaram marcadores do tipo ISSR, RAPD assim como AFLP para examinar a variabilidade genética de 24 acessos de *C. reticulata* e observaram que apenas duas dentre as variedades puderam ser distinguidas. Fang e Roose (1997) utilizaram ISSR para distinguir cultivares de *Citrus* originadas por seleção de mutações espontâneas, bem como cultivares de *Poncirus* e um híbrido intergenérico (*C. sinensis* × *P. trifoliata*). Os autores comprovaram que o marcador empregado não foi eficaz para identificar todas as cultivares. Adicionalmente, outros marcadores como os microsatélites (SSRs) têm sido reconhecidos como uma boa fonte de marcadores genéticos em muitas plantas incluindo *Citrus* e *Poncirus* (AKKAYA et al., 1992; WU e TANKSLEY, 1993; KIJA et al. 1995).

Adicionalmente, vários marcadores moleculares têm sido empregados individualmente ou associados para suportar as relações filogenéticas e estabelecer o parentesco entre as espécies de citros (FANG et al., 1994). Como mencionado anteriormente, Scora (1975) e Barrett e Rhodes (1976), sugeriram existir somente três espécies verdadeiras (tangerineira, toranjeira e cidreira), sendo as demais cultivares de origem híbrida. Várias análises filogenéticas empregando marcadores bioquímicos e moleculares têm dado suporte a essa hipótese (ver MOORE, 2001).

Marcadores do tipo RFLP e RAPD foram empregados para investigar as relações filogenéticas de 88 acessos pertencentes a 45 espécies de *Citrus* e seis gêneros relacionados (FEDERICI et al., 1998). Além de avaliarem a diversidade genética deste grupo, estes autores determinaram que a cidra esteve envolvida na origem das limas e limões, que as espécies de tangerinas analisadas apresentam estreitas relações genéticas e a toranja possui relações com algumas espécies do subgênero *Papeda*. Além disto, os gêneros *Fortunella* e *Citrus*, ao contrário de *Microcitrus*, foram agrupados juntos.

Nicolosi e colaboradores (2000) estudaram as relações filogenéticas entre acessos de *Citrus* e dos gêneros relacionados, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus* e *Eremocitrus*, para inferir sobre a origem das espécies de citros. Os dados obtidos através da técnica de RAPD e SCAR indicaram que, dentre os gêneros estudados, *Fortunella* é filogeneticamente mais próximo de *Citrus*. Baseados nas informações de DNA nuclear e cloroplastidial, os autores afirmaram que existem divergências entre as relações dos representantes de *Citrus*. Os resultados obtidos a partir do DNA cloroplastidial indicaram que a toranjeira e a cidreira participaram como doadores de gametas materno e paterno, respectivamente, destinados a formação de alguns híbridos do gênero.

Em outro trabalho desenvolvido empregando os marcadores isoenzimáticos, ISSR e SSR avaliou o nível de diversidade genética, as relações filogenéticas e o parentesco existentes entre acessos de limoeiro (*C. limon*) e táxons relacionados. Entretanto, pouca variação genética foi encontrada dentre os materiais analisados (GULSEN E ROOSE, 2001).

Análises de sequências de DNA cloroplastidial (*trnL-trnF* e *trnT-trnL*) deram suporte ao clado formado pelos gêneros *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella* e *Microcitrus*, mas não deram suporte à hipótese de monolifetismo de *Citrus* (ARAÚJO et al., 2003). Curiosamente, as análises baseadas em sequências *trnL-trnF* e no íntron da *rps16*, confirmaram que as tribos Clauseneae e Citreae não possuem origem monofiléticas, ao contrário do que foi verificado na subfamília Aurantioideae. Dados de sequências de DNA cloroplastidial também deram algumas pistas sobre os progenitores (toranja, tangerina e cidra) dos citros cultivados (BAYER et al., 2009). Embora este estudo tenha fornecido informações úteis, os resultados nem sempre corroboraram as propostas prévias de origem e taxonomia dos citros.

Outro trabalho foi desenvolvido utilizando 24 marcadores de microssatélites a fim de determinar a diversidade genética e a relação filogenética de 370 acessos de citros. As análises indicaram que alguns de seus acessos, classificados como

pertencentes ao grupo dos não híbridos, eram, na verdade, híbridos ou derivados, como foi observado para alguns acessos de cidreira. Os resultados obtidos por estes autores também sustentam a hipótese de que cidreira, tangerineira e pomeleiro estiveram envolvidos na formação de diversos híbridos. Além disso, o gênero *Fortunella* foi agrupado dentro de *Citrus* e *Poncirus* como um gênero irmão de *Citrus* (BARKLEY et al., 2006).

Relações filogenéticas estabelecidas pelo marcador AFLP revelaram que os gêneros *Atalantia* e *Severinia* são os mais distantes quando comparados aos representantes do grupo dos citros verdadeiros (*Citrus*, *Poncirus*, *Eremocitrus*, *Fortunella* e *Microcitrus*) e que os acessos do gênero *Citrus* estão mais proximamente relacionados com os de *Fortunella* e *Poncirus*. Contudo, as relações entre as espécies, não ficaram claramente resolvidas ao nível de subgênero. Adicionalmente, o agrupamento observado de *C. halimii* B. C. Stone com um representante de *Fortunella* levou os autores a sugerir que esta laranjeira azeda não é uma espécie pura (PANG et al., 2007).

Semelhantemente, a diversidade genética e as relações de 86 espécies de *Citrus* e de outros membros da subfamília Aurantioideae, usando marcadores do tipo SRAP. Foi verificado que dentro da subtribo Citrinae, somente as espécies do grupo dos citros verdadeiros ficaram claramente separadas, porém tal separação não foi observada ao nível de subgênero. Além disso, os dados obtidos dão suporte à hipótese de que *C. medica*, *C. reticulata* e *C. maxima* são espécies verdadeiras e estiveram envolvidas na formação de vários híbridos deste gênero (UZUN et al., 2009).

Por meio da análise de 30 acessos de citros cultivados e seus prováveis progenitores silvestres através de marcadores do tipo AFLP, espaçador inter gênico nuclear (ITS), assim como três regiões de DNA plastidial (*psbH-petB*, *trnL-trnF* e *trnS-trnG*) foi sugerido que o gênero *Citrus* é monofilético (LI et al., 2010). Além disso, os autores propuseram quais seriam os prováveis parentais materno e paterno das laranjeiras doce e azeda, dos limoeiros e dos pomeleiros.

2.3.5. Mapas de ligação em Aurantioideae

Muitos dos trabalhos voltados à subfamília Aurantioideae se propõem a desvendar os principais mecanismos envolvidos na determinação de características de interesse econômico dos principais representantes de *Citrus*. É sabido que as espécies de

Citrus possuem um genoma relativamente pequeno, como observado em *C. sinensis* (aproximadamente 367 Mb) (ARUMUGANATHAN e EARLE, 1991). Algumas características desejadas não são encontradas neste gênero, como é o caso da tolerância ao frio e ao cancro cítrico (causado pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) presente em *Fortunella*. Além deste, *Poncirus*, um gênero monoespecífico constituído pela espécie *P. trifoliata*, tem chamado a atenção de diversos pesquisadores dos citros pela tolerância a estresses abióticos e resistência ao vírus da tristeza dos citros (*Citrus Tristeza Vírus* – Ctv), a *Phytophthora* e ao nematoide dos citros (*Tylenchulus semipenetrans*) (TALON e GMITTER Jr., 2008).

Vários estudos em *Citrus* têm tentado construir mapas de ligação que permitam a criação de esquemas de seleção associados a marcadores moleculares neutros capazes de substituírem os métodos de caracterização fenotípica (demorados e ineficientes) empregados neste grupo. O primeiro mapa de ligação em citros foi baseado em marcadores isoenzimáticos, usando uma pequena família intragenérica de *Citrus* e uma família maior resultante do cruzamento de *Citrus* e *Poncirus* (TORRES et al., 1985). Cinco marcadores foram encontrados e definiram dois grupos de ligação. Os autores também reportaram pela primeira vez o desequilíbrio de ligação entre marcadores. À medida que a técnica de RFLP passou a ser frequentemente aplicada em análises genéticas, novos trabalhos passaram a ser desenvolvidos em associação com os métodos isoenzimáticos. Um novo mapa foi estabelecido por meio desta abordagem, apresentando 35 marcas distribuídas em oito grupos de ligação, com uma cobertura de 314 cM (LIOU, 1990).

Além destes, Durham e colaboradores (1992) construíram um mapa de ligação, a partir de 52 marcas, 11 grupos de ligação com 533 cM de cobertura, derivados de uma família de retrocruzamento intergenérico. Outro mapa foi criado a partir de 35 marcas, as quais definiram 10 grupos de ligação (351 cM de cobertura), resultantes de uma população derivada de dois híbridos intergenéricos (JARRELL et al., 1992).

Empregando marcadores RAPD, Cai e colaboradores (1994) aumentaram o número de marcadores do mapa de Durham et al. (1992) de 52 para 189 e diminuíram o número de grupos de ligação para nove (cobertura de 1192 cM). Sankar e Moore (2001) aumentaram a cobertura no mesmo mapa para 310 marcadores através do uso da técnica de ISSR. De maneira semelhante, o mapa de Jarrell et al. (1992) foi melhorado através da incorporação de loci SSR (KIJAS e THOMAS, 1997) e, posteriormente, através de 156 marcas obtidas via ISSR, definidos por 16 grupos de ligação e 701 cM de cobertura

(ROOSE et al., 2000). Muitos outros mapas genéticos foram produzidos destinados a identificação de genes únicos ou regiões de QTL de significância (ver CHEN et al., 2007).

Os marcadores SCARs foram desenvolvidos para os citros inicialmente por Deng e colaboradores (1997) e se baseavam em marcadores RAPD estreitamente ligados ao gene *Ctv* (GMITTER et al., 1996). Entretanto, nenhum polimorfismo foi revelado sem que se realizasse restrição, sendo assim convertidos para CAPS. Semelhantemente, Garcia e colaboradores (1999) usaram CAPS junto com RFLP, RAPD e isoenzimas para mapear genes associados a apomixia em *Citrus* e *Poncirus*. Embora marcadores co dominantes como RFLP, SSR, SCAR, CAPS e SNPs tenham sido usados, o número de loci polimórficos foi limitado. Consequentemente, há uma limitação para se interrelacionar mapas e/ou marcadores em diferentes populações ou diferentes segmentos de QTLs, e existem poucos marcadores cromossomo-específicos ancorados que poderiam permitir o mapeamento comparativo entre diferentes recursos genéticos de citros.

Omura e colaboradores (2000; 2001) desenvolveram pela primeira vez marcadores CAPS derivados de sequências de EST. Usando uma população de citros retrocruzada, os autores identificaram 131 marcas distribuídas em nove grupos de ligação (cobertura de 685 cM). Mediante a ampliação e disponibilização pública de bases de dados (OMURA et al., 2001) e programas, têm sido realizadas pesquisas em larga escala a fim de reconhecer vários tipos de assinaturas (*motifs*) de SSR e o desenho de iniciadores (*primers*) apropriados tornaram possíveis a identificação e mapeamento de EST-SSRs em citros (CHEN et al., 2006; 2007). O primeiro mapa de EST-SSRs de laranja doce e *P. trifoliata* foi publicado (CHEN et al., 2007) e está sendo expandido de forma colaborativa (LYON et al., 2007). Novas colaborações para o mapeamento EST-SSR estão em andamento (LURO et al., 2007) utilizando outras bases de citros como parte de um plano destinado ao sequenciamento do genoma haploide de citros, objetivando a integração dos mapas físico e genético, bem como o mapeamento de características de interesse econômico para o melhoramento genético dos citros.

2.3.6. Bibliotecas de cromossomos artificiais de bactérias (BACs) e mapas físicos dos *Citrus* e gêneros relacionados

Somente no início do século XXI foram construídas as primeiras bibliotecas de cromossomos artificiais de bactérias (*Bacterial Artificial Chromosome* – BACs) com o intuito de identificar clones BACs associados ao loco *Ctv*, de resistência ao vírus da tristeza dos citros (CTV). Este vírus tem causado danos significativos à cultura e prejuízos econômicos entre os citricultores de todo o mundo. Para clonar este gene, Yang e colaboradores (2001) construíram uma biblioteca com 45.000 clones BACs com insertos de aproximadamente 80 kb, a partir de uma planta homozigota para o *Ctv*. Inicialmente, o gene do *Ctv* foi mapeado numa região de 282 kb que continha outros genes de resistência a doenças e um grupo de oito retrotransposons (YANG et al., 2003). A análise da sequência do *Ctv* realizada em *Poncirus* permitiu localizar o locus numa região de 121 kb composta por dez genes. Estes genes foram clonados individualmente e usados para transformar variedades susceptíveis para testar sua capacidade de resistência (RAÍ, 2006).

Ao mesmo tempo, uma biblioteca de 24.000 clones BACs, com insertos de tamanho médio de 115 kb, foi construída a partir do DNA genômico de um híbrido intergenérico de *Citrus* e *Poncirus*, sendo destinada ao isolamento de genes de resistência a doenças dos citros (DENG et al., 2001). Sua caracterização e montagem resultou na identificação de 25 contíguos (*contigs*) com tamanho variando entre 120 e 250 kb. Bibliotecas adicionais foram desenvolvidas a partir de alguns híbridos intergenéricos com o propósito de construir o mapa base de clonagem do *Ctv*. Esses clones foram totalmente sequenciados, montados e comparados, mas foi observado que os alelos de resistência e suscetibilidade variaram pouco de região a região (TALON e GMITTER Jr., 2008).

Vários esforços também têm sido destinados à construção de mapas físicos de citros. O Consórcio Espanhol da Genômica de *Citrus* construiu três bibliotecas de BACs da tangerina clementina (*EcoRI*, *Hind III* e *MboI*) composta por 57.000 clones com insertos de aproximadamente 120 kb (cobertura de 19x). Metade destes clones BACs foram sequenciados pelos terminais (*BAC end sequence* – BES) e analisados (TEROL et al., 2007), revelando que dentre os retroelementos encontrados, os mais abundantes foram os LTRs, especialmente dos tipos *Ty1-copia* (RICO-CABANAS e MARTÍNEZ-IZQUIERDO, 2007) e *Ty3-gypsy* (BERNET e ASÍNS, 2003), enquanto que os transposons de DNA foram escassos. Os BESs também foram usados para identificar polimorfismo em nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs) e microssatélites (SSRs) (ver TALON e GMITTER Jr., 2008).

O Grupo da Análise do Genoma de *Citrus* do Japão (*The Citrus Genome Analysis Team from Japan*) comunicou a construção de um mapa físico a partir de uma biblioteca de BACs da tangerina Satsuma (*Citrus unshiu* Marc.) constituída por 37.000 clones com 13.3x do genoma cítrico (SHIMIZU et al., 2007). Mais de 6.000 clones BACs desta biblioteca foram marcados após digestão com *Bam*HI, *Eco*RI, *Xba*I e *Xho*I e reunidos em aproximadamente 1.000 *contigs* (equivalente a uma cobertura de 1,6x). A análise destes *contigs* tem permitido montar e preencher as lacunas do sequenciamento desta espécie cítrica (SHIMIZU et al., 2007).

Uma biblioteca de BACs de laranja doce com cobertura de 7x foi produzida, sendo formada por 18.432 clones (*Bam*HI/*Mbo*I) com insertos de aproximadamente 145 kb. Um total de 16.727 clones desta biblioteca foram caracterizados e agrupados em 472 *contigs*. A integração dos mapas físicos e genéticos é uma prioridade na genômica dos citros, uma vez que irá fornecer ferramentas essenciais para a pesquisa do genoma dos citros, tais como uma clonagem posicional eficaz, desenvolvimento de marcadores, alto rendimento no mapeamento de EST, e sequenciamento e montagem do genoma em larga escala (TALON e GMITTER Jr, 2008).

2.3.7. Citogenética clássica e bandeamento cromossômico em *Citrus*

Os primeiros estudos citogenéticos reportados para o gênero *Citrus* foram realizados por Strasburger (1907) e Osawa (1912), os quais definiram o número cromossômico básico deste grupo como sendo $x = 8$ (citado por KRUG, 1943). Posteriormente, Frost (1925) estudando meiócitos de laranja doce e pomeleiro, constatou que o verdadeiro número cromossômico haploide de espécies de citros era $n = 9$. Este número foi posteriormente confirmado neste grupo e em gêneros proximamente relacionados (KRUG e BACCHI 1943; GUERRA et al., 1997; CARVALHO et al., 2005; BARROS e SILVA et al., 2010).

Outros trabalhos que empregaram a coloração convencional Feulgen, Giemsa ou corantes acéticos revelaram que membros da subfamília Aurantioideae possuem cromossomos pequenos, muito similares em tamanho (1 a 3,5 μ m) e morfologia com poucos marcadores que permitam a distinção de seus cromossomos e cariótipos (GUERRA et al., 1997; GUERRA, 2009).

Além disso, foi constatado que a grande maioria das Aurantioideae apresenta $2n = 18$, sendo raramente observados indivíduos poliploides (FROST, 1925; KRUG, 1943;

ARAÚJO e ROQUE, 2005). Dentre os poliploides, destaca-se o limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tan.) que é um triploide natural ($2n = 3x = 27$) detentor de várias características de interesse econômico, como alta produtividade, raras sementes por frutos, bem como outras características apropriadas para o consumo e industrialização (GAYET et al., 1995). A forma tetraploide geralmente é originária da duplicação cromossômica de células do tecido nucelar (apogâmica) (CAMERON e FROST, 1968) e não possui valor comercial, uma vez que apresenta baixo porte e crescimento lento, além de frutos geralmente pequenos e com formato irregular. Contudo, alguns tetraploides são utilizados como porta-enxerto ou como doadores de gametas destinados à obtenção de plantas triploides (STARRANTINO e RECUPERO, 1981; MACHADO et al., 2005; LATADO et al., 2007).

Tais particularidades cariotípicas, por muitos anos, dificultaram a realização de pesquisas citogenéticas neste grupo (CHEN e LIANG, 1989; LIANG, 1990). O emprego de técnicas de coloração diferencial trouxe novas perspectivas para a comparação das espécies de *Citrus*. Onze cultivares de *C. sinensis* foram, por exemplo, analisadas via coloração com Giemsa e impregnação com nitrato de prata (AgNO_3) tendo sido observadas duas constrições secundárias na grande maioria das metáfases mitóticas, situadas nas regiões proximal e subterminal de um cromossomo maior e outro menor, respectivamente (PEDROSA et al., 1997). Algumas metáfases apresentaram três constrições secundárias. Entretanto, foi constatada uma frequência máxima de dois sítios ativos por célula. Os autores sugeriram que diferenças no número de *repeats* de DNAr das RONS podem estar associadas à ativação diferencial destes sítios.

As análises realizadas com a técnica de bandeamento C demonstraram a presença de vários blocos heterocromáticos terminais e proximais nos cromossomos de *Citrus* (GUERRA, 1985). Entretanto, esta técnica apresentou algumas limitações, especialmente no que diz respeito à conservação da morfologia cromossômica e à reprodutibilidade do padrão de bandas C, inclusive em metáfases de uma mesma lâmina (GUERRA, 1985; LIANG, 1988; WEI et al., 1988).

2.3.8. Bandeamento com fluorocromos e FISH

O primeiro trabalho a empregar os fluorocromos CMA e DAPI em representantes de *Citrus* revelou que seus cromossomos apresentavam muitas bandas CMA brilhantes e DAPI neutras ($\text{CMA}^+/\text{DAPI}^0$) distribuídas principalmente nas regiões

terminais do braço longo de alguns cromossomos (GUERRA,1993). Os resultados obtidos comprovaram que as bandas CMA/DAPI frequentemente se correlacionavam com o padrão obtido pela técnica de bandeamento C, com a vantagem de ser um método mais prático, reproduzível e por preservar melhor a morfologia cromossômica.

Desde então, a identificação cromossômica de *Citrus* e gêneros correlacionados passou por grandes avanços (MIRANDA et al., 1997a; BEFU et al., 2000; 2001). Baseado na distribuição e no número de bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI, Guerra (1993) e Carvalho et al. (2005) descreveram os seguintes tipos cromossômicos: **A** (duas bandas CMA⁺ terminais e uma proximal), **B** (uma banda CMA⁺ terminal e uma proximal), **C** (duas bandas CMA⁺ terminais), **D** (uma banda CMA⁺ terminal), **E** (uma banda CMA⁺ intersticial), **F** (sem banda CMA⁺), **G** (duas bandas CMA⁺ localizadas no mesmo braço cromossômico, uma subterminal e outra terminal) e **H** (uma banda CMA⁺ proximal) (ver figura 2). O tipo **F_L**, que é o maior (*largest*) entre os cromossomos Fs do cariótipo, pode se apresentar também sem banda (**F_L⁰**) ou com uma pequena banda (**F_L⁺**). Existe outra proposta adotada por Miranda e colaboradores (1997a) e por Yamamoto e Tominaga (2003) que se baseia na nomenclatura cromossômica adotada por Guerra (1993) para os citros, mas que denominaram o cromossomo sem banda como sendo do tipo E.

Os tipos cromossômicos D e F são encontrados em todos os cariótipos dos acessos de *Citrus* estudados, enquanto que os tipos A, B, C, E, G e H são raros e normalmente utilizados como marcadores cariotípicos para a diferenciação de acessos deste gênero (CORNÉLIO et al., 2003; CARVALHO et al., 2005; MORAES et al., 2007 a,b; GUERRA, 2009) e de outros relacionados (BRASILEIRO-VIDAL et al., 2007).

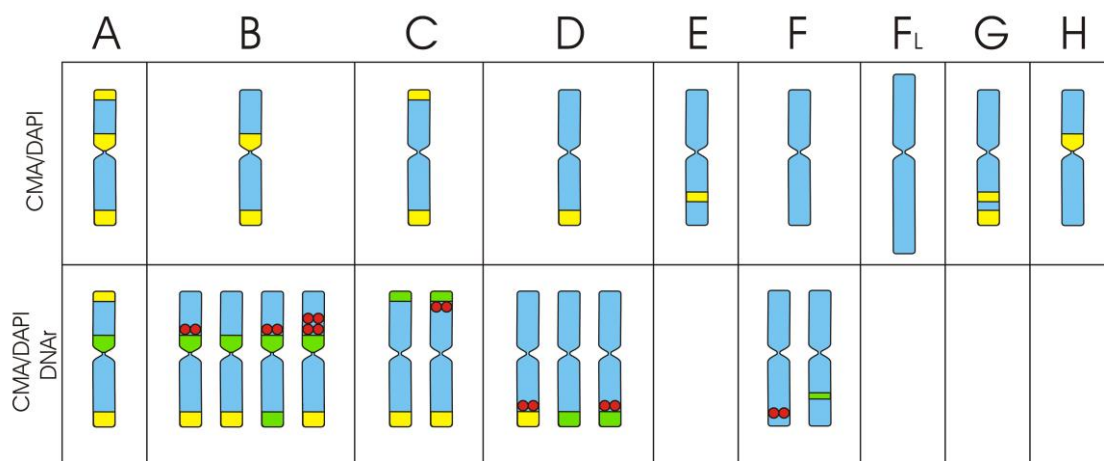


Figura 2. Classificação dos tipos e subtipos cromossômicos de *Citrus* e gêneros relacionados baseados na distribuição das bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI⁻ (em amarelo), assim como na localização dos sítios de DNAr 5S (em vermelho) e 45S (em verde) (adaptado de GUERRA, 1993; MIRANDA et al., 1997b; PEDROSA et al., 2000; CARVALHO et al., 2005; BRASILEIRO-VIDAL et al., 2007; MORAES et al., 2007 a,b; GUERRA, 2007; BARROS e SILVA et al., 2010).

A detecção dos sítios de DNAr 5S e 45S, por meio da FISH, combinada com a técnica de bandeamento fluorescente CMA/DAPI, permitiu que o número de marcadores cariotípicos de *Citrus* e gêneros relacionados fosse ampliado a partir do reconhecimento de 12 subtipos cromossômicos: A/45S (tipo A com um sítio de DNAr 45S colocalizado com a banda CMA⁺ proximal), B/45S (tipo B com um sítio de DNAr 45S colocalizado com a banda CMA⁺ proximal), B/5S-45S (tipo B com um sítio de DNAr 5S adjacente ao DNAr 45S colocalizado com a banda CMA⁺ proximal), B/45S-5S-45S (tipo B com um sítio de DNAr 5S adjacente ao DNAr 45S colocalizado com a banda CMA⁺ proximal e outro sítio de DNAr 45S colocalizado com a banda CMA⁺ terminal), B/5S-45S-5S (tipo B com dois sítios de DNAr 5S adjacente ao DNAr 45S colocalizado com a banda CMA⁺), C/45S (cromossomo C com um sítio de DNAr 45S colocalizado com uma das bandas CMA⁺ terminais), C/5S-45S (cromossomo C com um sítio de DNAr 5S adjacente ao sítio de DNAr 45S colocalizado com uma das bandas CMA⁺ terminais), D/5S (tipo D com um sítio de DNAr 5S), D/45S (tipo D com um sítio de DNAr 45S colocalizado com a banda CMA⁺), D/5S-45S (tipo D com um sítio de DNAr 5S adjacente ao sítio de DNAr 45S colocalizado com a banda CMA⁺), F/5S (tipo F com um sítio de DNAr 5S subterminal) e F/45S (tipo F com um sítio de DNAr 45S situado na posição intersticial do braço longo) (ver figura 2) (MIRANDA et al., 1997b; PEDROSA et al., 2000; CARVALHO et al., 2005; BRASILEIRO-VIDAL et al., 2007; MORAES et al., 2007 a,b; GUERRA, 2007; BARROS e SILVA et al., 2010).

O padrão de distribuição de bandas CMA⁺/DAPI⁻ foi determinado para vários citros, como os pertencentes aos gêneros *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella*, e comprovou-se que existiam semelhanças nos padrões de distribuição das bandas heterocromáticas dos dois primeiros gêneros, enquanto que o padrão de bandas de *Fortunella* foi o mais divergente (MIRANDA et al., 1997a)

A análise de acessos de tangerina e de híbridos interespecíficos de tangerina e espécies relacionadas a *Citrus* via dupla coloração CMA/DAPI, permitiu reconhecer que alguns dos acessos analisados possuíam cariótipo altamente homomórfico (*C. sunki*, *C. reshni*, *C. deliciosa* e *C. reticulata* cv. Cravo), enquanto que os demais eram

heteromórficos, o que provavelmente está associado à origem híbrida dos acessos. Baseados nas informações obtidas, os autores sugeriram que as espécies com cariótipos homomórficos seriam os melhores candidatos para representar *C. reticulata* (sensu Swingle) como uma espécie verdadeira (CORNÉLIO et al., 2003).

Por meio desta técnica também foi possível reconhecer a origem híbrida de citrange (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) e do complexo tri-genérico *Fortunella* x citrange (ABKENAR et al., 2007).

Um dos primeiros trabalhos que empregou a citogenética molecular em *Citrus* analisou a distribuição dos sítios de DNAr 26S e a disposição do DNA telomérico em *C. sinensis* e constataram que os sítios de DNA ribossomal coincidiram com as regiões CMA⁺/DAPI⁻ (Matsuyama et al., 1996). Em um trabalho posterior, foi demonstrado que o padrão de distribuição das bandas CMA⁺/DAPI⁻ e dos sítios de DNAr 5S e 45S de *C. sinensis* é o mesmo, independentemente da cultivar analisada (PEDROSA et al., 2000). Um alto nível de heterozigotidade cromossômica em espécies de *Citrus*, *Poncirus* e híbridos relacionados foi verificado por meio das técnicas de FISH de DNAr 5S e 45S associadas ao bandeamento CMA/DAPI (ROOSE et al., 1998; GUERRA et al., 2009).

Além destes, vários outros trabalhos que empregaram essas técnicas comprovaram o homomorfismo cariótipo das três espécies consideradas verdadeiras bem como deram suporte a teoria de que estas estiveram envolvidas na formação de vários híbridos intra- e intergenéricos, detentores de cariótipos heteromórficos (BEFU et al., 2001; YAMAMOTO e TOMINAGA, 2003; CARVALHO et al., 2005; MORAES et al., 2007 a,b; BARROS e SILVA et al., 2010).

2.3.9. Hibridização de sequências de DNA satélites em Aurantioideae

O DNA satélite (DNAsat) é um tipo de sequência altamente repetitiva que pode estar dispersa pelo genoma ou organizada em blocos de centenas ou milhares de “repeats” dispostos em tandem, sendo estes situados principalmente em regiões de heterocromatina constitutiva presentes nos centrômeros e/ou telômeros de cromossomos eucariotas (CHARLESWORTH et al., 1994). Juntamente com os retrotransposons e os repeats em tandem (como, por exemplo, os segmentos codificantes de DNAr) o DNAsat está entre as que mais contribuem na diferenciação do tamanho de genomas eucariotas (KIDWELL, 2002). Estudos realizados na subfamília Aurantioideae

revelaram que 20 a 25% do genoma de alguns representantes são constituídos por DNAsat (FANN et al., 2001; DE FELICE et al., 2006).

É sabido que os mecanismos evolutivos podem atuar sobre a identidade das unidades de repetição constituintes de uma família de DNAsat ao ponto de separá-las em subfamílias distintas (ELDER e TURNER, 1995; PONS et al., 2002). Um exemplo disso foi observado nos gêneros *Poncirus* e *Citrus* cujas repetições das sequências de DNAsat são completamente distintas, tanto em tamanho como em constituição (DE FELICE, et al., 2006; BARROS e SILVA et al., 2010) (ver Figura 3).

Mesmo representando uma parte substancial do genoma de plantas, pouco se sabia acerca dos mecanismos moleculares de amplificação dos *repeats* satélites bem como qual seria seu papel na evolução e funcionamento de genomas (MACAS et al., 2002). Pesquisas realizadas na família Rutaceae apontaram que sequências satélites se espalharam e se amplificaram antes da especiação de seus representantes (DE FELICE et al., 2006) e que possivelmente estão relacionadas com a organização de sua heterocromatina (UGARKOVIC e PLOHL, 2002).

a.

CCGCGGGCAC	AGCCGCGCCC	AAAAATACCC	GCCCGAAGGC	CGGGGCGCCA	50
AGTTCTGTCCA	GCGGAAAAAG	GCCACAAAAA	CGGGTGGGCT	ATAGCCTTGG	100
GGGGTGGGGC	TGGCCAACTT	CGTCCGCCGG	ACTCGGAATG	GCGCGAGACT	150
TTGCGAGGGG	CCTCCGTGTG	CCAAAAATAG	G		181

b.

TGGAATAGGT	GGCTCTATGT	CAAGGTCTTC	CTCCTCCTCT	TCTTGAATAA	50
TATGGTTCTT	TCTGGTTTTG	GACTGGGATG	GGATGGGTGG	TTCCTCACGT	100
TCTTGCTCTG	ACTGCTCTTC	TGCCTTTGAG	GGTGAGCTAT	CAGTCTCAGA	150
TTGGTCACCT	TCATCCTCAG	GTGGGTCAGA	TGGTTTAGCA	TTTTCTGAGT	200
CAACTGCTGG	TTCATCTGAA	ACAGTGGCTT	CTTCACTGGT	CTTTGCTGGA	250
GCACCTGTGG	TGCTAGTGTC	AAAATTATAT	TGCTGAAACG	GGGAGACAGG	300
GGGATCCTCT	GTCAATCTGA	ATTCGTCGAC	AAGCTTCTCG	AGCCTAGGCT	350
AGCTCTAGAC	CACACGTGTG	GGGGCCCGAG	CTCGCGGCCG	CTGTATTCTA	400

Figura 3. Sequência consenso do principal DNA satélite: (a) CsSat181 de *C. ichangensis*, segundo Beridze et al. (1992), e (b) PN400 de *Poncirus trifoliata*, adaptado de De Felice et al. (2006) e Barros e Silva et al. (2010).

De fato, análises citogenéticas realizadas em representantes de *Citrus* e gêneros relacionados (BARROS e SILVA et al., 2010) confirmaram que a maioria das bandas heterocromáticas CMA⁺/ DAPI⁻ das espécies de *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella* estão representadas pela sequência de DNAsat (CsSat) ou sítios de DNAr 45S, permanecendo alguns blocos com sequências ainda desconhecidas. Contudo, nos exemplares estudados de *Atalantia*, *Triphasia*, *Murraya* e *Severinia* foram observados alguns sítios de DNAr 45S colocalizados as bandas heterocromáticas CMA⁺/ DAPI⁻, mas nenhum sinal da sonda CsSat foi reconhecido. É provável que outras famílias de DNAsat possam estar relacionadas à formação destas bandas heterocromáticas em Aurantioideae (DE FELICE et al., 2006).

2.3.10. Citogenética molecular comparativa

O emprego do método de dupla coloração com os fluorocromos CMA e DAPI associado à FISH tem revelado uma ampla variação no número e distribuição de bandas heterocromáticas CMA⁺/ DAPI⁻ e sítios de DNAr 5S e 45S em muitas espécies de *Citrus* e gêneros relacionados (MIRANDA et al., 1997b; PEDROSA et al., 2000; CORNÉLIO et al., 2003; YAMAMOTO e TOMINAGA, 2003; CARVALHO et al., 2005; BRASILEIRO-VIDAL et al., 2007; MORAES et al., 2007 a,b; GUERRA, 2007; BARROS e SILVA et al., 2010).

Mesmo dispondo de tais ferramentas, a caracterização cromossômica tem sido limitada, uma vez que nem todos os cromossomos do complemento têm sido reconhecidos, bem como as homeologias cromossômicas existentes entre as espécies relacionadas. Na tentativa de contornar este problema, vetores com capacidade de clonar grandes insertos, tais como os BACs, passaram a ser amplamente utilizados em vários estudos em espécies vegetais. Em 2008, 13 clones BACs de cópia única foram selecionados de uma biblioteca genômica de *P. trifoliata* (YANG et al., 2001) o que, juntamente com o padrão de bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI⁻ e a distribuição de sítios de DNAr, permitiu que todos os cromossomos de *P. trifoliata* fossem reconhecidos (MORAES et al., 2008).

O primeiro mapa citogenético comparativo para o gênero *Citrus* foi construído para cidra (*C. medica*) utilizando os mesmos marcadores empregados para *P. trifoliata* (MENDES et al., 2011). Baseado na fórmula cariotípica estabelecida para estas duas espécies (CARVALHO et al., 2005; BRASILEIRO-VIDAL et al., 2007) seria esperado

que houvesse uma alta conservação dos tipos cromossômicos de ambas as espécies, sendo as mesmas diferenciadas por apenas um par cromossômico (B em *P. trifoliata*/ F em *C. medica*). Contudo, quando compararam os mapas citogenéticos, foi verificado que havia diferenças em seis dos nove pares destes cariótipos, e que estas poderiam ter sido causadas pela contração e/ou expansão de sequências de DNA repetitivo, associados possivelmente a inversões pericêntricas (MENDES et al., 2011).

Desta maneira, esses marcadores passaram a constituir importantes ferramentas para a identificação cromossômica de outras espécies de citros, assim como para a compreensão da evolução cromossômica nesse grupo. Desse modo, a construção dos mapas citogenéticos de tangerina (*C. reticulata*) e toranja (*C. maxima*) seria de grande importância para a compreensão das homeologias e mudanças cromossômicas envolvidas na evolução de *Citrus*, assim como para o reconhecimento das relações parentais destas espécies (juntamente com cidra) e dos híbridos deste gênero.

3. Referências Bibliográficas

- ABKENAR AA, MATSUMOTO R, TANAKA S, KATAYAMA Y (2007) Parental chromosome differentiation in citrangequat [*Fortunella* sp. x (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*)] using CMA banding patterns. *Sci Hortic*, 114:74–76.
- ADAM-BLONDOM AF, SÉVIGNAC M, BANNEROT H, DRON M (1994) SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (*Are*) conferring resistance to anthracnose in common bean. *Theor Appl Genet*, 88:865–870.
- AGGARWAL RK, BRAR DS, NANDI S, HUANG N, KHUSH GS (1999) Phylogenetic relationships among *Oryza* species revealed by AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 98:1320–1328.
- AHMAD GM, KUDESIA SR, SRIVASTAVA MK (2010) Evaluation of genetic diversity in pea (*Pisum sativum* L) using RAPD analysis. *Genet Eng Biotechnol J*, Volume GEBJ-16.
- AHMAD R, POTTER D, SOUTHWICK M (2004) Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers. *J Am Soc Hort Sci*, 129:204–210.
- AKKAYA MS, BHAGWAT AA, CREGAN PB (1992) Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132:1131–1139.
- ARAÚJO EF, QUEIROZ LP, MACHADO, MA (2003) What is *Citrus*? Taxonomic implications from a study of cp-DNA evolution in the tribe Citreae (Rutaceae subfamily Aurantioideae). *Org Divers Evol*, 3:55–62.
- ARAÚJO EF, ROQUE N (2005) Taxonomia dos citros In: MATTOS JÚNIOR D, NEGRI JD, PIO RM, POMPEU JÚNIOR J (eds.). *Citros*. Campinas: IAC, p. 125–145.
- ARUMUGANATHAN K, EARLE ED (1991) Nuclear DNA content of some 479 important plant species. *Plant Mol Biol Rep*, 9:208–218.
- ASÍNS MJ, MESTRE PF, HERRERO R, NAVARRO L, CARBONELL EA (1998) Molecular markers: a continuously growing biotechnology area to help *Citrus* improvement. *Fruits*, 53:293–302.
- AVRAMOVA ZV (2002) Heterochromatin in Animals and Plants. Similarities and Differences. *Plant Physiol*, 129:40–49.
- AZKUE D (2000) Chromosome diversity of South American *Oxalis* (Oxalidaceae). *Bot J Linn Soc*. 132:143 –152.
- BARKLEY NA, ROOSE ML, KRUEGER RR, FEDERICI CT (2006) Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theor Appl Genet*, 112:1519–1531.

- BARRETT HC, RHODES AM (1976) A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Syst Bot* 1:105–136.
- BARROS E SILVA AE, MARQUES A, SANTOS KGB, GUERRA M (2010) The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. *Chromosome Res*, 18:503–514.
- BAYER RJ, MABBERLEY DJ, MORTON C, MILLER CH, SHARMA IK, PFEIL BE, RICH S, HITCHCOCK R, SYKES S (2009) A molecular phylogeny of the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) using nine cpDNA sequences. *Amer J Bot*, 96:668–685.
- BEFU M, KITAJIMA A, LING YX, HASEGAWA K (2000) Classification of ‘Tosa-Buntan’ pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.), ‘Washington’ navel orange (*C. sinensis* [L.] Osb.) and trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) chromosomes using young leaves. *J Japan Soc Hort Sci*, 69:22–28.
- BEFU M, KITAJIMA A, HASEGAWA K (2001) Chromosome composition of some *Citrus* species and cultivars based on the chromomycin A₃ (CMA) banding patterns. *J Japan Soc Hort Sci*, 70: 83–88.
- BENNETT MD, LEITCH IJ (1995) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann Bot*, 76:113–176.
- BERIDZE T, TSIREKIDZE N, ROYTBERG MA (1992) On the tertiary structure of satellite DNA. *Biochimie*, 74:187–194.
- BERNET GP, ASÍNS MJ (2003) Identification and genomic distribution of *gypsy* like retrotransposons in *Citrus* and *Poncirus*. *Theor Appl Genet*, 108:121–130.
- BESENDORFER V, SAMARDZIJA M, ZOLDOS V, SOLIC ME, PAPES D (2002) Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR-associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss. (Alliaceae). *Bot J Linn Soc*, 139:99–108.
- BRASILEIRO-VIDAL AC, DOS SANTOS-SEREJO JA, SOARES FILHO WS, GUERRA M (2007) A simple chromosomal marker can reliably distinguishes *Poncirus* from *Citrus* species. *Genetica*, 129:273–279.
- BRETÓ MP, RUIZ C, PINA JA, ASINS MJ (2001) The diversification of *Citrus clementina* Hort. Ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Mol Phylogenet Evol*, 21:285–293.
- BROWN SM, HOPKINS MS, MITCHELL SE, SENIOR ML, WANG TY, DUNCAN RR, GONZALEZ-CANDELAS F, KRESOVICH S (1996) Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum. *Theor Appl Genet*, 93:190–198.

- BUSSELL JD, WAYCOTT M, CHAPPILL JA (2005) Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. *Perspect Plant Ecol Evol Syst*, 7:3–26.
- CAETANO-ANOLLES G, BASSAM BJ, GRESSHO PM (1991) DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Nat Biotechnol*, 9:553–557.
- CAI Q, GUY CL, MOORE GA (1994) Extension of the genetic linkage map in *Citrus* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation responsive loci. *Theor Appl Genet*, 89:606–614.
- CALIXTO MC, MOURÃO FILHO FAA, MENDES BMJ, VIEIRA MLC (2004) Somatic hybridization between *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and *C. grandis* (L.) Osbeck. *Pesqui. Agropecu. Bras*, 39:721–724.
- CAMERON JW, FROST HB (1968). Genetics, breeding and nucellar embryony in *Citrus*. In: REUTHER W, PATCHELOR LD, WEBBER HJ (eds.). *The Citrus Industry*. Berkley University of California Press., 2:325–370.
- CAMERON JW, SOOST RK (1986) *Citrus*. In: SIMMONDS NW (ed.). *Evolution of crop plants*. Longman Scientific & Technical, Inglaterra. p. 261–265.
- CAMPOS JS (1976) *Cultura dos citros*. Campinas, SP, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. 100 p.
- CARVALHO R, SOARES FILHO WS, BRASILEIRO-VIDAL AC, GUERRA M. (2005) The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenet. Genome Res*. 109: 276–282.
- CARVALHO R, GUERRA M (2002) Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. *Hereditas*, 136:159–168.
- CERMEÑO MC, ORELLANA J, SANTOS JL, LACADENA JR (1984) Nucleolar organizer activity in wheat, rye and derivatives analyzed by a silver-staining procedure. *Chromosoma*, 98:370–376.
- CHAPOT H (1975) The citrus plant. In: HÄFLIGER E (ed.). *Citrus*: Basle, Switzerland, CIBA-GEIGY Ltd., p.14–20.
- CHARLESWORTH B, SNIEGOWSKI P, STEPHAN W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215–220.
- CHARTERS YM, ROBERTSON A, WILKINSON MJ, RAMSAY G (1996) PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. *Theor Appl Genet* 92:442–447.
- CHEN Q, LIANG G (1989) Study on the karyotype of *Poncirus*. *Yunnan Zhi Wu Yan Jiu*, 11:103–106.

- CHEN C, BOWMAN KD, CHOI YA, DANG PM, RAO MN, HUANG S, SONEJI JR, MCCOLLUM TG, GMITTER FG (2007) EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Tree Genet Genomes*, 4:1–10.
- CHEN C, ZHOU P, CHOI YA, HUANG S, GMITTER JR FG (2006) Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. *Theor Appl Genet*, 112:1248–1257.
- CHEN ZG, LU LX, LAI ZX, YU CH (1996). Study on the genetic background of some specific citrus germplasm of Fujian province. *South China Fruits*, 25:10–12.
- CHENG Z, PRESTING GG, BUELL CR, WING A, JIANG J (2001) High-resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosome anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. *Genetics*, 157:1749–1757.
- COART E, VEKEMANS X, SMULDERS MJM, WAGNER I, HUYLENBROECK JV, BOCKSTAELE EV, ROLDA´N-RUIZ I (2003) Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. *Mol Ecol*, 12:845–857.
- CORNÉLIO MTMN, FIGUEIRÔA ARS, SANTOS KGB, CARVALHO R, SOARES FILHO WS, GUERRA M (2003) Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. *Plant Syst Evol* 240: 149–161.
- DE FELICE B, WILSON RR, CIARMIELLO L, SCARANO MT, FERRANTE S (2006) Characterization of a novel satellite DNA sequence from Flying Dragon (*Poncirus trifoliata*). *Genetica*, 127:45–53.
- DENG ZN, GENTILE A, NICOLOSI E, VARDI A, TRIBULATO E (1995) Identification of *in vivo* and *in vitro* lemon mutants by RAPD markers. *J Hort Sci*, 70:117–125.
- DENG Z, HUANG S, XIAO S, GMITTER JR FG (1997) Development and characterization of SCAR markers linked to the citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata*. *Genome*, 40:697–704.
- DENG Z, TAO Q, CHANG YL, HUANG S, LING P, YU C, CHEN C, GMITTER JR FG, ZHANG HB (2001) Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for citrus and identification of BAC contigs containing resistance gene candidates. *Theor Appl Genet*, 102:1177–1184.
- DOS SANTOS JB, NIENHUIS J, SKROCH P, TIVANG J, SLOCUM MK (1994) Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theor Appl Genet*, 87:909–915.

- DURHAM R E, LIOU PC, GMITTER JR FG, MOORE GA (1992) Linkage of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in *Citrus*. Theor Appl Genet, 84:39–48.
- ELDER JF, TURNE BJ (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. Q Rev Biol, 70:297–320.
- ENGLER A (1931) Rutaceae. In: ENGLER A, PRANTL K (eds.) *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, 2nd ed., Engelmann, Leipzig, Germany. 19:187–359.
- ESPOSITO MA, MARTIN EA, CRAVERO VP, COINTRY E (2007) Characterization of pea accessions by SRAP's markers. Sci Hortic, 113:329–335.
- FANG DQ, ROOSE ML (1997) Identification of closely related *Citrus* cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theor Appl Genet, 95:408–417.
- FANG DQ, ROOSE ML, KRUEGER RR, FEDERICI CT (1997) Fingerprinting trifoliate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers Theor Appl Genet, 95:211–219.
- FANG DQ, ZHANG W, XIAO S (1994) Isoenzymes and classification of citrus species in China. Acta Bot Sin, 36:124–138.
- FANN JY, KOVARIK A, HEMLEBEN V, TSIREKIDZE NI, BERIDZE TG (2001) Molecular and structural evolution of *Citrus* satellite DNA. Theor Appl Genet, 103:1068–1073.
- FAO (2011) Food and Agriculture Organization of the United Nations (2009) Annual statistics. Rome, Italy.
- FEDERICI CT, FANG DQ, SCORA RW, ROOSE ML (1998) Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. Theor Appl Genet, 96:812–822.
- FERREIRA ME, GRATTAPAGLIA D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN. 220 p.
- FERRIOL M, PICO B, NUEZ F (2003) Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. Theor Appl Genet, 107:271–282.
- FERRIOL M, PICO B, NUEZ F (2004) Morphological and molecular diversity of a collection of *Cucurbita maxima* Landraces. J Amer Soc Hort Sci, 129:60–69.
- FONSÊCA A, FERREIRA A, SANTOS TRB, MOSIOLEK M, BELLUCCI E, KAMI J, GEPTS P, GEFFROY V, SCHWEIZER D, SANTOS KGB, PEDROSA-HARAND A (2010) Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Chromosome Res, 18:487–502.

- FRANSZ PF, ARMSTRONG S, DE JONG JH, PARNELL LD, DRUNEN CV, DEAN C, ZABEL P, BISSELING T, JONES GH (2000) Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*. *Cell*, 100:367–376.
- FROST HB (1925) The chromosomes of *Citrus*. *J Wash Acad Sci*, 15: 1–2.
- GARCÍA R, ASÍNS MJ, FORNER J, CARBONELL EA (1999) Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. *Theor Appl Genet*, 99:511–518.
- GAYET JP, BLEINROTH EW, MATALLO M, GARCIA EEC, GARCIA AE, ARDITO EFG, BORDIN MR (1995) Lima ácida Tahiti para exportação: procedimento de colheita e pós-colheita. Série Publicações Técnicas Frupex 12, Embrapa-SPI, Brasília, p 36.
- GILL BS, FRIEBE B, ENDO TR (1991) Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). *Genome*, 34:830–839.
- GMITTER JR FG, HU X (1990) The possible role of Yunnan, China in the origin of contemporary *Citrus* species (Rutaceae). *Econ Bot*, 44:267–277.
- GMITTER JR FG, XIAO SY, HUANG S, HU XL, GARNSEY S M, DENG Z (1996) A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region. *Theor Appl Genet*, 92:688–695.
- GMITTER JR FG, CHEN C, RAO MN, SONEJI JR (2007) *Citrus* Fruits. In: KOLE KR (Ed.). *Fruits and Nuts, Genome Mapping & Molecular Breeding in Plants*, Springer, Heidelberg. 4:265–279.
- GUERRA M (1993) Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity*, 71:234–241.
- GUERRA M (2009) Chromosomal variability and the origin of *Citrus* species. In: MAHONEY CL, SPRINGER DA (eds.) *Genetic Diversity*. Nova Science Publishers, Inc., New York, p. 51–68.
- GUERRA M, PEDROSA A, BARROS E SILVA AE, CORNÉLIO MTM, SANTOS K, SOARES FILHO WS (1997) Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germplasm bank. *Rev Bras Genet*, 20:489–496.
- GUERRA M (1985) Cytogenetics of Rutaceae. III. Heterochromatin patterns. *Caryologia*, 38: 335–346.
- GUERRA S (2007) Origem e variabilidade cariotípica da laranja-azeda (*Citrus aurantium* L.). Monografia, Universidade Federal de Pernambuco.

- GULSEN O, KARAGUL S, ABAK K (2007) Diversity and relationships among Turkish okra germplasm by SRAP and phenotypic marker polymorphism. *Biologia*, 62:141–145.
- GULSEN O, ROOSE ML (2001) Lemons: Diversity and relationships with selected *Citrus* genotypes as measured with nuclear genome markers. *J Amer Soc Hort Sci*, 126:309–317.
- GUO DL, LUO ZR (2006) Genetic relationships of some PCNA persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.) from China and Japan revealed by SRAP analysis. *Genet Res Crop Evol*, 53:1597–1603.
- HAMADA H, PETRINO MG, KAKUNAGA T (1982) A novel repeat element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:6465–6469.
- HASTEROK R, MARASEK A, DONNISON IS, ARMSTEAD I, THOMAS A, KING IP, WOLNY E, IDZIAK D, DRAPER J, JENKINS G (2006) Alignment of the genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using bacterial artificial chromosome landing with fluorescence *in situ* hybridization. *Genetics*, 173: 349–362.
- HERRERO R, ASINS MJ, CARBONELL EA, NAVARRO L (1996) Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theor Appl Genet*, 92:599–609.
- HEUN M, SCHAFER-PREGL R, KLAWAN D, CASTAGNA R, ACCERBI M, BORGHI B, SALAMINI F (1997) Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science*, 278:1312–1314.
- HIRAI M, MITSUE S, KITA K, KAJIURA I (1990) A survey and isozyme analysis of wild mandarin, tachibana (*Citrus tachibana* Tanaka) growing in Japan. *J Jap Soc Hort Sci*, 59:1–7.
- HIZUME M, SHIBATA F, MATSUSAKI Y, GARAJOVA Z (2002) Chromosome identification and comparative karyotypic analyses of four *Pinus* species *Theor Appl Genet*, 105:491–497.
- HOKANSON SC, SZEWC-MCFADDEN AK, LAMBOY WF, MCFERSON JR (1998) Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus domestica* Borkh. Core subset collection. *Theor Appl Genet*, 97:671–683.
- HOWELL EC, BARKER GC, JONES GH, KEARSEY MJ, KING GJ, KOP EP, RYDER CD, TEAKLE GR, VICENTE JG, ARMSTRONG SJ (2002) Integration of the cytogenetic and genetic linkage maps of *Brassica oleracea*. *Genetics*, 161:1225–1234.

- HOWELL WM, BLACK DA (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36:1014–1015.
- HUANG JC, CORKE H, SUN M (2002) Highly polymorphic AFLP markers as a complementary tool to ITS sequences in assessing genetic diversity and phylogenetic relationships of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its wild relatives. *Genet Resour Crop Evol*, 49:541–550.
- IOVENE M, CAVAGNARO PF, SENALIK D, BUELL CR, JIANG J, SIMON PW (2011) Comparative FISH mapping of *Daucus* species (Apiaceae family). *Chromosome Res*, 19:493–506.
- IOVENE M, WIELGUS SM, SIMON PW, BUELL CR, JIANG J (2008) Chromatin structure and physical mapping of chromosome 6 of potato and comparative analyses with tomato. *Genetics*, 180:1307–1317.
- JARRELL DC, ROOSE ML, TRAUGH SN, KUPPER RS (1992) A genetic map of citrus based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross. *Theor Appl Genet*, 84:49–56.
- JIANG J, GILL BS (2006) Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome*, 49:1057–1068.
- KHAN IA, ROOSE ML (1988) Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in three cultivars of trifoliate orange. *J Am Soc Hort Sci*, 113:105–110.
- KIDWELL MG (2002) Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica*, 115: 49–63.
- KIJAS JMH, FOWLER JCS, THOMAS MR (1995) An evaluation of sequence-tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. *Genome*, 38:349–355.
- KIJAS JMH, THOMAS MR, FOWLER JCS, ROOSE ML (1997) Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of *Citrus*. *Theor Appl Genet*, 94:701–706.
- KIM JS, CHILDS KL, ISLAM-FARIDI MN, MENZ MA, KLEIN RR, KLEIN PE, PRICE HJ, MULLET JE, STELLY DM (2002) Integrated karyotyping of sorghum by *in situ* hybridization of landed BACs. *Genome*, 45:402–412.
- KIM ES, PUNINA EO, RODIONOV AV (2002) Chromosome CPD (PI/DAPI)- and CMA/DAPI-banding patterns in *Allium cepa* L. *Russ J Genet*, 38:392–398.
- KLINKHARDT MB (1998) Some aspects of karyoevolution in fishes. *Anim Res Dev*, 47:7–36.
- KOLLER OC (1994) *Citricultura: laranja, limão e tangerina*. Porto Alegre 1º Editora Rígel, 446 p.

- KOUMBARIS GL, BASS HW (2003) A new single-locus cytogenetic mapping system for maize (*Zea mays* L.): overcoming FISH detection limits with marker-selected sorghum (*S. propinquum* L.) BAC clones. *Plant J*, 35:647–659.
- KRUG CA (1943) Chromosome number in the subfamily Aurantioideae with special reference to the genus *Citrus*. *Bot Gaz*, 104:602–611.
- KRUG CA, BACCHI O (1943) Triploid varieties of *Citrus*. *J Hered*, 34:277–283.
- LATADO RR, CRISTOFANI-YALY M, CARVALHO CR, MACHADO MA (2007). Plantas autotetraplóides de citros sob tratamento *in vitro* com colchicina. *Pesqui Agropecu Bras*, 42:10.
- LI G, QUIROS CF (2001) Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor Appl Genet*, 103:455–461.
- LI X, XIE R, LU Z, ZHOU Z (2010) The Origin of cultivated *Citrus* as inferred from internal transcribed spacer and chloroplast DNA sequence and amplified fragment length polymorphism fingerprints. *J Amer Soc Hort Sci*, 135:341–350.
- LIANG G (1990) Studies on the cytotaxonomy of *Citrus*. I. Karyotype and evolution of 30 taxa of the genera *Citrus*. *J Wuhan Bot Res*, 8:1–7.
- LIANG G (1988) Studies on the Giemsa C-banding patterns of some *Citrus* and its related genera. *Acta Genet Sin*, 15:409–415.
- LIU PC (1990) A molecular study of the *Citrus* genome through analysis of restriction fragment length polymorphism and isozyme mapping. Ph.D. dissertation, University of Florida, Gainesville, Fla, USA.
- LIU K, GOODMAN M, MUSE S, SMITH JS, BUCKLER E, DOEBLEY J (2003) Genetic structure and diversity among Maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. *Genetics*, 165:2117–2128.
- LOPEZ-LEON MD, CABRERO J, CAMACHO JPM (1999) Unusually high amount of inactive ribosomal DNA in the grasshopper *Stauroderus scalaris*. *Chromosome Res*, 7:83–88.
- LURO F, CONSTANTINO G, BILLOT C, et al., (2007) Genetic maps of *Clementine* mandarin and intergeneric *Clementine* × *Poncirus* using genomic and EST microsatellite markers. In: *Plant & Animal Genome XIV Conference*, p. 487, San Diego, Calif, USA.
- LYON MT, FEDERICI CT, KACAR Y, et al., (2007) SST-based linkage maps for sweet orange and trifoliate orange. In: *Plant & Animal Genome XIV Conference*, p. 480, San Diego, Calif, USA.

- MA L, VU GTH, SCHUBERT V, WATANABE K, STEIN N, HOUBEN A, SCHUBERT I (2010) Synteny between *Brachypodium distachyon* and *Hordeum vulgare* as revealed by FISH. *Chromosome Res*, 18:841–850.
- MACAS J, MESZAROS T, NOUSOZOVA M (2002) PlantSat: a specialized database for plant satellite repeats. *Bioinformatics*, 18: 28–35.
- MACHADO MA, CRISTOFANI M, AMARAL AM, OLIVEIRA AC (2005) Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JÚNIOR D, NEGRI JD, PIO RM, POMPEU JÚNIOR J (Org.). *Citros*. Campinas: IAC. 1 ed. p. 221–277.
- MALIK MN (1973) A new concept in *Citrus* classification. *Pakistan J Sci Res*, 25:268–271.
- MARTINS C, CABRAL-DE-MELLO DC, VALENTE GT, MAZZUCHELLI J, OLIVEIRA SG, PINHAL D (2011) Animal genomes under the focus of cytogenetics. Nova Science Publishers, Inc., New York. 160 p.
- MELLINK CHM, BOSMA AA, DE HAAN NA (1994) Variation in size of Ag-NORs and fluorescent rDNA *in situ* hybridization signals in six breeds of domestic pig. *Hereditas*, 120:141–149.
- MELO NF, GUERRA M (2003) Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Ann Bot*, 92:309–316.
- MENDES S, MORAES AP, MIRKOV TE, PEDROSA-HARAND A (2011) Chromosome homeologies and high variation in heterochromatin distribution between *Citrus* L. and *Poncirus* Raf. as evidenced by comparative cytogenetic mapping. *Chromosome Res*, 19:521–530.
- MILLAN T, OSUNA F, COBOS A, TORRES AM, CUBERO JI (1996) Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*. *Theor Appl Genet*, 92:273–277.
- MIRANDA M, IKEDA F, ENDO T, MORIGUCHI T, OMURA M (1997a) Comparative analysis on the distribution of heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* chromosomes. *Chromosome Res*, 5:86–92.
- MIRANDA M, IKEDA F, ENDO T, MORIGUCHI T, OMURA M (1997b) rDNA sites and heterochromatin in Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia* Swing.) chromosome revealed by FISH and CMA/DAPI staining. *Caryologia*, 50:333–340.
- MOORE GA (2001) Oranges and limons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trend Genet*, 17:536–540.
- MORAES AP, LEMOS RR, BRASILEIRO-VIDAL A C, SANTOS SOARES FILHO W, GUERRA M (2007a) Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrid accessions of mandarin. *Cytogenet Genome Res*, 119:275–281.

- MORAES AP, MIRKOV TE, GUERRA M (2008) Mapping the chromosome of *Poncirus trifoliata* Raf. By BAC-FISH. Cytogenet Genome Res, 121:227–281.
- MORAES AP, SOARES FILHO WS, GUERRA M (2007b) Karyotype diversity and the origin of grapefruit. Chromosome Res, 15:115–121.
- MOREIRA CS, MOREIRA, S (1991) História da citricultura no Brasil. In: RODRIGUES O, VIÉGAS F, POMPEU JRJ (eds.) *Citricultura Brasileira*. Fundação Cargill. Campinas. p. 1–18.
- MORTON CM, GRANT M, BLACKMORE S (2003) Phylogenetic relationships of the Aurantioideae inferred from chloroplast DNA sequence data. Am J Bot, 90: 1463–1469.
- MOURAS A, WILDENSTEIN C, SALESES G (1986) Analysis of karyotype and c-banding pattern of *Nicotiana plumbaginifolia* using 2 techniques. Genetica, 68:197–202.
- NICOLOSI E, DENG ZN, GENTILE A, LA MALFA S, CONTINELLA G, TRIBULATO E (2000) *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. Theor Appl Genet, 100: 1155–1166.
- OHMORI T, MURATA M, MOTOYOSHI F (1996) Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the *Tm-1* locus in tomato. Theor Appl Genet, 92:151–156.
- OLLITRAULT P, JACQUEMOND C (1994) Facultative apomixis, spontaneous polyploidization and inbreeding in *Citrus volkameriana* seedlings. Fruits, 49: 479–480.
- OLMSTEAD RG, PALMER JD (1994) Chloroplast DNA systematics: A review of method and data analysis. Amer J Bot, 81:1205–1224.
- OMURA M, UEDA T, KITA M, et al., (2001) Extension of *Citrus* linkage map by CAPS marker. In: Plant & Animal Genome IX Conference, p. 538, San Diego, Calif, USA.
- OMURA M, UEDA T, KITA M, et al., (2000) EST mapping of *Citrus*. In: Proceedings of the International Society of Citriculture IX Congress, vol. 1, pp. 71–74, Orlando, Fla, USA.
- PANG XM, HU CG, DENG XX (2007) Phylogenetic relationships within *Citrus* and its related genera as inferred from AFLP markers. Genet Resour Crop Evol, 54:429–436.
- PARAN I, MICHELMORE RW (1993) Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor Appl Genet, 85:985–993.

- PEDROSA A, SANDAL N, STOUGAARD J, SCHWEIZER D, BACHMAIR A (2002) Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics*, 161:1661–1672.
- PEDROSA A, SCHWEIZER D, GUERRA M (2000) Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Theor Appl Genet*, 100:361–367.
- PEDROSA A, GUERRA M, SOARES FILHO WS (1997) An hierarchy of activation of nucleolar organizer regions in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Cytobios*, 92:43–51.
- PENDA'S AM, MORAN P, GARCIA-VASQUEZ E (1993) Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout. *Chromosome Res*, 1:63–67.
- PONS J, PETITPIERRE E, JUAN C (2002) Evolutionary dynamics of satellite DNA family PIM357 in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae , Coleoptera). *Mol Biol Evol*, 19:1329–1340.
- RAI M (2006) Refinement of the citrus tristeza virus resistance gene (*Ctv*) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region. *Plant Mol Biol*, 61:399–414.
- RICO-CABANAS L, MARTÍNEZ-IZQUIERDO JA (2007) CIRE1, a novel transcriptionally active *Ty1-copia* retrotransposon from *Citrus sinensis*. *Mol Genet Genomics*, 277:365–377.
- ROOSE ML, SCHWARZACHER T, HESLOP-HARRISON JS (1998) The chromosomes of *Citrus* and *Poncirus* species and hybrids: Identification of characteristic chromosomes and physical mapping of rDNA loci using *in situ* hybridization and fluorochrome banding. *J Hered*, 89:83–86.
- ROOSE ML, FENG D, CHENG FS, TAYYAR RI, FEDERICI CT, KUPPER RS (2000) Mapping the *Citrus* genome. In: GOREN R, GOLDSCHMIDT EE (eds.), *Proceedings of the 1st International Society for Horticultural Sciences (ISHS '00)*, Leuven, Belgium, *Acta Hort*, 535:25–32.
- RUFAS JS, ITURRA P, DE SOUZA W, ESPONDA P (1982) Simple silver staining procedure for the localization of nucleolus and nucleolar organizers under light and electron microscopy. *Arch Biol*, 93:267–276.
- RUIZ JJ, GARCIA-MARTINEZ S (2005) Genetic variability and relationship of closely related Spanish traditional cultivars of tomato as detected by SRAP and SSR markers. *J Am Soc Hort Sci*, 130:88–94.
- SADDER T, WEBER G (2002) Comparison between genetic and physical maps in *Zea mays* L. of molecular markers linked to resistance against *Diatraea* spp. *Theor Appl Genet*, 104:908–915.

- SALIMATH SS, OLIVEIRA AC, GODWIN ID, BENNETZEN JL (1995) Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. *Genome* 38:57–763.
- SALVADORI S, DEIANA AM, COLUCCIA E, FLORIDIA G, ROSSI E, ZUFFARDI O (1995). Colocalization of (TTAGGG)_n telomeric sequences and ribosomal genes in Atlantic eels. *Chromosome Res*, 3:54–58.
- SANCHEZ A, JIMÉNEZ R, BURGOS M, STITOU S, ZURITA F, DE LA GUARDIA RD (1995) Cytogenetic peculiarities in the Algerian hedgehog: silver stains not only NORs but also heterochromatic blocks. *Heredity*, 75:10–16.
- SANKAR AA, MOORE GA (2001) Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis formapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map. *Theor Appl Genet*, 102:206–214.
- SAUER JD (1993) Historical geography of crop plants – A Select Roster. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 309p.
- SAUNT J (1990) *Citrus* varieties of the world. Sinclair International Ltd. 126 p..
- SCHULZ-SCHAEFFER J (1980) The nucleolus organizer region. In: SYBENGA J (ed.) *Cytogenetics, plants, animals, human*. Springer-Verlag, New York, U.S.A., p. 36–38.
- SCHWEIZER D (1976) Reverse fluorescent chromosome-banding with Chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58:307–324.
- SCHWEIZER D, AMBROS PF (1994) Chromosome banding. In: GOSDEN JR (ed.). *Methods in Molecular Biology*, Humana Press: Totowa, 29:97–112.
- SCORA RW (1975) On the history and origin of citrus. *Buly Botanical Club*, 102:369–375.
- SCORA RW (1988) Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated *Citrus*. In: GOREN RK, MENDEL K (eds.), *Proc. 6th Int. Citrus Cong.*, Margraf Publishers, Weikersheim, Germany, 1:277–289.
- SEAL AG, BENNETT MD (1982) Preferential C-banding of wheat or rye chromosomes. *Theor Appl Genet*, 63:227–233.
- SHIMIZU T, SHIMADA T, NISHIKAWA F, et al., (2007) Constructing a physical map of *Citrus unshiu*. In: *Plant & Animal Genome XV Conference*, p. 481, San Diego, Calif, USA.
- SHIZUYA H, BIRREN B, KIM UJ, MANCINO V, SLEPAK T, TACHIIRI Y, SIMON M (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:8794–8797.

- SINGH S, RAJAM MV (2009) *Citrus* biotechnology: Achievements, limitations and future directions. *Physiol Mol Biol Plants*, 15:3–22.
- SOUZA LGR, CROSA O, GUERRA M (2010) Karyological circumscription of *Ipheion Rafinesque* (Gilliesioideae, Alliaceae). *Plant Syst Evol* 287:119–127
- SOUZA MGC, BENKO-ISEPPON AM (2004) Cytogenetics and banding patterns on Caesalpinioideae and Papilionioideae native from Pará, Amazonas, Brasil. *Bot J Linn Soc*, 144:181–191.
- STARRANTINO A, RECUPERO GR (1981) *Citrus* hybrids obtained *in vitro* from 2x females x 4x males. *Proc Inter Soc Citri*, 1:31–32.
- SUGAWARA K, OOWADA A (1995) Identification of *Citrus* chimeras by RAPD analysis. *HortScience* 30 : 1276–1278.
- SUMNER AT (1990) Chromosome banding. London: Unwin Hyman. 434 p.
- SUMNER AT (2003) Chromosomes: Organization and Function. Blackwell Publishing Limited, 304 p.
- SWINGLE WT, REECE PC (1967) The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: REUTHER W, WEBER HJ, BATCHELOR LD (eds) *The Citrus industry. History, world distribution, botany and varieties*. University of California Press, Berkeley, 1:190–430.
- SWINGLE WT (1943) The botany of *Citrus* and its wild relatives of the orange subfamily, p. 129–474. In: WEBBER, HJ, BATCHELOR LD (eds.). *The citrus industry*. Vol. 1. Univ. of California, Berkeley.
- SWINGLE WT, REECE PC (1967) The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: REUTHER W, WEBER HJ, BATCHELOR LD (eds). *The Citrus industry. History, world distribution, botany and varieties*, vol I. University of California Press, Berkeley, 190–430.
- TALON M, GMITTER JR FG (2008) *Citrus* Genomics. *Int J Plant Genomics*, 17p.
- TANAKA T (1954) Species problem in *Citrus* (Revised aurantiacearum IX) . Jap Soc Promotion of Science Ueno, Tokyo, 152 p.
- TANAKA T (1977) Fundamental discussion of *Citrus* classification. *Stud Citrol*, 14:1–6.
- TANKSLEY SD, GANAL MW, PRINCE JP, DE VICENTE MC, BONIERBALE MW, BROUN P, FULTON TM, GIOVANNONI JJ, GRANDILLO S, MARTIN GB, MESSEGUER R, MILLER JC, MILLER L, PATERSON AH, PINEDA O, RODER MS, WING RA, WU W, YOUNG ND (1992) High-density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 132: 1141–1160.

- TEROL J, NARANJO MA, TALON M (2007) BAC end sequencing analysis of 28,000 genomic clones from *Citrus clementina*. In: Plant & Animal Genome XV Conference, p. 80, San Diego, Calif, USA.
- TINKER NA, FORTIN MG, MOTHER DE (1993) Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationship in spring barley. *Theor Appl Genet*, 85:976–984.
- TÖR M, MANNING K, KING GJ, THOMPSON AJ, JONES GH, SEYMOUR GB, ARMSTRONG SJ (2002) Genetic analysis and FISH mapping of the *Colourless non-ripening* locus of tomato. *Theor Appl Genet*, 104:165–170.
- TORRES AM, SOOST RK, DIEDENHOFEN U (1978) Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*. *Am J Bot*, 65:869–881.
- TORRES AM, SOOST RK, MAU-LASTOVICKA T (1982) *Citrus* isozymes. *J Hered*, 73:335–339.
- TORRES AM, MAU-LASTOVICKA T, WILLIAMS TE, SOOST RK (1985) Segregation distortion and linkage of *Citrus* and *Poncirus* isozyme genes. *J Hered*, 76:289–294.
- UGARKOVIC D, PLOHL M (2002) Variation in satellite DNA profiles—causes and effects. *EMBO J*, 21:5955–5959.
- UZUN A, YESILOGLU T, AKA-KACAR Y, TUZCU O, GULSEN O (2009) Genetic diversity and relationships within *Citrus* and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs). *Sci Hortic*, 121:306–312.
- VOSA CG (1985) Chromosome banding in plants. In: SHARMA AK, SHARMA A (eds.) *Chromosome and Cell Genetics*, Gordon and Breach Science Publishers, London, p. 79–104.
- WANG G, HOLSTEN TE, SONG WY, WANG HP, RONALD PC (1995) Construction of a rice bacterial artificial chromosome library and identification of clones linked to Xa-21 disease resistance locus. *Plant J*, 7:523–533.
- WANG A, SCHLUETZ F, LIU J (2008) Molecular evidence for double maternal origins of the diploid hybrid *Hippophae goniocarpa* (Elaeagnaceae). *Bot J Linn Soc*, 156:111–118.
- WEBBER HJ (1967) History and development of the *Citrus* industry. In: REUTHER W, WEBBER HJ, BATCHELOR LD (eds) *The Citrus industry. History world distribution, botany and varieties*, vol I. Berkeley: University of California Press, p. 1–39.
- WEI W, CHENG Y, DUAN Y (1988) Studies on the evolution of *Citrus* based on karyotype and C-banding patterns. *Acta Hort Sin*, 15:223–228.
- WELSH J, MCCLELLAND M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18:7213–7218.

- WEN XP, PANG XM, DENG XX (2004) Characterization of genetic relationships of *Rosa roxburghii* Tratt and its relatives using morphological traits, RAPD and AFLP markers. *J Horti Sci Biotech*, 79:189–196.
- WILLIAMS JGK, KUBELIK AR, LIVAK KJ, RAFALSKI JA, TINGEY SV (1990) DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18:6531–6535.
- WOLFF K, ZIETKIEWICZ E, HOFSTRA H (1995) Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. *Theor Appl Genet*, 91:439–447.
- WOLNY E, LESNIEWSKA K, HASTEROK R, LANGDON T (2011) Compact genomes and complex evolution in the genus *Brachypodium*. *Chromosoma*, 120:199–212.
- WOO SS, JIANG J, GILL BS, PATERSON AH, WING RA (1994) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucleic Acids Res*, 22:4922–4931.
- WU KS, TANKSLEY SD (1993) Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Gen Genet*, 241:225–235.
- XIANG C, ROOSE ML (1988) Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in 12 citrus rootstocks. *Sci Hortic*, 37:47–59.
- XIAO SY, ZHANG WC, CHEN JS, WAN SY (1989) Study on the genetic background of citrus hybrids by isozyme analysis. *Acta Hortic*, 16:255–260.
- YAMAMOTO M, TOMINAGA S (2003) High chromosomal variability of mandarins (*Citrus* spp.) revealed by CMA banding. *Euphytica*, 129:267–274.
- YANG ZN, YE XR, MOLINA J, ROOSE ML, MIRKOV TE (2003) Sequence analysis of a 282-kilobase region surrounding the citrus tristeza virus resistance gene (Ctv) locus in *Poncirus trifoliata* L. Raf. *Plant Physiol*, 131: 482–492.
- YANG ZN, YE XR, CHOI S, MOLINA J, MOONAN F, WING RA, ROOSE ML, MIRKOV TE (2001) Construction of a 1.2-Mb contig including the citrus tristeza virus resistance gene locus using a bacterial artificial chromosome library of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genome*, 44:382–393.
- YU Y, TOMKINS JP, WAUGH R, FRISCH DA, KUDRNA D, KLEINHOF S, BRUEGGEMAN RS, MUEHLBAUER GJ, WISE RP, WING RA (2000) A bacterial artificial chromosome library for barley (*Hordeum vulgare* L.) and the identification of clones containing putative resistance genes. *Theor. Appl. Genet*. 101: 1093–1099.
- ZANON NB, ALMEIDA LFR, DANIEL H, FERNANDES JC, TARSITANO MA (2008) A análise econômica da produção de laranja *in natura* na Região

Noroeste do estado de São Paulo. XX Congresso Brasileiro de Fruticultura. Vitória/ES.

ZURITA F, SÁNCHEZ A, BURGOS M, JIMÉNEZ R, DE LA GUARDIA RD (1997)
Interchromosomal, intercelular and interindividual variability of NORs studied
with silver staining and *in situ* hybridisation. Heredity, 78: 229–234.

4. Manuscrito I

The cytogenetic map of the Poncirus trifoliata (L.) Raf.—A nomenclature system for chromosomes of all citric species

Manuscrito publicado na revista *Tropical Plant Biol.* (2011) 4:99–105

Running head (shortened title): Cytogenetic map of *Poncirus trifoliata*

Article type: Research paper

Title: The cytogenetic map of the *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. - a nomenclature system for chromosomes of all citric species

Author (s)

Silvokleio da Costa Silva^a, André Marques^a, Walter dos Santos Soares Filho^b, T. Erik Mirkov^c, Andrea Pedrosa-Harand^a, Marcelo Guerra^a

Affiliation (s)

^aLaboratory of Plant Cytogenetics, Department of Botany, Federal University of Pernambuco, Recife, PE (Brazil)

^bEmbrapa Cassava&Fruits, Cruz das Almas, BA (Brazil)

^cDepartment of Plant Pathology and Microbiology, Texas AgriLife Research, Texas A&M System, Weslaco, TX (USA)

Corresponding author's address:

Marcelo Guerra

Laboratório de Citogenética Vegetal

Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-420, Recife, PE (Brazil)

Tel. + 55 81 2126 8846

Fax + 55 81 2126 8348

E-mail: msfguerra@hotmail.com

Abstract

A cytogenetic map was established for the trifoliate orange, *Poncirus trifoliata*. Chromosome size, centromere position and CMA⁺ heterochromatin content were determined for each chromosome pair, together with the position of BAC clones previously described as chromosome-specific markers. Although *P. trifoliata* is a true biological species, heteromorphisms for the size of the heterochromatic bands in two chromosome pairs were observed. A minimum set of four BACs was proposed for chromosome identification in *P. trifoliata*, as well as a chromosome nomenclature that can be applied to all citrus species. The Ctv locus was assigned to chromosome 9 and the remaining linkage groups can now be integrated to this physical map. This standard nomenclature for trifoliate orange will be valuable for genome-sequencing projects in all citrus species.

Keywords: BAC-FISH; Chromosome identification; Heteromorphism; Idiogram

Abbreviations

BAC - Bacterial artificial chromosome

DAPI - 4'6-diamidino-2-phenylindole

CMA - Chromomycin A₃

FISH - Fluorescence in situ hybridization

CTV - Citrus tristeza virus

Introduction

Poncirus trifoliata (L.) Raf. (Aurantioideae, Rutaceae), commonly known as the trifoliolate orange, is the closest relative of the genus *Citrus*, which is well-known for its cultivated fruits (Samuel et al. 2001). This species has long attracted the attention of citrus breeders because of its importance as rootstock and the presence of a single dominant gene that confers resistance to citrus tristeza virus (Ctv), the main viral pathogen of citrus species (Gmitter et al. 1996, Meissner Filho et al. 2002).

Most of the members of the subfamily Aurantioideae, including *P. trifoliata*, are recognized by a stable chromosome number ($2n = 18$) and symmetrical karyotypes with small chromosomes of similar morphology, which, for many years, has hampered the use of cytogenetic approaches in this group (Chen and Liang 1989; Liang 1990). The use of fluorochromes such as chromomycin A₃ (CMA) and 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in recent years, however, has allowed the identification of several chromosomal types. Based on the distribution and number of the heterochromatic CMA⁺/DAPI⁻ bands, Carvalho et al. (2005) recognized the following types: A (two terminal and one proximal band), B (one terminal and one proximal band), C (two terminal bands), D (one terminal band), E (one subterminal/interstitial band), F (no band), F_L (the largest F type chromosome) and G type (one terminal and one subterminal band). The types D and F are common in most citrus karyotypes, whereas the A, B, C, E, and G types are rare and therefore more useful as karyotype markers (Cornélio et al. 2003; Carvalho et al. 2005; Moraes et al. 2007a,b; Guerra 2009). With the detection of rDNA sites by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) combined with CMA/DAPI banding, several chromosome subtypes were identified: B/5S-45S, B/45S-5S-45S, D/5S, D/45S, D/5S-45S, F/5S and F/45S (Pedrosa et al. 2000; Carvalho et al. 2005; Brasileiro-Vidal et al. 2007).

Based on these chromosome types and subtypes, many authors recognized that all cultivars of *P. trifoliata* showed the same karyotype formulae with $4B + 8D + 6F$ (Brasileiro-Vidal et al. 2007; Preedasuttijit et al. 2007; Moraes et al. 2008; Barros e Silva et al. 2010). All *P. trifoliata* cultivars investigated displayed two chromosome pairs of B/5S-45S and one pair D/5S-45S which are a unique combination of chromosomal subtypes for all citric species known to date. Further, it was shown that one of the B/5S-45S chromosomes of the cultivars Pomeroy and USDA has an

additional 45S rDNA site on the terminal region of the long arm never observed in other B type chromosomes (Brasileiro-Vidal et al. 2007; Barros e Silva et al. 2010).

Nonetheless, only the F_L and the D/5S-45S pairs of *P. trifoliata* could be unequivocally distinguished. More recently, a more detailed chromosome map was established based on a set of bacterial artificial chromosomes (BAC) markers, together with the distribution pattern of heterochromatic bands $CMA^+/DAPI^-$ and rDNA sites (Moraes et al. 2008). In this case, all chromosome pairs were identified, although the chromosome size, arm length and the exact position of BACs were not determined. Moreover, the chromosome ordering based only on chromosome types (B, D, and F) was inappropriate to chromosome comparison with *Citrus* species since the same chromosome type in different species are often non-homeologous (Guerra 2009).

In the present work an improved cytogenetic map of *P. trifoliata* was built combining chromosome morphology, chromosome types based on CMA/DAPI banding pattern, position of BAC markers, as well as 5S and 45S rDNA sites, aiming at the future integration with genetic and physical maps of *Citrus* species and the comparative cytogenetic mapping of other related genera of the subfamily. Further, we established a minimum set of BACs and rDNA probes that allows the identification of all chromosomes of *P. trifoliata*.

Results

Poncirus trifoliata cv. Flying Dragon showed 18 chromosomes varying both in length (1.57 – 2.32 μm) and morphology (submetacentric to metacentric). Based on the distribution of CMA^+ heterochromatic bands (Fig. 1a and 1d), the karyotype formula (4B+8D+4F+2 F_L) described by Brasileiro-Vidal et al. (2007) was confirmed.

Using only four BACs (20C13, 28A07, 28A05, and 55B01 or 59C23) and the 5S or 45S ribosomal DNA (rDNA), along with the CMA^+ banding pattern, it was possible to identify all chromosomes of *P. trifoliata* and establish a reliable idiogram (Figs. 1a, b and 2). In order to map the position of other available single loci for the species, BACs 01B09, 14A12, 24C13, 21L13 and 02C12 were also hybridized *in situ* (Fig. 1e and 2). All 5S rDNA sites (Fig. 1b) were localized adjacent to the 45S rDNA sites, which, in turn, co-localized with CMA^+ bands from three chromosomes pairs (Fig. 1d and e).

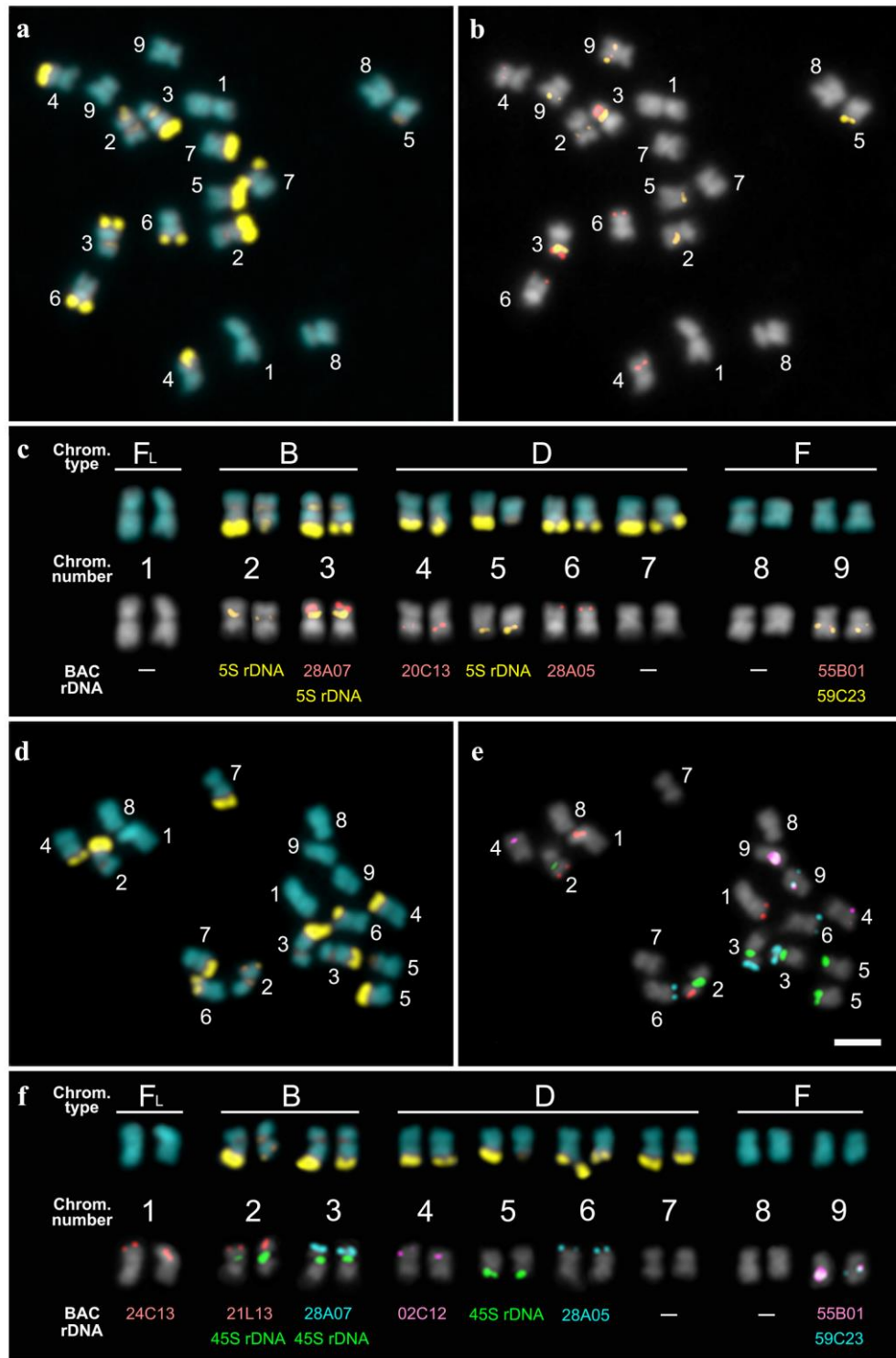


Fig. 1 Metaphases of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. stained with CMA/DAPI (**a** and **d**) and hybridized *in situ* with two different probe sets. In **b**, five BACs were used to recognize all chromosomes in combination with the CMA⁺ bands and 5S rDNA sites. In this case, two BACs that co-localized in chromosome 9 were used, but only one would be necessary. In **e**, an alternative set of BACs was used including BACs for the short arms of chromosomes 1 (F_L), 2, and 4, and 45S rDNA instead of 5S rDNA probe; **c** and **f**, Karyograms based on the metaphases illustrated in **a-b** and **d-e**. Bar in **e** corresponds to 2.5 μ m.

The chromosome pairs were named 1 to 9 and arranged according to the decreasing length of the short arm (Fig. 1c and f). Chromosome pair 1 was the metacentric F_L type, with BAC 24C13 localized in the terminal region of the short arm (Fig. 1d-f). Chromosome 2 was a B type metacentric and BAC 21L13 was mapped in the terminal region of its short arm (Fig. 1d-f). In all analyzed metaphases, a heteromorphism in the brightness and size of the terminal CMA^+ heterochromatic block was clearly observed between both homologues of this pair (Fig. 1a, c, d and f). Chromosome 3 was a B type submetacentric and the largest pair of the karyotype (Fig. 2). This pair was characterized by the presence of BACs 28A07 and 14A12, in the terminal region of the short arm and adjacent to the CMA^+ of the long arm, respectively, as well as a 5S (Fig. 1b and c) and a 45S (Fig. 1e and f) rDNA sites in the proximal region of the short arm.

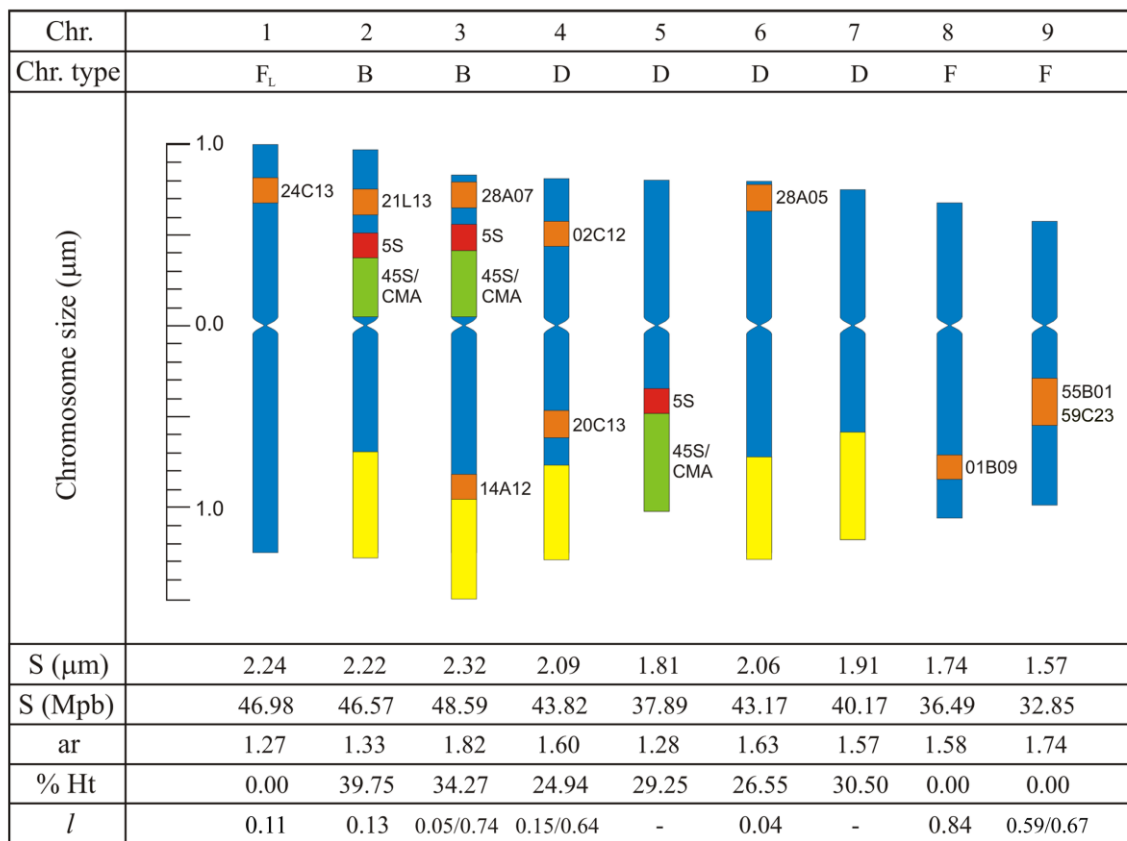


Fig. 2 Idiogram of *Poncirus trifoliata* showing chromosome type, the average size of individual chromosomes (S) in μm and Mbp, arm ratio (ar), percentage of CMA^+ heterochromatin per chromosome (% Ht) and BAC location (l). The chromosomes were ordered according to the decreasing length of the short arm. 45S rDNA sites (green) are co-localized with the corresponding CMA^+ bands, whereas 5S rDNA sites (red) are adjacent to them.

The chromosome 4 was a D type submetacentric, presenting, in the long arm, a terminal CMA⁺ band and the BAC 20C13 (Fig. 1a-c) and, in the terminal region of the short arm, BAC 02C12 (Fig. 1e and f).

Chromosomes 5 and 7 were both D type with meta- and submetacentric morphology, respectively, and showed no hybridization signals for the BAC markers available. Chromosome 5 was the only D chromosome with a 5S/45S rDNA site co-localized with the terminal CMA⁺ band (Fig. 1), whereas chromosome 7 was the only one without signals of either BACs or rDNA probes (Fig. 1b, c, e and f). Chromosome 5 also showed a conspicuous heteromorphism in the CMA⁺ band between homologues (Fig. 1a, c, d and f). The submetacentric chromosome 6, also a D type, was recognized by the BAC 28A05, localized in the terminal region of the short arm (Fig. 1). This BAC was detected in a more terminal position when compared to the other mapped BACs (Fig. 2).

The chromosome 8, a submetacentric F type (Fig. 1a, c, d and f), was identified by BAC 01B09, mapped in the terminal region of the long arm (data not shown). BACs 55B01 and 59C23, that are associated with the region of the *Citrus tristeza virus* (Ctv) resistance locus, were co-localized in the interstitial region of the long arm of a second F type chromosome pair (Fig. 1), which was the smallest of the karyotype and designated as chromosome 9.

Discussion

In this study a revised cytogenetic map was established for *P. trifoliata*, an important representative of the citrus relatives. Each chromosome pair was determined based on chromosome size and morphology, CMA banding pattern and position of BAC markers and rDNA sites established by Moraes et al. (2008). The karyotype formula observed confirms previously published data for Flying Dragon and other cultivars (Befu et al. 2000; Brasileiro-Vidal et al. 2007; Preedasuttijit et al. 2007; Moraes et al. 2008; Barros e Silva et al. 2010). The chromosome sizes were found in the range of variation reported by Miranda et al. (1997), but were smaller than the average values reported by Befu et al. (2000), who used prometaphase chromosomes for size estimation.

The measurement of the CMA⁺ blocks confirmed that approximately 22% of *P. trifoliata* genome is represented by CMA⁺/DAPI⁻ constitutive heterochromatin, slightly larger than proposed by Miranda et al. (1997). The proportion of heterochromatin per chromosome varied from 24.9% in chromosome 4 to 39.8% in 2, while chromosomes 1, 8 and 9 showed no CMA⁺ heterochromatin. When compared to the proportion of heterochromatin found in other species of the subfamily Aurantioideae (Guerra et al. 2000), *P. trifoliata* is among the representatives of this group with the lowest amount of CMA⁺ heterochromatin.

Based on morphological and molecular analyses (Barrett and Rhodes 1976; Moore 2001), only few *Citrus* species are considered true biological species and are characterized by having essentially homomorphic karyotypes (Guerra 2009) with low variation in the size of CMA⁺ bands (Cornélio et al. 2003; Carvalho et al. 2005; Brasileiro-Vidal et al. 2007; Moraes et al. 2007a,b). In *P. trifoliata*, supposedly a true species, marked variation in the size and intensity of the terminal CMA⁺/DAPI⁻ band was observed for chromosome 2 and 5.

The heteromorphism observed for pair 2 (type B) is probably associated with variation in the number of repeats of the satellite DNA family (CsSat) present in this region (Barros e Silva et al. 2010). This variation was observed in several cultivars of this species (Befu et al. 2000; Brasileiro-Vidal et al. 2007; Preedasuttijit et al. 2007; Barros e Silva et al. 2010) and is possibly caused by replication slippage, gene conversion, rolling circle replication, unequal crossing-over (Charlesworth et al. 1994; Richard and Pâques 2000) or translocation. Evidence for the occurrence of translocation in this region was the finding of an additional 45S rDNA site co-localized with the terminal CMA⁺ band in one homologue of this pair in the cultivars Pomeroy and USDA (Brasileiro-Vidal et al. 2007; Barros e Silva et al. 2010). According to Barros e Silva et al. (2010), the occurrence of this additional rDNA site was a result of a translocation involving the terminal heterochromatic bands of one chromosome B (pair 2 or 3) and one D/45S type (pair 5). Since the cultivars Flying Dragon, Fawcett and Rubidoux showed no extra 45S rDNA site at the terminal position of pair 2, but were heteromorphic for these bands (Brasileiro-Vidal et al. 2007; and this work), the presence of an extra 45S rDNA site at this terminal position is not the determining factor for this heteromorphism.

Pair 5 (type D) revealed differences in the size of the terminal heterochromatic bands between homologues, as well as in the 45S rDNA cluster co-localized with this

band. In this case, it is likely that, besides the mechanisms of repeat number variation mentioned above, the sequence composition of the CMA⁺ band may be influencing the heteromorphism observed (Brasileiro-Vidal et al. 2007). At least in the cultivar USDA, this CMA⁺ block is composed of two sequences: CsSat and 45S rDNA (Barros e Silva et al. 2010). It is well-known that CMA⁺ bands carrying 45S rDNA sites can be less bright or even neutral (Moraes et al. 2007b) and may change the apparent size of the CMA⁺ band at the microscopic level. Possibly, the epigenetic mechanisms involved in the regulation of the 45S rDNA expression (Pikaard 2000; Marques et al. 2011) may influence the affinity of the CMA for its sequence.

Besides several of the BACs used by Moraes et al. (2008), BACs 20C13 and 59C23 were also mapped in the present study. The first one marks the long arm of chromosome 4, being important in the establishment of a minimum set of four BACs necessary for chromosome recognition in the species. The other BAC, 59C23, co-localized with BAC 55B01 in chromosome 9 and both are part of a 1.2 Mb contig associated to the genic locus that confers resistance to Ctv (Yang et al. 2001). They allowed the anchoring of the linkage groups I (Gmitter et al. 1996; Cristofani et al. 1999) or IV (Ruiz and Asins 2003; Bernet et al. 2004) to this chromosome.

Several genetic maps have been reported for citrus genomes and, in most of cases, the number of linkage groups differs from the nine expected groups (Torres et al. 1985; Durham et al. 1992; Cai et al. 1994; Sankar and Moore 2001; Sahin Çevik and Moore 2007). Therefore, the additional mapping of BACs containing genetically mapped loci will be important to correlate the remaining linkage groups to the chromosomes. The present cytogenetic map of *P. trifoliata*, based on measurements of chromosome size, heterochromatin proportion and BACs position will be essential for comparative mapping in the genus *Citrus*, which is in progress. Therefore, the proposed nomenclature offers the opportunity to unify the chromosome nomenclature for citric species in genome projects.

Material and Methods

Plant Material and Slide Preparation

Seeds from *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon were obtained from the *Citrus* Active Germplasm Bank of the Embrapa Cassava & Fruits, Cruz das Almas, Bahia,

Brazil. Root tips from germinating seeds were pre-treated with 8-hydroxyquinoline (0.002 M) for 5 h at 18°C, fixed in ethanol-acetic acid 3:1 (v/v) for 18-24 h at room temperature and stored at -20°C. The material was washed in distilled water and digested at 37°C for 1 h with a 2% cellulase (Onozuka)-20% pectinase (Sigma) (w/v) solution. The meristem of each individual root tip was squashed in a drop of 45% acetic acid and the coverslip was removed in liquid nitrogen. The best slides were selected after staining with 1:1 (v/v) 2 µg/ml DAPI-glycerol. Subsequently, they were destained in ethanol-acetic acid 3:1 for 30 min at room temperature and transferred to absolute ethanol overnight at 4-8°C. Slides were air dried and aged for 3 days at room temperature.

CMA/DAPI staining

Aged slides were stained with CMA and DAPI as described by Moraes et al. (2007b), using a 0.1 mg/ml of CMA. The slides were mounted in McIlvaine's buffer (pH 7.0):glycerol (1:1, v/v) and the best metaphases were captured with an Leica DMLB epifluorescence microscope equipped with a Cohu CCD video camera using the Leica QFISH software. The slides were destained again and stored at -20°C for subsequent *in situ* hybridization.

Probes

Ten selected BACs (01B09, 02C12, 14A12, 20C13, 21L13, 24C13, 28A05, 28A07, 55B01 and 59C23) from the *P. trifoliata* cv. Pomeroy genomic library (Yang et al. 2001), most of which previously selected as chromosome-specific markers by Moraes et al. (2008), were used as probes. Furthermore, the 5S and 45S rDNA sites were localized using the D2 clone from *Lotus japonicus* (Pedrosa et al. 2002) and R2 clone from *Arabidopsis thaliana* (Wanzenböck et al. 1997), respectively. DNA from BACs and plasmids was isolated using the Plasmid Mini Kit (QIAGEN) following the manufacturer's instructions. The probes were labeled by nick translation (Roche Diagnostics) using Cy3-dUTP (GE) for BACs and 5S rDNA, while digoxigenin-11-dUTP was used for the 45S rDNA (Roche Diagnostics).

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

The FISH procedure was modified from Jiang et al. (1995). The chromosome denaturation mixture consisted of 50% formamide (v/v) and 2× SSC. Chromosomes were denatured at 75°C for 5 min, followed by dehydration in 70% and 100% ethanol at -20°C for 5 min each. 15 µl of the hybridization mixture for each slide containing 5% dextran sulfate (w/v), 1× SSC and 7-10 ng/µl of probe were used. The hybridization mixture was denatured at 75°C before being added to the slides. Both mixture and slides were denatured at 75°C for 7 min, sealed with a rubber gum and hybridized for up to 2 days at 37°C. Slides were then washed twice in 2× SSC and 0.1× SSC and once in 2× SSC, at 42°C for 5 min each, followed by 2× SSC at room temperature for 10 min. The final stringency was around 72%. The 45S rDNA probe was detected with sheep anti-digoxigenin conjugated with FITC (Roche) followed by amplification with rabbit anti-sheep conjugated with FITC (Sigma). All preparations were counterstained and mounted with 2 µg/ml DAPI in Vectashield (Vector). Re-probing of the slides for localization of different DNA sequences on the same cell was performed according to Heslop-Harrison et al. (1992). The images were acquired as previously described.

Image analysis and chromosome measurements

For final processing, images were superimposed, pseudocolored and adjusted for brightness and contrast only, using the Adobe Photoshop CS3 v. 10.0 software.

Mean relative chromosome size, CMA⁺ band size and arm ratio were calculated for each pair based on measurements of five mitotic metaphases using the ruler tool from Adobe Photoshop. Arm lengths were measured on CMA and DAPI overlapped images without adjustments, whereas the size of CMA⁺ bands was measured directly on CMA images. The chromosome morphology was defined according to Guerra (1986). The absolute size of each chromosome was calculated using the relative chromosome size and the DNA content in picograms (pg) measured for *P. trifoliata* cv. Flying Dragon (Kayum et al. 1998) converted to Mbp using the formula proposed by Doležel et al. (2003).

In order to establish the relative position of each BAC along the chromosomes, 15 chromatids with clear hybridization signals were selected (except for the BAC 01B09, where only four chromatids were analyzed). The software Image Tool 3.0 was used for measurements after the contrast and brightness of the pictures had been adjusted with Adobe Photoshop. The distance from the center of the signal to the

telomere of the opposite arm and the distance between both telomeres were used to determine the relative position of the signal along the chromatid. The chromosomes were numbered according to the descending length of the short arm.

Acknowledgements We thank Getúlio de Souza Vieira (Embrapa Cassava&Fruits) for collecting the seeds. This research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Barrett HC, Rhodes AM (1976) A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Syst Bot* 1:105–136
- Barros e Silva AE, Marques A, Santos KGB et al (2010) The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. *Chromosome Res* 18:503–514
- Befu M, Kitajima A, Ling YX et al (2000) Classification of ‘Tosa-Buntan’ pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.), ‘Washington’ navel orange (*C. sinensis* [L.] Osb.) and trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) chromosomes using young leaves. *J Japan Soc Hort Sci* 69:22–28
- Bernet GP, Bretó MP, Asins MJ (2004) Expressed sequence enrichment for candidate gene analysis of citrus tristeza virus resistance. *Theor Appl Genet* 108:592–602
- Brasileiro-Vidal AC, dos Santos-Serejo JA, Soares Filho WS et al (2007) A simple chromosomal marker can reliably distinguishes *Poncirus* from *Citrus* species. *Genetica* 129:273–279
- Cai Q, Guy CL, Moore GA (1994) Extension of the genetic linkage map in *Citrus* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation responsive loci. *Theor Appl Genet* 89:606–614
- Carvalho R, Soares Filho WS, Brasileiro-Vidal AC et al (2005) The relationship among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenet Genome Res* 109:276–282
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215–220
- Chen Q, Liang G (1989) Study on the karyotype of *Poncirus*. *Acta Bot Yunnanica* 11:103–106

- Cornélio MTMN, Figueirôa ARS, Santos KGB et al (2003) Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. *Plant Syst Evol* 240:149–161
- Cristofani M, Machado MA, Grattapaglia D (1999) Genetics linkage maps of *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. *Euphytica* 109: 25–32
- Doležal J, Bartoš J, Voglmayr H et al (2003) Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* 51:127–128
- Durham RE, Liou PC, Gmitter Jr. FG et al (1992) Linkage of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in *Citrus*. *Theor Appl Genet* 84:39–48
- Gmitter FG Jr, Xiao SY, Huang S et al (1996) A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region. *Theor Appl Genet* 92:688–695
- Guerra MS (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Rev Bras Genet* 9:741–743
- Guerra M (2009) Chromosomal variability and the origin of *Citrus* species. In: Mahoney CL, Springer DA (Eds) *Genetic Diversity*. Nova Science Publishers, Inc, New York
- Guerra M, Santos KGB, Silva AEB et al (2000) Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantoideae – A case of parallel chromosomal evolution. *Am J Bot* 87:35–747
- Heslop-Harrison JS, Harrison GE, Leitch IJ (1992) Reprobing of DNA:DNA *in situ* hybridization preparations. *Trends Genet* 8:372–373
- Jiang J, Gill BS, Wang GL et al (1995) Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4487–4491
- Kayum M, Koç NK, Rokka VM (1998) Variation of the nuclear DNA content of species of subtribe Citrinae (Rutaceae). *HortScience* 33:1247–1250
- Liang G (1990) Studies on the cytotaxonomy of *Citrus*. I. Karyotype and evolution of 30 taxa of the genera *Citrus*. *J Wuhan Bot Res* 8:1–7
- Marques A, Fuchs J, Ma L et al (2011) A characterization of eu- and heterochromatin of *Citrus* with a focus on the condensation behaviour of 45S rDNA chromatin. *Cytogenet Genome Res* doi:10.1159/000323971
- Meissner Filho PE, Soares Filho WS, Velame KVC et al (2002) Reação de porta-enxertos híbridos ao *Citrus tristeza virus*. *Fitopatol Bras* 27:312–315

- Miranda M, Ikeda F, Endo T et al (1997) Comparative analysis on the distribution of heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* chromosomes. *Chromosome Res* 5:86–92
- Moore GA (2001) Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends Genet* 17:536–540
- Moraes AP, Soares Filho WS, Guerra M (2007a) Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Res* 15:115–121
- Moraes AP, Lemos RR, Brasileiro-Vidal AC et al (2007b) Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrid accessions of mandarin. *Cytogenet Genome Res* 119:275–281
- Moraes AP, Mirkov TE, Guerra M (2008) Mapping the chromosomes of *Poncirus trifoliata* Raf. by BAC-FISH. *Cytogenet Genome Res* 121:277–281
- Pedrosa A, Schweizer D, Guerra M (2000) Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Theor Appl Genet* 100:361–367
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J et al (2002) Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161:1661–1672
- Pikaard CS (2000) The epigenetics of nucleolar dominance. *Trends Genet* 16:495–500
- Preedasuttijit B, Kitajima A, Yamasaki A et al (2007) Chromosome identification and characterization in trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) by CMA and PI/DAPI staining and GISH. *J Japan Soc Hort Sci* 76:197–204
- Richard GF, Pâques F (2000) Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO Rep* 1:122–126
- Ruiz C, Asins MJ (2003) Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps. *Theor Appl Genet* 106:826–836
- Sahin Çevik M, Moore GA (2007) Construction of a genetic linkage map of *Citrus* with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers using a progeny population from a complex intergeneric cross. *Turk J Bot* 31:79–86
- Samuel R, Ehrendorfer F, Chase MW et al (2001) Phylogenetic analyses of Aurantioideae (Rutaceae) based on non-coding plastid DNA sequences and phytochemical features. *Plant Biol* 3:77–87
- Sankar AA, Moore GA (2001) Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map. *Theor Appl Genet* 102:206–214

- Torres AM, Mau-Lastovicka T, Williams TE et al (1985) Segregation distortion and linkage of *Citrus* and *Poncirus* isozyme genes. *J Hered* 76:289–294
- Wanzenböck EM, Schöfer C, Schweizer D et al (1997) Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 11:1007–1016
- Yang ZN, Ye XR, Choi S et al (2001) Construction of a 1.2 Mb contig including the citrus tristeza virus resistance gene locus using a bacterial artificial chromosome library of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genome* 44:382–393

5. Manuscrito II

Chromosome homeologies between Citrus and Poncirus - The comparative cytogenetic map of the mandarin Citrus reticulata Blanco cv. Cravo (Rutaceae)

Manuscrito a ser submetido à revista *Tree Genetics & Genomes*

The name(s) of the Author (s)

Silvokleio da Costa Silva^a, Walter dos Santos Soares Filho^b, Andrea Pedrosa-Harand^a

A concise and informative title

Chromosome homeologies between *Citrus* and *Poncirus* - The comparative cytogenetic map of the mandarin *Citrus reticulata* Blanco cv. Cravo (Rutaceae)

The Affiliation (s) and address (es) of the author (s)

^aLaboratory of Cytogenetics and Plant Molecular Biology, Department of Botany,
Federal University of Pernambuco, Recife, PE (Brazil)

^bEmbrapa Cassava & Fruits, Cruz das Almas - BA (Brazil)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author:

Andrea Pedrosa-Harand

Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Vegetal

Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-420, Recife, PE (Brazil)

Tel. + 55 81 2126 8846

Fax + 55 81 2126 8348

E-mail:

andrea.pedrosaharand@pesquisador.cnpq.br

Abstract

Mandarins are among the main citrus species and constitute a morphologically diverse and taxonomically controversial group. Cytogenetic studies were limited to the determination of its karyotype formula and the localization of rDNA sites. The cytogenetic map of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., established using single-copy BACs together with the pattern of CMA⁺ bands and rDNA probes, represented an important milestone for the cytogenetic studies of the genus *Citrus*. In this work, the cytogenetic map of *C. reticulata* cv. Cravo (2C + 10D + 4F + 2F_L), one of the pure species of the genus, was built by FISH using BACs from *P. trifoliata*, including some related to the citrus tristeza virus resistance locus (CTV), to detect homeologies and structural karyotypic changes between these species. Except for chromosomes 2 and 3, chromosome types and position of BACs were maintained, indicating a high synteny between both karyotypes. A break of colinearity was observed between BAC clones and the CMA⁺ bands from chromosome 3, which could be explained by a pericentromeric inversion together with the expansions and contractions of the satellite DNA sequences that constitute the heterochromatic bands of this chromosome pair.

Keywords: BAC-FISH, heteromorphism, homeology, synteny, mandarin

Abbreviations

BAC - Bacterial artificial chromosome

DAPI - 4'6-diamidino-2-phenylindole

CMA - Chromomycin A₃

FISH - Fluorescence *in situ* hybridization

CTV - Citrus tristeza virus

rDNA – Ribosomal DNA

Introduction

Mandarins are among the main representatives of the genus *Citrus* (L.) (Aurantioideae, Rutaceae) and form a morphologically diverse and taxonomically controversial group. The main classification systems diverge largely with respect to the number of species recognized in this group, from 36 species recognized by Tanaka to only three by Swingle (revised by Swingle and Reece 1967). Molecular studies also revealed the existence of a large heterogeneity among mandarins but proposed that most accessions belong to a single species, *C. reticulata* Blanco (Luro et al. 1995; Fang and Roose 1997; Coletta Filho et al. 1998; Federici et al. 1998; Nicolosi et al. 2000).

As most of the other species of *Citrus* and related genera, mandarins show stability in their chromosome number ($2n = 2x = 18$) and chromosome morphology (meta- and submetacentrics) (Guerra 2009). However, more detailed methods of analyses, such as double staining with CMA and DAPI fluorochromes and fluorescent *in situ* hybridization with rDNA probes, revealed a wide variation in the number and distribution of heterochromatic CMA⁺/DAPI⁻ bands (Cornélio et al. 2003; Carvalho et al. 2005) and sites of 5S and 45S rDNA in the genus (Pedrosa et al. 2000; Carvalho et al. 2005), as well as among mandarins (Moraes et al. 2007b). These studies showed that there is a high diversity in their banding patterns, allowing group different cultivars by cytogenetic similarity. Most of the citrus cultivars were classified as heteromorphic, which are probably of hybrid origin, and a minority as homomorphic, corresponding to those considered pure or true species (Cornélio et al. 2003; Yamamoto and Tominaga 2003; Moraes et al. 2007b).

Cytogenetically, among the pure *Citrus* species are pummelo (*C. maxima* Burm cv. Israel and Pink, with karyotype formula $4A + 2C + 4D + 6F + 2F_L$) and citron (*C.*

medica L. var. Etrog, with $2B + 8D + 6F + 2F_L$), as well as two groups of mandarins: the wild species [*C. reshni* hort. ex Tan. and *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tan., with a karyotype formula $14D + 4F$] and the Mediterranean taxa [*C. deliciosa* Ten. cv. Rio, Montenegrina and Comum and *C. reticulata* Blanco cv. Cravo, both with $2C + 10D + 4F + 2F_L$] (Cornélio et al. 2003; Yamamoto and Tominaga 2003; Carvalho et al. 2005; Moraes et al. 2007a,b; Guerra 2009; Barros e Silva et al. 2010; Mendes et al. 2011).

The detailed chromosome characterization, particularly the identification of chromosome pairs and homeologous chromosomes in closely related species, has been one of the main difficulties in cytogenetic studies in the Aurantioideae subfamily. After BAC-FISH mapping in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. ($4B + 8D + 4F + 2F_L$), a species related to *Citrus*, 13 chromosomal markers were established and the nine chromosome pairs of the species could be recognized (Moraes et al. 2008; Silva et al. 2011). These markers, associated with the $CMA^+/DAPI^-$ banding patterns and distribution of rDNA sites, were latter used in the construction of the first comparative cytogenetic map with a representative of the *Citrus* genus (*C. medica*, Mendes et al. 2011). Based on the karyotype formula established for these two species (Carvalho et al. 2005; Brasileiro-Vidal et al. 2007), it was expected a high conservation of chromosome types between the homeologous, only differentiated by a chromosome pair (B in *P. trifoliata* /F in *C. medica*). However, *Poncirus* and citron differed in six of the nine chromosome pairs (Mendes et al. 2011).

In this work, the cytogenetic map of *C. reticulata* cv. Cravo was constructed by BAC-FISH using markers previously mapped in *P. trifoliata* and citron, as well as the 45S DNAr, in order to recognize possible homeologies and the chromosome changes involved in the evolution of these species. The 5S rDNA has been previously mapped in this accession adjacent to the 45S rDNA site in a D-type chromosome (Moraes et al.

2007b). Because *C. reticulata* has been suggested to be involved in the origin of the sour (*C. aurantium* L.) and sweet [*C. sinensis* (L.) Osbeck] oranges (revised by Moore 2001), its karyotype will be important for later comparisons to these economically important species (Spiegel-Roy and Goldschmidt 1996; Singh and Rajam 2009).

Material and methods

Plant material and chromosome preparation

Seeds from *C. reticulata* cv. Cravo were obtained from the *Citrus* Active Germplasm Bank of the Embrapa Cassava & Fruits, Cruz das Almas, Bahia, Brazil. Root tips from germinating seeds were pre-treated with 8-hydroxyquinoline (0.002 M) for 5 h at 18°C, fixed in ethanol-acetic acid 3:1 (v/v) for 18-24 h at room temperature and stored at -20°C. The cytological preparation was performed as described by Silva et al. (2011).

CMA/DAPI staining

Aged slides were stained with CMA and DAPI as described by Moraes et al. (2007b), except that 0.1 mg/mL of CMA was used. The slides were mounted in McIlvaine's buffer (pH 7.0) and glycerol (1:1, v/v) and images of the best metaphases were captured in an epifluorescence Leica DMLB microscope equipped with a Cohu CCD video camera using the Leica QFISH software. Slides were destained and stored at -20°C for sequential *in situ* hybridization.

Probes

Ten selected BACs (01B09, 02C12, 20C13 14A12, 21L13, 24C13, 28A05, 28A07, 55B01 and 59C23) from the *P. trifoliata* cv. Pomeroy genomic library (Yang et al. 2001), previously used as chromosome markers (Moraes et al. 2008; Silva et al. 2011) were used as probes. The 45S rDNA sites were localized using the R2 probe from *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Wanzenböck et al. 1997). DNA from BACs and the R2 plasmid were isolated using the Plasmid Mini Kit (QIAGEN) following the manufacturer's instructions. All probes were labelled by nick translation (Roche Diagnostics) using Cy3-dUTP (GE).

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

The FISH procedure was performed according to Silva et al. (2011) with final stringency of 72%. All preparations were counterstained and mounted with 2 µg/mL DAPI in Vectashield (Vector). Re-probing of slides for localization of different DNA sequences on the same cell was performed following Heslop-Harrison et al. (1992). Images were acquired as previously described. For final processing, they were superimposed, pseudocolored and adjusted for brightness and contrast using the Adobe Photoshop CS3 version 10.0.

Chromosome measurements

Mean relative chromosome size, CMA⁺ band size and arm ratio was calculated for each pair based on measurements from five mitotic metaphases according to Silva et al. (2011). Chromosome morphology was based on Guerra (1986) and nomenclature for chromosome types followed Guerra 1993 and Carvalho et al. (2005).

The software Image Tool 3.0 was used to establish the relative position of each single-copy BAC along the chromosomes according to Fonsêca et al. (2010) and Silva

et al. (2011). For that, clear hybridization signals from 15 chromatids were selected. The chromosomes were numbered according to the cytogenetic map of *P. trifoliata* (Silva et al. 2011).

DNA content estimations by flow cytometry

DNA measurements were performed according to Doležel and Göhde (1995). Briefly, small pieces of leaves from the sample and from *Raphanus sativus* L. (2C=1.11 pg; Doležel et al. 1992), used as the internal standard, were mixed in a glass Petri dish with 0.5 mL ice-cold Otto buffer I (0.1 M citric acid + 0.5 % Tween 20), co-chopped with a sharp razor blade and filtered through a 30 µm mesh nylon membrane into a cytometry tube. Finally, after addition of 1 mL of Otto II buffer (0.4 M Na₂HPO₄.12H₂O) containing propidium iodide (1 mg/mL), β-mercaptoethanol (2 µL/mL) and RNase (1 mg/mL), plant cells were immediately analyzed by flow cytometry.

The fluorescence intensity of isolated nuclei (5000 particles) were analyzed in a Partec CyFlow Space flow cytometer (Partec GmbH, Münster, Germany) equipped with a green solid-state laser at 532 nm and FloMax software. Each sample was analyzed at least three times on three consecutive days; only analyses with a between-day fluctuation below 4% were considered.

Nuclear DNA content (2C) was calculated as sample peak mean/ standard peak mean × 2C DNA content of standard (pg) and converted to Mbp by the formula proposed by Doležel et al. (2003).

Results

Citrus reticulata cv. Cravo genome comprises approximately 373 Mbp (1C = 0.38 pg, Supplemental Fig. S1) distributed in 18 meta- and submetacentric chromosomes varying in size from 1.70 to 2.65 μm . Based on the pattern of CMA⁺ heterochromatic bands, the karyotype formula observed was 2C + 10D + 4F + 2F_L (Fig. 1a).

Hybridizing a set of 10 probes associated to the CMA⁺ banding pattern, all chromosomes of the complement (Fig. 1b and Supplemental Fig. S2) could be recognized and classified according to the nomenclature system established for citrus species (Silva et al. 2011). Five out of these BACs (20C13, 28A07, 01B09, 55B01 and 59C23, Supplemental Fig. S2) were mapped on the long chromosome arms, while the others, together with the 45S rDNA sites, were localized on the short arms (Fig. 1c). The relative positions of each chromosome marker are represented in the idiogram (Fig. 2).

The metacentric F_L type chromosome pair, corresponding to chromosome 1, was recognized as the largest of the complement, as well as for the presence of BAC 24C13 in the terminal region of the short arm. Chromosome 2, identified by BAC 21L13 located in the terminal region of the short arm, was a D type and metacentric.

Chromosome 3 was identified as a C type metacentric, in which the BACs 14A12 and 28A07 were mapped adjacent to the CMA⁺ bands of the short and long arms, respectively (Fig. 2; Supplemental Fig. S2a). The 45S rDNA probe revealed a weak centromeric signal not corresponding to a CMA⁺ band (Fig. 1b).

The BACs 02C12 and 20C13 were mapped in the interstitial region of the short and long arms of pair 4 (D type and metacentric), respectively (Fig. 2; Supplemental

Fig. S2b). The BAC 28A05 was mapped in the terminal region of the short arm of the metacentric chromosome pair 6, which is the smallest D-type chromosome.

Among the five D type chromosome, only pairs 5 (metacentric with a 45S rDNA site co-localized with the CMA⁺ band) and 7 (submetacentric) were not recognized by any of the BACs used in this study. The 45S rDNA site and its corresponding CMA⁺ band were heteromorphics: the largest site was descondensed, what was not observed for the smallest site (Fig. 1b-c and Fig. 2).

Chromosome 8, an F type submetacentric, was identified by BAC 01B09, mapped in the terminal region of the short arm (Fig. 2; Supplemental Fig. S2c). The chromosome pair 9, also an F type and submetacentric, presented BACs 55B01 and 59C23 and was classified as the smallest pair of the chromosome complement (Fig. 2; Supplemental Fig. S2d). These two BACs were mapped to the region that confers resistance to citrus tristeza virus (CTV) and were localized in the interstitial region of the long arm of this chromosome pair.

Approximately 20% of *C. reticulata* cv. Cravo chromosome complement corresponded to constitutive heterochromatin CMA⁺/DAPI, varying from 19.34% in the chromosome 5 to 45.17% in the chromosome 3. Chromosomes 1, 8 and 9 showed no CMA⁺ heterochromatic blocks.

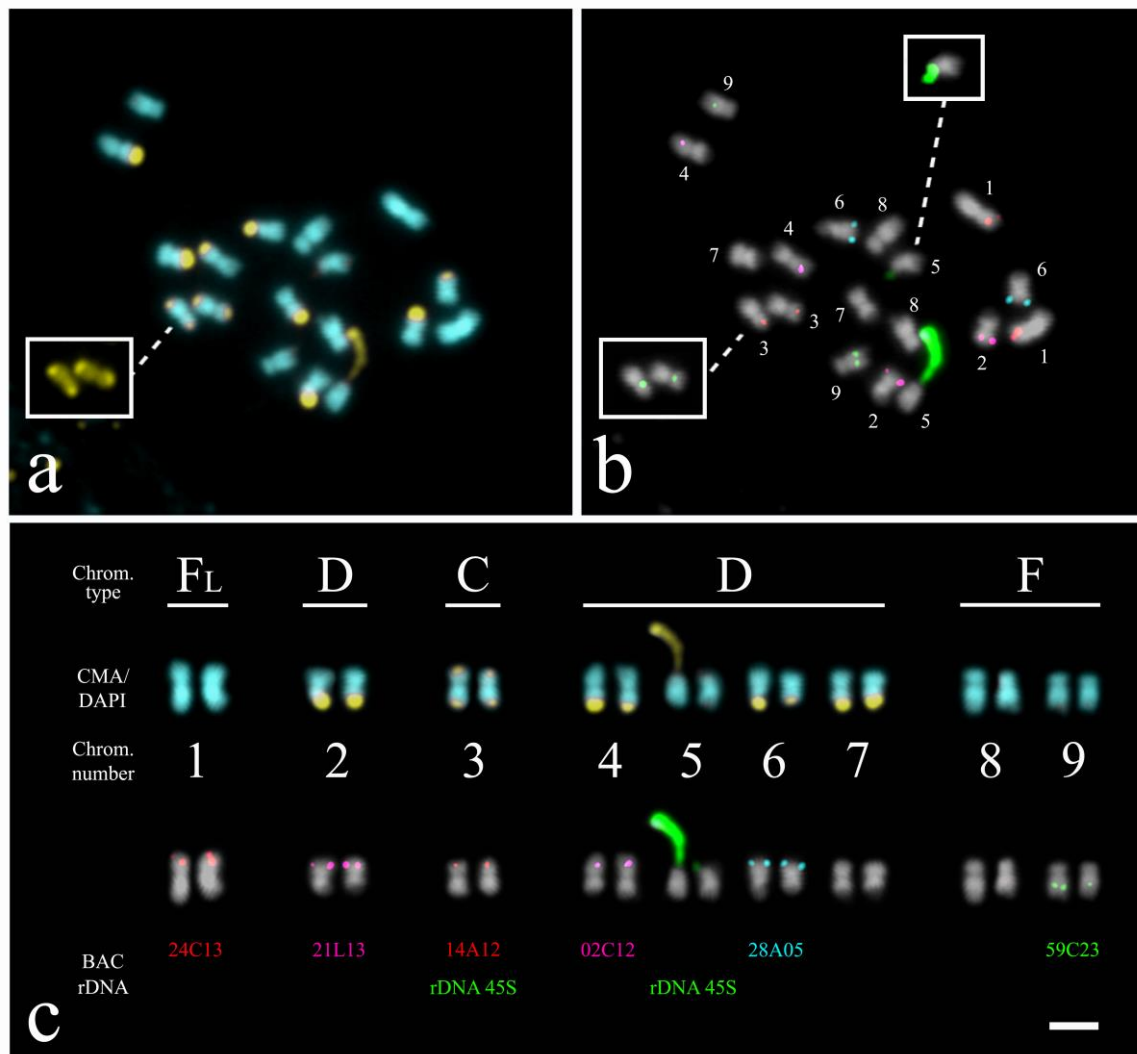


Fig. 1 Mitotic metaphase from *Citrus reticulata* Blanco cv. Cravo stained with CMA/DAPI (a) and hybridized *in situ* with different BACs selected from the *P. trifoliata* library (b). (c) Karyograms based on the same metaphase illustrated in a and b. Insert in a shows C type chromosomes stained with CMA only. Inserts in b shows chromosomes with higher exposure to distinguish the minor signals from 45S rDNA on chromosome 3 and the heteromorphism for chromosome pair 5. Bar in c corresponds to 2.5 μ m.

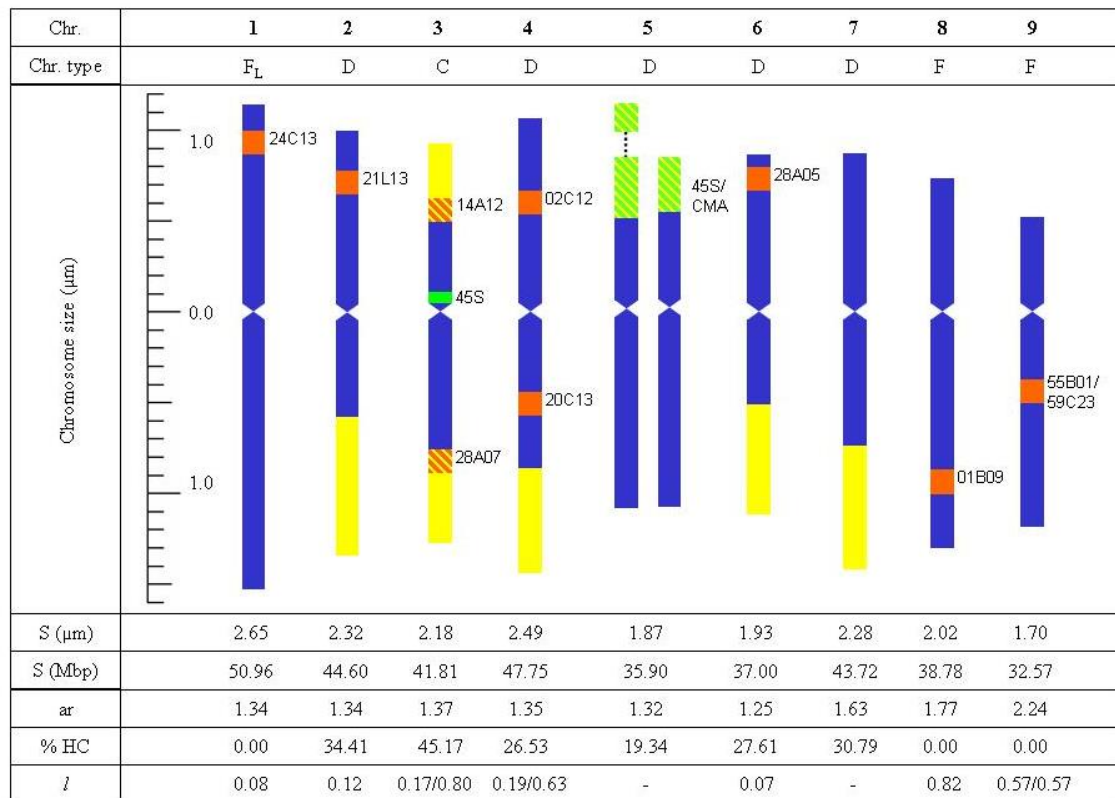


Fig. 2 Idiogram of *Citrus reticulata* Blanco cv. Cravo showing chromosome types, the average size of individual chromosomes (S) in μm and Mbp, arm ratio (ar), percentage of heterochromatin per chromosome (% HC) and BAC location (l). The 45S rDNA sites are identified in green, whereas the 45S rDNA site co-localized with the CMA⁺ bands on the chromosome 5 is represented in green and yellow. The CMA⁺ bands and BACs sites are indicated, respectively, in yellow and orange. In chromosome 9, BACs 55B01 and 59C23 indicate the location of the CTV locus. The heteromorphism between homeologues for the 45S rDNA site on chromosome 5 is indicated, but only part of the larger 45S rDNA cluster is represented.

Discussion

In this paper, we present the cytogenetic map for *C. reticulata* cv. Cravo, which was built using the same set of BACs previously mapped to *Poncirus trifoliata* (Moraes et al. 2008; Silva et al. 2011), together with the distribution of CMA⁺ bands and 45S rDNA sites.

Heterochromatin distribution and quantity

Citrus reticulata cv. Cravo presented a genome with approximately 373 Mbp (1C = 0.38 pg), similar to that previously reported for other cultivars of this species (Ollitrault et al. 1994). The karyotype formula of the analyzed cultivar *C. reticulata* cv. Cravo obtained through banding with CMA and DAPI fluorochromes corroborates those previously reported for this cultivar (Cornélio et al. 2003; Moraes et al. 2007b). Chromosome measurements revealed that approximately 21.4% (79.8 Mbp) of the *C. reticulata* genome is composed by CMA⁺/DAPI⁻ heterochromatin (HC). Although presenting different karyotype formula, similar amount of heterochromatin was observed for *P. trifoliata* (1C = 0.39 pg/ ~376.5 Mbp; HC = 21.8% or 82 Mbp) (Kayum et al. 1998; Silva et al. 2011) and *C. medica* (1C = 0.41 pg/ ~401.5 Mbp; HC = 18.4% or 73.9 Mbp) (Mendes et al. 2011).

Based on the comparison of the homeologous chromosomes in relation to the distribution of CMA⁺ bands, it is possible to suggest that expansions and contractions of tandemly repeated DNA sequences localized in these blocks, such as the satellite DNA sequence family CsSat (Barros e Silva et al. 2010), are involved in the changes in size and number of CMA⁺ bands among *P. trifoliata*, *C. medica* and *C. reticulata* (see Fig.

3). Such changes are often attributed to mechanisms as polymerase slippage, unequal crossing-over or illegitimate recombination (Viguera et al. 2001; Sumner 2002)

Localization and activation of the 45S rDNA sites

In the present study, two types of 45S rDNA sites were observed: (i) one proximal site co-localized with a CMA⁰ heterocromatic region (pair 3 / C type) and (ii) one heteromorphic site co-localized with a CMA⁺ band (pair 5 / D type). The distribution of the 5S and 45S rDNA sites in *C. reticulata* had been previously reported by Moraes et al. (2007b). However, these authors did not observe the presence of the proximal 45S rDNA site in the C chromosome, probably due to a lower sensibility in the detection of the signals. In *Citrus*, the only previous report for a 45S rDNA site on a C type chromosome was the C/5S-45S subtype described for *C. aurantium* cv. 'Variegada' (Guerra 2007). However, in this cultivar, the 5S/45S rDNA site was co-localized with the CMA⁺ band in the terminal of the short arm of this chromosome. This C/5S-45S chromosome subtype was also reported for *Fortunella ×obovata* hort. ex Tanaka (Barros e Silva et al. 2010). Regarding the heteromorphism observed in the D/45S subtype chromosome had already been described by Cornélio et al. (2003) and Moraes et al. (2007b). Differences in size and condensation may be related to a differential transcriptional activation between either sites or a polymorphism in site size (see Marques et al. 2011).

Evolution of chromosomes of *Citrus reticulata* cv. Cravo

Recently, Mendes et al. (2011) established the first cytogenetic map for a species of the genus *Citrus*, *C. medica*, and compared it to the previously established map of *P. trifoliata* (Moraes et al. 2008; Silva et al. 2011). Based on their karyotype formula, it would be expected that *P. trifoliata* (4B+8D+4F+2F_L) and *C. medica* (2B+8D+6F+2F_L)

differed in only one chromosome pair (B in *P. trifoliata* /F in *C. medica*). However, changes such as expansions and contractions of repetitive DNA clusters, as well as possible inversions, resulted in differences between the homeologous chromosomes 2, 3, 5, 6, 7 and 9. Given the higher number of differences between the CMA⁺ banding pattern of *C. reticulata* (2C+10D+4F+2F_L) and *P. trifoliata*, a higher level of divergence between their homeologous, inferred by BACs markers, would be expected. In spite of that, seven of the nine homeologous pairs (chromosomes 1, 4, 5, 6, 7, 8 and 9) were conserved in relation to the chromosome type and position of BACs, but with small variations in chromosome size and quantity of CMA⁺ heterochromatin, resulting in the modification of chromosome types from B to D and from B to C (Fig. 3) in *C. reticulata* in relation to *P. trifoliata*, respectively. Therefore, the main karyotypic variation occurred just on the marker chromosomes (2 and 3), most commonly used to identify cultivars (Guerra 2009).

Given the phylogenetic relationships established via RAPD, SCAR, SSR, AFLP and SRAP markers (Nicolosi et al. 2000; Barkley et al. 2006; Pang et al. 2007; Uzun et al. 2009; Li et al. 2010), it is parsimonious to assume that the karyotypic similarity observed between *C. reticulata* and *P. trifoliata* is the result of the conservation of an ancestral karyotype, while several changes occurred in the lineage of citron (see Mendes et al. 2011). Similarly, chromosomes 1, 4 and 8, which are conserved in the three species, seem to represent ancestral states. The presence of extra rDNA sites on chromosome 2 and 3 in *P. trifoliata* (3 per haploid complement) is probably a derived state in Rutaceae. This is supported by the presence of a lower number of 45S rDNA loci (1 or 2 per haploid complement) in the more basal species *Triphasia*, *Murraya*, *Severinia* and *Atalantia* (Barros e Silva et al. 2010), as well as, in the true *Citrus* species *C. medica*, *C. reticulata* and *C. maxima* (Carvalho et al. 2005; Moraes et al. 2007a,b;

Moraes et al. 2008; Mendes et al. 2011; Silva et al. 2011 and present work). No synapomorphy was detected for *Citrus* and most of the events leading to a karyotypic change seem to have occurred in the *C. medica* lineage, although expansion of this analysis to other *Citrus* species is still necessary. As suggested by Mendes et al. (2011), no translocation could be detected between *Poncirus* and *Citrus*, indicating a high synteny between both genera.

Acknowledgements

We would like to thank Luiz Gustavo R. Souza for your valuable comments on the manuscript and Getúlio de Souza Vieira (Embrapa Cassava & Fruits) by his technical support in the field. This work was carried out with financial support from the Brazilian agency Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

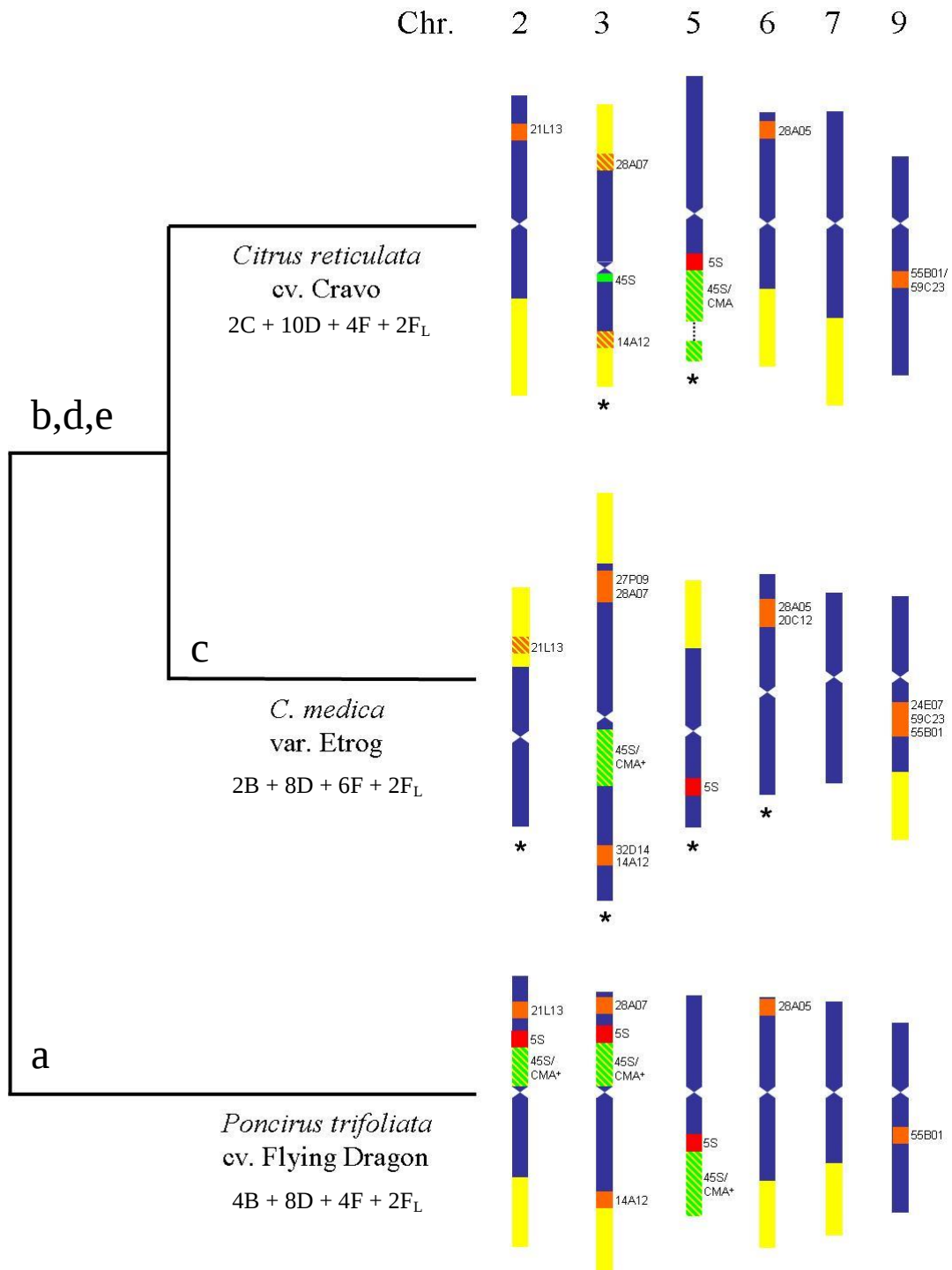


Fig. 3 Schematic representation of chromosomes 2, 3, 5, 6, 7 and 9 showing the differences between *Citrus reticulata*, *C. medica* and *Poncirus trifoliata* chromosome types, size of CMA⁺ heterochromatic bands, distribution of rDNA sites and BACs (adapted from Moraes et al. 2008; Silva et al. 2011 and Mendes et al. 2011). **a)** Gain of

rDNA sites on chromosomes 2; **b)** loss of the 5S rDNA on chromosome 3; **c)** loss of the 45S rDNA on chromosome 5; **d)** pericentric inversion involving the proximal 45S rDNA site on chromosome 3; **e)** gain and loss of CMA⁺ blocks. The phylogenetic relationships among species were based on Uzun et al. (2009). Asterisks indicate a 180° rotation of the chromosomes in respect to the ideogram in order to maintain marker colinearity with *P. trifoliata*. The chromosomes are represented on the same scale.

References

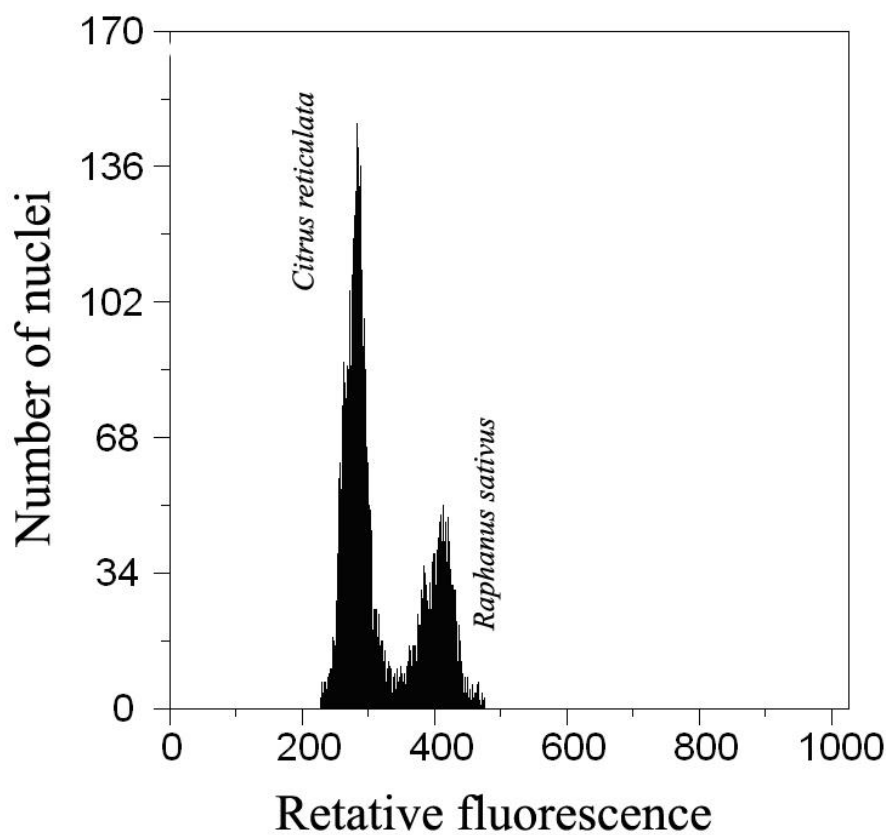
- Barkley NA, Roose ML, Krueger RR, Federici CT (2006) Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theor Appl Genet* 112:1519–1531. doi:10.1007/s00122-006-0255-9
- Barros e Silva AE, Marques A, Santos KGB, Guerra M (2010) The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. *Chromosome Res* 18:503–514. doi:10.1007/s10577-010-9130-2
- Brasileiro-Vidal AC, dos Santos-Serejo JA, Soares Filho WS, Guerra M (2007) A simple chromosomal marker can reliably distinguishes *Poncirus* from *Citrus* species. *Genetica* 129:273–279. doi:10.1007/s10709-006-0007-4
- Carvalho R, Soares Filho WS, Brasileiro-Vidal AC, Guerra M (2005) The relationship among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenet Genome Res* 109:276–282. doi:10.1159/000082410
- Coletta Filho HD, Machado MA, Targon MLPN, Moreira MCPQDG, Pompeu Jr J (1998) Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. *Euphytica* 102:133–139. doi:10.1023/A:1018300900275
- Cornélio MTMN, Figueirôa ARS, Santos KGB, Carvalho R, Soares Filho WS, Guerra M (2003) Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. *Plant Syst Evol* 240:149–161. doi:10.1007/s00606-003-0012-3
- De Felice B, Wilson RR, Ciarmiello L, Scarano MT, Ferrante S (2006) Characterization of a novel satellite DNA sequence from flying dragon (*Poncirus trifoliata*). *Genetica* 127:45–53. doi:10.1007/s10709-005-2479-z

- Doležel J, Bartoš J, Voglmayr H, Greilhuber J (2003) Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* 51A:127–128. doi:10.1002/cyto.a.10013
- Doležel J, Sgorbati S, Lucretti S (1992) Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiol Plant* 85:625–631. doi:10.1111/j.1399-3054.1992.tb04764.x
- Doležel J, Göhde W (1995) Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high resolution flow cytometry. *Cytometry* 19:103–106. doi:10.1002/cyto.990190203
- Fang DQ, Roose ML (1997) Identification of closely related *Citrus* cultivars with intersimple sequence repeat markers. *Theor Appl Genet* 95:408–417. doi:10.1007/s001220050577
- Federici CT, Fang DQ, Scora RW, Roose ML (1998) Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor Appl Genet* 96:812–822. doi:10.1007/s001220050807
- Fonsêca A, Ferreira A, Santos TRB, Mosiolek M, Bellucci E, Kami J, Gepts P, Geffroy V, Schweizer D, Santos KGB, Pedrosa-Harand A (2010) Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Res* 18:487–502. doi:10.1007/s10577-010-9129-8
- Guerra M (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Brazil J Genetics* 9:741–743
- Guerra M (1993) Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity*, 71:234–241

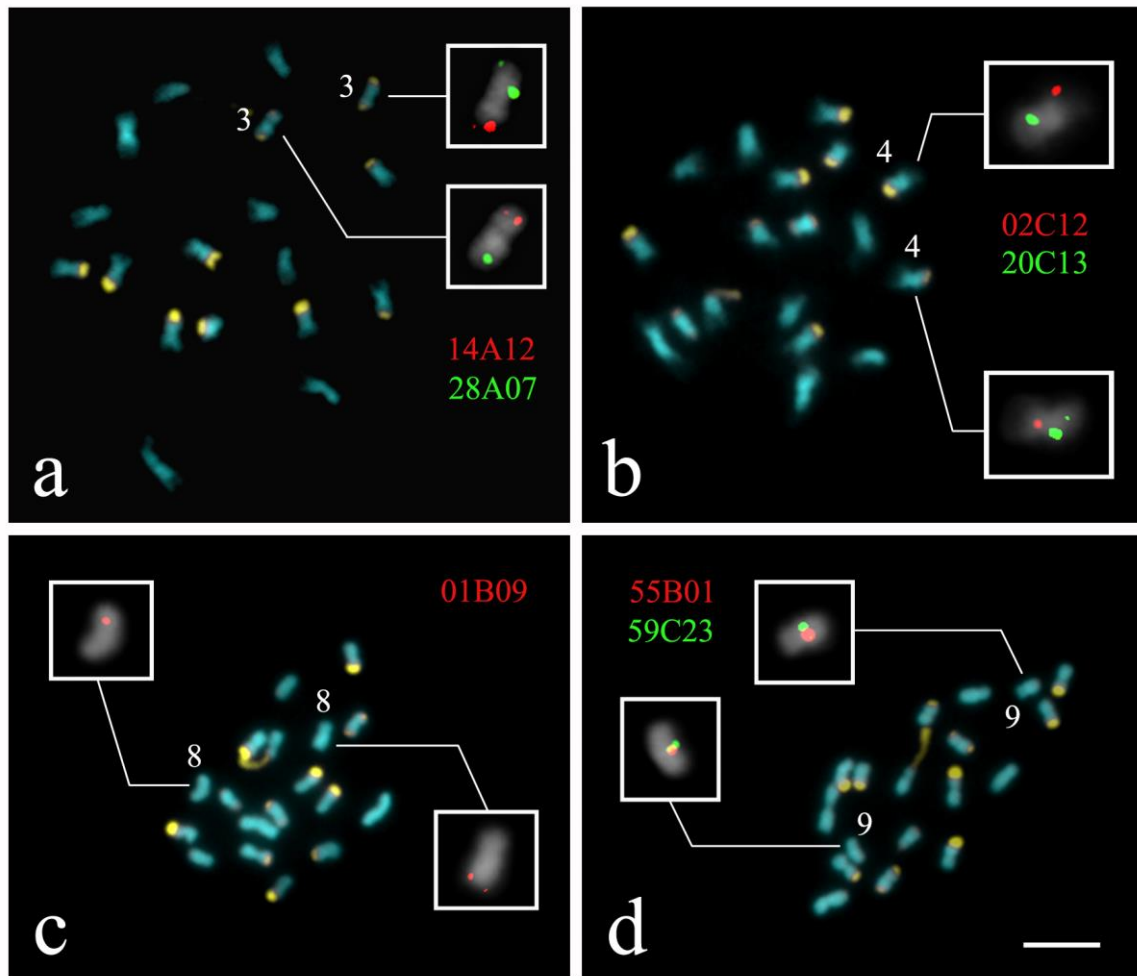
- Guerra M (2009) Chromosomal variability and the origin of *Citrus* species. In: Mahoney CL, Springer DA (Eds) Genetic Diversity. Nova Science Publishers, Inc., New York, pp 51–68
- Guerra S (2007) Origem e variabilidade cariotípica da laranja-azeda (*Citrus aurantium* L.). Monograph, Federal University of Pernambuco
- Heslop-Harrison JS, Harrison GE, Leitch IJ (1992) Reprobing of DNA: DNA *in situ* hybridization preparations. Trends Genet 8:372–373
- Kayum M, Koç NK, Rokka VM (1998) Variation of the nuclear DNA content of species of subtribe Citrinae (Rutaceae). HortScience 33:1247–1250
- Luro F, Laigret F, Bové JM, Ollitrault P (1995) DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in *Citrus*. HortScience 30:1063–1067
- Li X, Xie R, Lu Z, Zhou Z (2010) The origin of cultivated *Citrus* as inferred from internal transcribed spacer and chloroplast DNA sequence and amplified fragment length polymorphism fingerprints. J Am Soc Hortic Sci 135:341–350
- Marques A, Fuchs J, Ma L, Heckmann S, Guerra M, Houben A (2011) Characterization of eu- and heterochromatin of *Citrus* with a focus on the condensation behavior of 45S rDNA chromatin. Cytogenet Genome Res 134:72–82. doi:10.1159/000323971
- Mendes S, Moraes AP, Mirkov TE, Pedrosa-Harand A (2011) Chromosome homeologies and high variation in heterochromatin distribution between *Citrus* L. and *Poncirus* Raf. as evidenced by comparative cytogenetic mapping. Chromosome Res 19:521–530. doi:10.1007/s10577-011-9203-x
- Moore GA (2001) Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. Trends Genet 17:536–540. doi:10.1016/S0168-9525(01)02442-8
- Moraes AP, Soares Filho WS, Guerra M (2007a) Karyotype diversity and the origin of

- grapefruit. *Chromosome Res* 15:115–121. doi:10.1007/s10577-006-1101-2
- Moraes AP, Lemos RR, Brasileiro-Vidal AC, Soares Filho WS, Guerra M (2007b) Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrid accessions of mandarin. *Cytogenet Genome Res* 119:275–281. doi:10.1159/000112074
- Moraes AP, Mirkov TE, Guerra M (2008) Mapping the chromosomes of *Poncirus trifoliata* Raf. by BAC-FISH. *Cytogenet Genome Res* 121:277–281. doi:10.1159/000138897
- Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, La Malfa S, Continella G, Tribulato E (2000) *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor Appl Genet* 100:1155–1166. doi:10.1007/s001220051419
- Ollitrault P, Dambier D, Luro F, Duperray C (1994) Nuclear genome size variations in *Citrus*. *Fruits* 49:390–393
- Pang XM, Hu CG, Deng XX (2007) Phylogenetic relationship within *Citrus* and related genera as inferred from AFLP markers. *Genet Resour Crop Evol* 54:429–436. doi:10.1007/s10722-006-0005-5
- Pedrosa A, Schweizer D, Guerra M (2000) Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Theor Appl Genet* 100:361–367. doi:10.1007/s001220050047
- Silva SC, Marques A, Soares Filho WS, Mirkov TE, Pedrosa-Harand A, Guerra MS (2011) The cytogenetic map of the *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. - a nomenclature system for chromosomes of all citric species. *Trop Plant Biol* 4:99–105. doi:10.1007/s12042-011-9072-7
- Singh S, Rajam MV (2009) *Citrus* biotechnology: Achievements, limitations and future directions. *Physiol Mol Biol Plants* 15:3–22. doi:10.1007/s12298-009-0001-2

- Spiegel-Roy P, Goldschmidt EE (1996) Biology of *Citrus* – biology of horticultural crops. Cambridge University Press, Cambridge
- Sumner AT (2002). Chromosomes organization and function 1a ed. Berlim: Blackwell Publising, pp 294
- Swingle WT, Reece PC (1967) The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: Reuther W, Weber HJ, Batchelor LD (eds) The *Citrus* industry. History, world distribution, botany and varieties, vol I. University of California Press, Berkeley, pp 190–430
- Uzun A, Yesiloglu T, Aka-Kacar Y, Tuzcu O, Gulsen O (2009) Genetic diversity and relationships within *Citrus* and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs). *Sci Hortic* 121:306–312. doi:10.1016/j.scienta.2009.02.018
- Viguera E, Canceill, D, Ehrlich SD (2001). Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J* 20: 2587-2595. doi: 10.1093/emboj/20.10.2587
- Wanzenböck EM, Schöfer C, Schweizer D, Bachmair A (1997) Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 11:1007–1016. doi:10.1046/j.1365-313X.1997.11051007.x
- Yamamoto M, Tominaga S (2003) High chromosomal variability of mandarins (*Citrus* spp.) revealed by CMA banding. *Euphytica* 129:267–274. doi:10.1023/A:1022284908424
- Yang ZN, Ye XR, Choi S, Molina J, Moonan F, Wing RA, Roose ML, Mirkov TE (2001) Construction of a 1.2 Mb contig including the citrus tristeza virus resistance gene locus using a bacterial artificial chromosome library of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genome* 44:382–393. doi:10.1139/gen-44-3-382



Supplemental Fig. S1. Flow cytometric DNA content (2C value) analysis of *Citrus reticulata* cv. Cravo using *Raphanus sativus* (2C = 1.11 pg; Doležel et al. 1992) as an internal reference standard. Nuclei were isolated in Otto's buffers and stained with propidium iodide. The coefficient of variation (cv) for mandarin ranged from 3.5% to 4.3%, while the standard cv ranged from 2.8% to 3.8%.



Supplemental Fig. S2. Mitotic metaphases from *Citrus reticulata* Blanco cv. Cravo stained with CMA/DAPI and hybridized *in situ* with different BACs from *P. trifoliata* library. The inserts show the enlarged chromosomes pseudocoloured in gray and the BAC signals in red and green. The numbers identify the labelled chromosome pair in each case. Bar in **d** corresponds to 5 μ m.

6. Manuscrito III

Mapa citogenético de *Citrus maxima* (Burm.) Merrill (Rutaceae): evolução dos cromossomos marcadores das espécies cítricas verdadeiras e do híbrido *C. sinensis* (L.)

Osbeck

Manuscrito a ser submetido à revista *Chromosome Research*

Título: Mapa citogenético de *Citrus maxima* (Burm.) Merrill (Rutaceae): evolução dos cromossomos marcadores das espécies cítricas verdadeiras e do híbrido *C. sinensis* (L.) Osbeck

Nome(s) do(s) autor(es)

Silvokleio da Costa Silva^a, Walter dos Santos Soares Filho^b, Andrea Pedrosa-Harand^a

Endereço do(s) autor(es)

^aLaboratório de Citogenética e Biologia Molecular Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE (Brasil)

^bEmbrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas - BA (Brasil)

Título resumido

Mapa citogenético de *Citrus maxima* (Burm.) Merr.

O endereço, e-mail, números de telefone e fax do autor de correspondência:

Andrea Pedrosa-Harand

Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Vegetal

Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-420, Recife, PE (Brasil)

Tel. + 55 81 2126 8846

Fax + 55 81 2126 8348

E-mail:

andrea.pedrosaharand@pesquisador.cnpq.br

Resumo

Citrus maxima Burm. (toranjeira) é considerada uma das espécies verdadeiras dos citros e teria dado origem, juntamente com *C. reticulata* Blanco (tangerineira), a *C. sinensis* (L.) Osbeck (laranjeira doce), o principal híbrido de interesse econômico do gênero. Com o objetivo de identificar as homeologias e alterações cariotípicas envolvidas na evolução dos cromossomos da toranjeira ($2n = 18$, 4A+2C+4D+8F) e laranjeira doce ($2n = 18$, 2B+2C+7D+7F), metáfases mitóticas destas espécies foram coradas com CMA/DAPI e hibridizadas com BACs marcadores oriundos de uma biblioteca de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., além do DNAr 5S. Os resultados foram comparados aos mapas citogenéticos previamente estabelecidos para cidreira (*C. medica* L.) var. Ethrog, tangerineira cv. Cravo e *P. trifoliata* cv. Flying Dragon. Apenas os cromossomos 1, 4 e 8 foram conservados quanto ao tipo cromossômico e localização dos BACs entre as espécies, estando os pares 2 e 3 entre os menos conservados. O mapeamento de BACs dos pares 2 e 3 em laranjeira doce revelaram cromossomos do tipo D e B/C, respectivamente, dando suporte à hipótese de que toranjeira e tangerineira estiveram envolvidas na origem deste híbrido. Embora nenhuma quebra de sintenia tenha sido detectada, os eventos de amplificação e/ou desamplificação das bandas heterocromáticas CMA⁺ parecem ser frequentes entre as espécies de *Citrus*. Essas mudanças, aliadas a uma abordagem filogenética, sugerem que semelhanças encontradas entre espécies filogeneticamente distantes podem ser fruto de reversões e não da conservação de um cariótipo ancestral.

Palavras-chave: BAC, FISH, homeologia, sintenia, evolução cariotípica

Lista de abreviações

BAC - Cromossomo artificial de bactérias

DAPI - 4'-6-diamidino-2-fenilindol

CMA - Cromomicina A₃

FISH - Hibridização *in situ* fluorescente

CTV - Vírus da tristeza dos citros

DNAr - DNA ribossomal

CsSat - DNA satélite isolado de *Citrus sinensis*

HC - Heterocromatina

Mpb – Megabases

Introdução

Citrus maxima (Burm.) Merrill (Aurantioideae, Rutaceae), anteriormente referida como *C. grandis* (L.) Osbesk e conhecida popularmente como toranjeira, é principalmente cultivada no Sudeste asiático e destinada ao consumo *in natura* (Swingle e Reece 1967). Segundo análises de dados morfológicos, cariotípicos e moleculares, *C. maxima*, juntamente com *C. medica* L. e *C. reticulata* Blanco, são consideradas espécies biológicas, também denominadas puras, básicas ou verdadeiras dos citros. Vários híbridos de importância econômica, tais como *C. sinensis* (L.) Osbeck (laranjeira doce), *C. aurantium* (L.) (laranjeira azeda) e *C. limon* (L.) Burm. f. (limoeiro siciliano), foram originados, via fecundação cruzada, das espécies puras (Scora 1975; Barrett e Rhodes 1976; Scora 1988; Nicolosi et al. 2000; Moore 2001).

As espécies de *Citrus* e gêneros relacionados, apresentam número cromossômico número ($2n = 2x = 18$), bem como cariótipo formado por cromossomos pequenos (2 à 4 μm) que variam de meta- à submetacêntricos (Guerra 2009). Entretanto, a colaração com os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA) e 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) revelaram distintos padrões de bandas heterocromáticas, permitindo avanços na caracterização cariotípica das espécies da família Rutaceae (Miranda et al. 1997a,b; Befu et al. 2000, 2001). Baseado na distribuição de bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI⁻, foram descritos os seguintes tipos cromossômicos: A (duas bandas CMA⁺ terminais e uma proximal), B (uma banda CMA⁺ terminal e uma proximal), C (duas bandas CMA⁺ terminais), D (uma banda CMA⁺ terminal), E (uma banda CMA⁺ intersticial), F (sem banda CMA⁺), G (duas bandas CMA⁺ localizadas no mesmo braço cromossômico, uma subterminal e outra terminal) e H (uma banda CMA⁺ proximal). O

tipo F_L , que é o maior (*largest*) entre os cromossomos do tipo F, pode se apresentar sem banda (F_L^0) ou com uma pequena banda terminal (F_L^+) (Guerra 1993; Carvalho et al. 2005). Os tipos cromossômicos D e F são encontrados em todos os cariótipos dos acessos de *Citrus* estudados, enquanto que os tipos A, B, C, E, G e H são raros e normalmente utilizados como cromossomos marcadores para a diferenciação de espécies cítricas (Brasileiro-Vidal et al. 2007; Guerra 2009; Barros e Silva et al., 2010).

As fórmulas cariotípicas encontradas para *C. maxima* variam segundo o acesso estudado, apresentando frequentemente heteromorfismo em pelo menos um de seus pares cromossômicos (Guerra 1993; Befu et al. 2000, 2001, 2002; Yang et al. 2002; Yamamoto et al. 2007), sugerindo que essa espécie seja naturalmente polimórfica (Moraes et al. 2007a). Entretanto, alguns trabalhos demonstraram que as cultivares ‘Pink’ e ‘Israel’ possuem cariótipo homomórfico, com fórmula cariotípica $4A + 2C + 4D + 6F + 2F_L$ (Moraes et al. 2007a; Barros e Silva et al. 2010), o que apoia a hipótese de que a toranjeira seja uma espécie pura do gênero. A análise conjunta do padrão de bandas heterocromáticas $CMA^{+/-} DAPI^{-}$ seguida da localização dos sítios de DNAr por meio da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) permitiu reconhecer que os cromossomos do tipo A e um par de F das cultivares de toranja são portadores, respectivamente, dos sítios de DNAr 45S e 5S (subtipos A/45S e F/5S) (Carvalho et al. 2005; Moraes et al. 2007a). O subtipo cromossômico F/5S é exclusivo de *C. maxima* e acessos híbridos intragenéricos, como é o caso do único cromossomo F/5S observado em tangeleiro ‘Orlando’, tangor ‘Murcott’, pomeleiro e laranjeira doce (Pedrosa et al. 2000; Moraes et al. 2007a,b).

A laranjeira doce é a principal espécie de interesse econômico dentro do gênero. Análises citogenéticas realizadas em vários de seus acessos revelaram que, apesar dessa espécie apresentar um cariótipo heteromórfico ($2B + 2C + 7D + 5F + 2F_L$), atribuído a

sua origem híbrida, o mesmo é estável, fato que provavelmente está associado a sua propagação assexuada (Matsuyama et al. 1996; Miranda et al. 1997a; Befu et al. 2000; Pedrosa et al. 2000). Além do F/5S, essa espécie apresenta dois Bs e um D com sítios de DNAr (subtipos B/45S e D/5S-45S) (Pedrosa et al. 2000).

Apesar de diversas análises darem suporte a *C. maxima* e *C. reticulata* ($2C + 10D + 4F + 2F_L$) como os prováveis parentais de *C. sinensis* (Scora 1975; Barrett e Rhodes 1976; Green et al. 1986; Yamamoto et al. 1993; Nicolosi et al. 2000; Moore 2001; Barkley et al. 2006; Yingzhi et al. 2007; Uzun et al. 2009; Li et al. 2010; Froelicher et al. 2011), as informações cariotípicas observadas nesta última espécie ($2^a + 2C + 7D + 7F$) diferem do esperado (Guerra 2009).

Em *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. ($4B + 8D + 4F + 2F_L$), uma espécie relacionada ao gênero *Citrus*, 13 BACs cópia única foram mapeados in situ por FISH estabelecidos como marcadores cromossomos-específicos o que permitiu reconhecer, em associação com o padrão de bandas $CMA^+/DAPI^-$ e a localização dos sítios de DNAr, os nove pares cromossômicos dessa espécie (Moraes et al. 2008; Silva et al. 2011). Estes marcadores foram empregados na construção de mapas citogenéticos comparativos de *C. medica* var. Etrog (Mendes et al. 2011) e *C. reticulata* cv. Cravo (Silva et al. em preparação) e permitiram reconhecer diversos eventos de evolução cariotípica ocorridos no grupo. Os cromossomos 2 e 3 se destacaram, entre os cromossomos com BACs mapeados, como os mais polimórficos entre as espécies estudadas.

O presente trabalho teve como objetivo construir um mapa citogenético comparativo para *C. maxima* cv. Pink concluindo assim o mapeamento das três espécies biológicas principais do gênero. Dessa forma, espera-se reconhecer as homeologias e as mudanças cariotípicas principais envolvidas na evolução dos cromossomos dos citros. Além disso, os cromossomos 2 e 3 foram analisados em *C. sinensis* a fim de confirmar

sua origem e investigar as alterações cariotípicas envolvidas na formação dessa espécie híbrida.

Materiais e Métodos

Material vegetal e preparação cromossômica

As sementes de *C. maxima* cv. Pink e *C. sinensis* cv. Valencia foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma de *Citrus* da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, Brasil. As pontas de raízes foram obtidas de sementes recém-germinadas e pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (0,002 M) por 5 h a 18°C, fixadas em etanol-ácido acético 3:1 (v/v) por 18-24 h à temperatura ambiente e estocadas a -20°C. As preparações citológicas foram realizadas segundo Silva et al. (2011).

Coloração CMA/DAPI

As lâminas foram envelhecidas por três dias e posteriormente coradas com CMA e DAPI como descrito por Moraes et al. (2007b), utilizando 0,1 mg/mL CMA. As lâminas foram montadas em tampão McIlvaine's (pH 7,0) e glicerol (1:1, v/v) e as imagens das melhores metáfases foram capturadas após três dias em um microscópio de epifluorescência Leica DMLB equipado com uma câmera de vídeo Cohu CCD usando o software Leica QFISH. As lâminas foram descoradas e estocadas -20°C para posterior hibridização *in situ*.

Sondas

Nove BACs (01B09, 02C12, 20C13, 14A12, 21L13, 24C13, 28A05, 28A07 e 59C23) dos anteriormente utilizados como marcadores cromossômicos (Moraes et al.

2008; Silva et al. 2011) foram selecionados da biblioteca genômica de *P. trifoliata* cv. Pomeroy (Yang et al. 2001) e usados como sondas em cromossomos de *C. maxima*. Os sítios de DNAr 5S foram localizados usando a sonda D2 de *Lotus japonicus* (Pedrosa et al. 2002). Para *C. sinensis* foram hibridizados BACs dos cromossomos marcadores 2 (BAC 21L13) e 3 (14A12 e 28A07). O DNA dos BACs e do plasmídeo D2 foram isolados usando o *Plasmid Mini Kit* (QIAGEN) seguindo as instruções do fabricante. Todas as sondas foram marcadas por *nick translation* (Roche Diagnostics) usando o Cy3-dUTP (GE).

Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

O procedimento da FISH foi realizado de acordo com Silva et al. (2011) com estringência final de 72%. Todas as preparações foram contra-coradas e montadas com DAPI 2 µg/mL em Vectashield (Vector). A re hibridização das lâminas foi realizada como descrito por Heslop-Harrison et al. (1992), visando-se localizar diferentes sequências de DNA em uma mesma célula. As imagens foram obtidas como descrito anteriormente. Para o processamento final, elas foram sobrepostas, pseudocoradas e ajustadas em brilho e contraste usando o programa Adobe Photoshop CS3 versão 10.0.

Medições dos cromossomos

As médias do tamanho relativo dos cromossomos, do tamanho das bandas CMA⁺ e da razão entre braços foram calculadas para cada par cromossômico de *C. maxima* com base na medição de cinco metáfases mitóticas (Silva et al., 2011). O tamanho absoluto dos cromossomos em mega pares de base (Mpb) foi estimado usando o tamanho do genoma (0,779 pg/2C) estabelecido para cv. 'Pink' por Ollitrault et al.

(1994). A morfologia cromossômica foi baseada em Guerra (1986) e a nomenclatura dos tipos cromossômicos em Guerra (1993) e Carvalho et al. (2005).

O software Image Tool 3.0 foi utilizado para estabelecer a posição relativa de cada BAC cópia simples ao longo dos cromossomos de acordo com Fonsêca et al. (2010) e Silva et al. (2011). Os cromossomos foram numerados de acordo com o mapa citogenético de *P. trifoliata* estabelecido por Silva et al. (2011).

Resultados

Citrus maxima cv. Pink

O genoma de *Citrus maxima* cv. Pink, de tamanho aproximado de 380,9 Mbp ($1C = 0,39$ pg – estabelecido por Ollitrault et al. 1998), está distribuído em nove cromossomos ($2n = 18$), meta- a submetacêntricos, com tamanho variando de 1,69 a 2,52 μm . Com base no número e distribuição das bandas heterocromáticas $CMA^+/DAPI^-$, a fórmula cariotípica observada foi $4A + 2C + 4D + 6F + 2F_L$ (Fig. 1a e Fig. 3). Porém, em algumas metáfases, a banda $CMA^+/DAPI^-$ terminal do braço curto de um dos pares do tipo A não foi evidenciada.

Empregando um conjunto de nove sondas de BACs e uma de DNAr 5S, em associação ao padrão de bandeamento $CMA^+/DAPI^-$, foi possível identificar todos pares de cromossomos do complemento de *C. maxima* cv. Pink segundo o sistema nomenclatural proposto anteriormente para citros (Silva et al. 2011). A medição do tamanho dos blocos CMA^+ mostrou que aproximadamente 23% do genoma de desse acesso é composto por heterocromatina constitutiva $CMA^+/DAPI^-$, variando de 24,8% no cromossomo 4 a 55,2% no cromossomo 3. Os cromossomos 1, 5, 8 e 9 não apresentaram blocos heterocromáticos.

Os cromossomos 3 (metacêntrico do tipo A) e 4 (metacêntrico do tipo D) foram reconhecidos por dois BACs cada. No par 3, os BACs 14A12 e 28A07 foram localizados na região adjacente às bandas $CMA^+/DAPI^-$ dos braços curto e longo, respectivamente (Fig. 1e e 1f). O par 4 foi reconhecido pelos BACs 02C12 (dados não mostrados) e 20C13 (Fig. 1c e 1d) mapeados, respectivamente, na região intersticial do braço curto e adjacente à banda heterocromática do braço longo.

Os BACs 21L13 e 28A05 hibridizaram, respectivamente, adjacentes às bandas $CMA^+/DAPI^-$ do braço longo do cromossomo 2 (metacêntrico do tipo D) (Fig. 1c e 1d) e do braço curto do par 6 (metacêntrico do tipo C) (Fig. 1a e 1b). Os cromossomos 1 (metacêntrico do tipo F_L) e 5 (submetacêntrico do tipo F) foram identificados, respectivamente, pelo BAC 24C13 (Fig. 1b) e pelo sítio de DNAr 5S (Fig. 2b), ambos situados na região terminal do braço curto. Em um dos seis indivíduos analisados com a sonda de DNAr 5S, os sinais foram observados em um cromossomo do tipo F, como anteriormente descrito, e na região adjacente das bandas $CMA^+/DAPI^-$ de um cromossomo do tipo D (Fig. 2d). O BAC 01B09 foi mapeado na região terminal do braço curto do cromossomo 8 (submetacêntrico do tipo F) (dados não apresentados), enquanto que o par 9 (também submetacêntrico do tipo F) foi identificado pela presença do BAC 59C23, localizado na região intersticial do braço longo deste cromossomo (Fig. 2f).

Apenas os cromossomo 7 (submetacêntrico do tipo A) e 5 não hibridizaram com nenhum dos BACs selecionados. As bandas $CMA^+/DAPI^-$ do braço curto desse cromossomo, quando visualizadas, apresentavam-se geralmente menores em comparação com as do outro par de A (cromossomo 3) presente no cariótipo da espécie em estudo (ver Fig. 1a e 1e). A posição relativa de cada marcador cromossômico encontra-se representada no idiograma (Fig. 3).

Cromossomos marcadores em *Citrus sinensis* cv. Valencia

Baseado na distribuição de bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI⁻ observada na cultivar de *C. sinensis* estudada, foi confirmada a fórmula cariotípica 2B + 2C + 7D + 5F + 2F_L (Fig. 2g). O cromossomo 2 dessa espécie, que em *P. trifoliata* é um dos cromossomos tipo B, foi reconhecido pelo BAC 21L13. Ambos os homólogos foram do tipo D, entretanto, em um deles os sinais foram observados na região terminal do braço curto e no outro na região adjacente à banda CMA⁺/DAPI⁻ do braço longo (Fig. 2g-h).

O homeólogo ao par 3 em laranja doce foi identificado pela presença de dois BACs. O BAC 14A12 hibridizou na região terminal do braço curto de um cromossomo B e adjacente à banda CMA⁺/DAPI⁻ do braço curto do menor dos cromossomos Cs. O BAC 28A07 foi mapeado no braço oposto ao BAC 14A12, adjacente às bandas CMA⁺/DAPI⁻ dos referidos cromossomos (dados não apresentados).

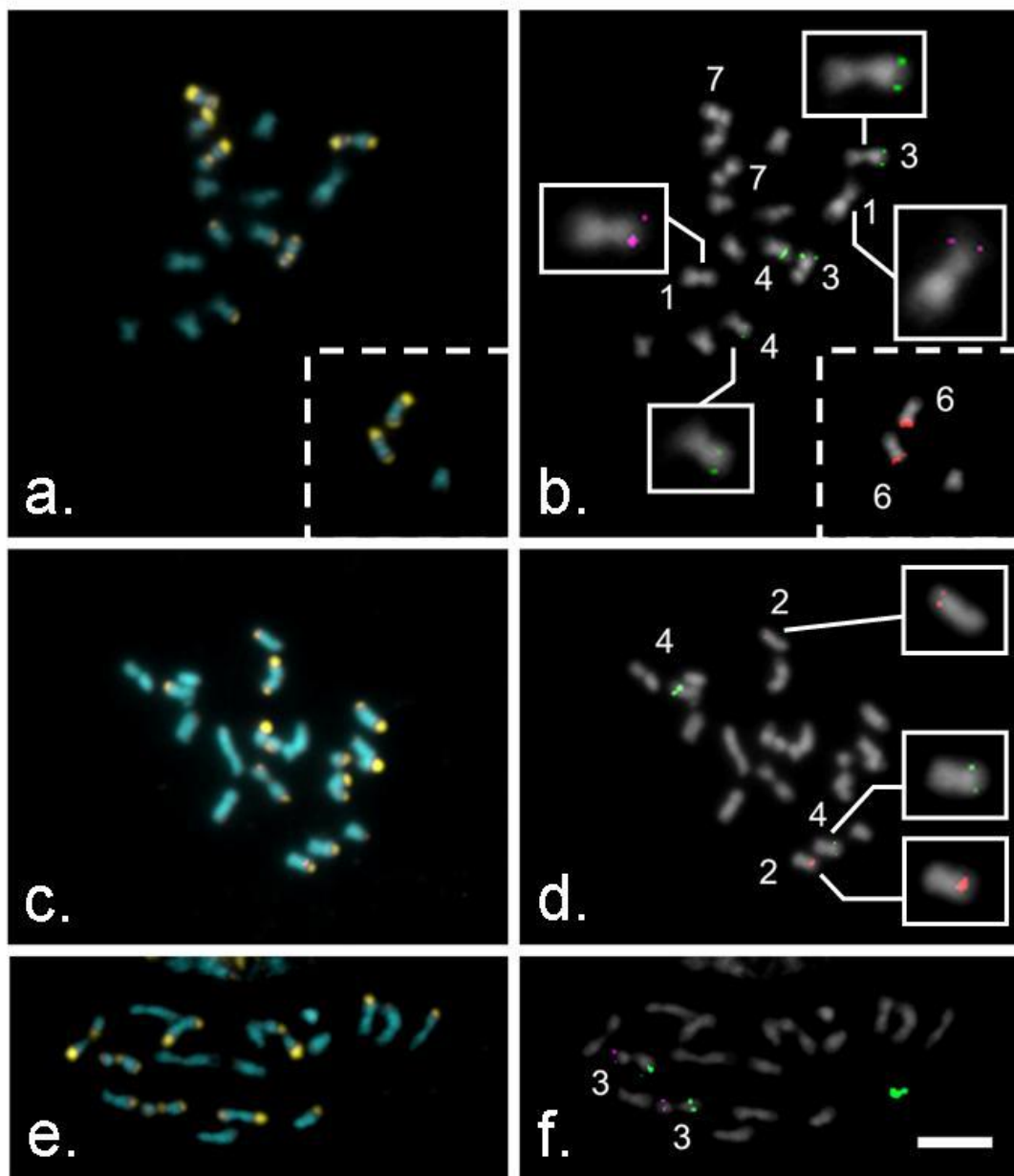


Fig. 1 Metáfases mitóticas de *Citrus maxima* cv. Pink coradas com CMA/DAPI (a, c e e) e hibridizada *in situ* com os BACs 24C13_[Cromossomo 1], 28A05_[6] (b), 28A07_[3] (b e f), 20C13_[4] (b e d), 21L13_[2] (d) e 14A12_[3, em rosa] (f). O cromossomo 7 foi identificado como sendo do tipo A sem sinal de BAC (b). Insertos tracejados em a e b mostram três cromossomos da mesma metáfase que estavam separados dos demais. Insertos em b e d mostram os cromossomos com detalhes ampliados e com maior contraste. Barra em f corresponde a 2,5 μ m.

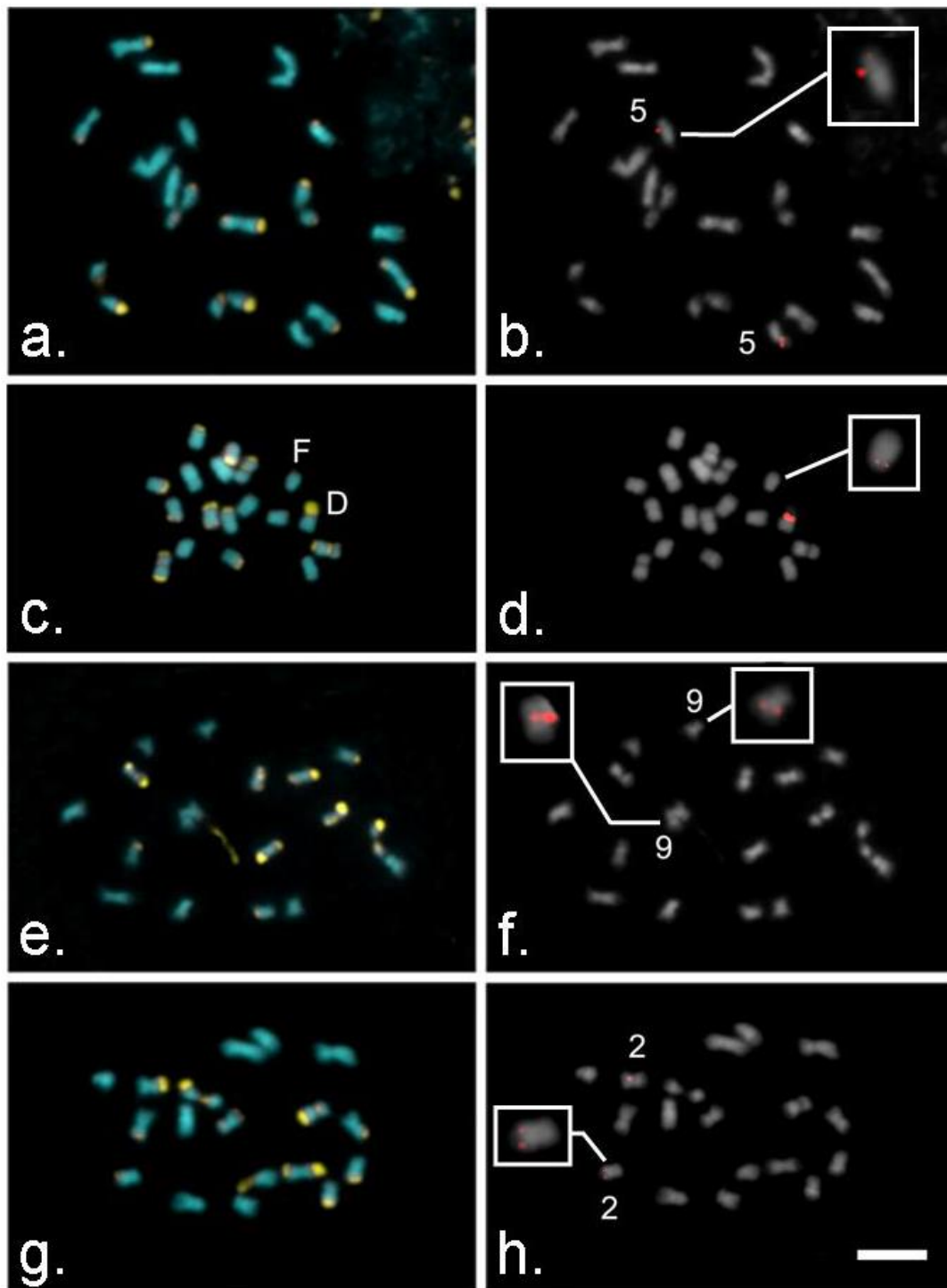


Fig. 2 Metáfases mitóticas de *Citrus maxima* cv. Pink (**a-f**) e *C. sinensis* cv. Valencia (**g-h**) coradas com CMA/DAPI (**a, c, e e g**) e hibridizada *in situ* com o sítio de DNAr 5S_[Cromossomo 5] (**b**) e os BACs 59C23_[9] (**f**) e 21L13_[2] (**h**). Metáfase em **c** e **d** cujo sítio de DNAr 5S foi mapeado em um par do tipo F/D. Insetos em **b, d, f** e **h** mostram os cromossomos com detalhes ampliados e com maior contraste. Barra em **h** corresponde a 2.5 μ m.

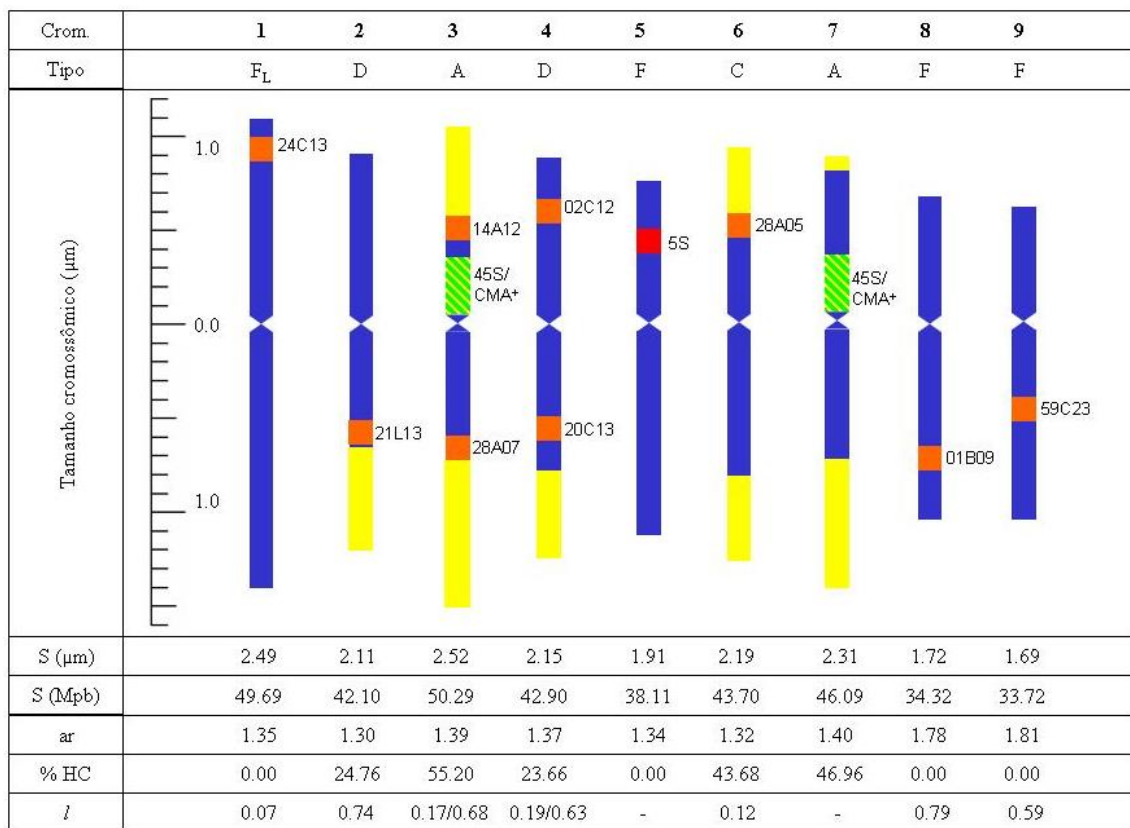


Fig. 3 Idiograma de *Citrus maxima* cv. Pink mostrando os tipos cromossômicos, tamanho médio individual dos cromossomos (S) em μm e Mpb, razão entre braços (ar), porcentagem de heterocromatina por cromossomo (% HC) e a localização dos BACs (*l*). Os sítios de DNAr 45S co-localizados com as bandas CMA⁺ foram representados em verde e amarelo, enquanto que o de DNAr 5S foi representado em vermelho. As bandas CMA⁺ e os sítios dos BACs estão indicados, respectivamente, em amarelo e laranja.

Discussão

Neste trabalho um mapa citogenético comparativo foi construído para toranja ‘Pink’ a partir da hibridização de nove clones BACs previamente mapeados em *P. trifoliata* (Moraes et al. 2008), em associação com padrão de bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI⁻ e DNAr 5S. Os marcadores citogenéticos empregados confirmaram que esse acesso apresenta um cariótipo homomórfico, conforme previamente descrito (Moraes et al. 2007a; Barros e Silva et al. 2010).

As análises de medição cromossômica revelaram que dos ~380,9 Mpb que compõem o genoma de *C. maxima* cv. Pink, aproximadamente 23,3% é composto por heterocromatina (HC) CMA⁺/DAPI⁻. Essa porcentagem de heterocromatina é ligeiramente superior à encontrada nas outras espécies cítricas analisadas, tais como *P. trifoliata* (~376,5 Mpb; HC = 21,8%), *C. medica* (~401,5 Mpb; HC = 18,4%) e *C. reticulata* (~373,0 Mpb; HC = 21,4%) (Kayum et al. 1998; Mendes et al. 2011; Silva et al. 2011; Silva et al. em preparação), e é compatível com as diferenças observadas em suas fórmulas cariotípicas, uma vez que *C. maxima* é a única espécie que apresenta três pares cromossômicos com um bloco heterocromático em cada braço. Essas diferenças devem estar associadas a processos de contração e/ou expansão de sequências de DNA repetitivo constituintes das bandas CMA⁺, tais como a sequência de DNA satélite CsSat (Barros e Silva et al. 2010).

Os cariótipos de *C. maxima* são caracterizados especialmente pela presença do cromossomo marcador do tipo A (Guerra et al. 2009). A depender do acesso estudado, entretanto, foram observados de um a quatro cromossomos A por cariótipo (Befu et al. 2000, 2001, 2002; Yang et al. 2002; Miranda et al. 2007a; Yamamoto et al. 2007; Moraes et al. 2007a; Barros e Silva et al. 2010). Com o uso de BACs marcadores para o

cromossomo 3, foi possível constatar que existem diferenças no tamanho das bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI⁻ entre este e o par 7 (ambos do tipo A) de *C. maxima* cv. Pink. A banda mais fraca do braço curto do cromossomo 7 apresenta uma pequena quantidade de CsSat e por isso nem sempre é visível como CMA⁺ (Barros e Silva et al. 2010), devido à menor sensibilidade da coloração CMA em relação à FISH (Winterfeld e Röser 2007). Assim como o cromossomo marcador do tipo B (Pedrosa et al. 2000; Carvalho et al. 2005; Brasileiro-Vidal et al. 2007; Moraes et al. 2007a,b; Moraes et al. 2008; Barros e Silva et al. 2010; Mendes et al. 2011; Silva et al. 2011), os cromossomos do tipo A (3 e 7 de *C. maxima*) apresentaram um sítio de DNAr 45S co localizado com a banda CMA⁺/DAPI⁻ proximal, denominado de subtipo A/45S (Moraes et al. 2007a,b; Barros e Silva et al. 2010). Essa banda proximal também aparece em algumas células como CMA⁰, provavelmente devido ao tamanho do sítio (Marques et al. 2011; Silva et al. em preparação).

Adicionalmente, *C. maxima* apresenta um par de cromossomos do subtipo F/5S. Este subtipo cromossômico foi encontrado em acessos híbridos derivados de *C. maxima*, tais como tangeleiro ‘Orlando’, tangor ‘Murcott’, pomeleiro e laranja doce (Pedrosa et al. 2000; Moraes et al. 2007a,b). Curiosamente, um dos indivíduos da toranja examinado aqui exibiu um sítio de DNAr 5S em um dos Ds, diferentemente do esperado. Isso poderia estar relacionado a uma origem híbrida deste indivíduo, entretanto, nenhum acesso conhecido poderia fornecer dois cromossomos do tipo A e um cromossomo D/5S em seu gameta (Guerra 2009). Este dado sugere, portanto, que houve uma translocação desta sequência de um dos seus cromossomos F para um cromossomo D neste indivíduo. Um evento de translocação envolvendo um sítio de DNAr 45S havia sido reportado anteriormente para as cultivares USDA e Pomeroy de *P. trifoliata* (Barros e Silva et al. 2010).

O BAC 59C23 foi selecionado como marcador do cromossomo 9 de *C. maxima*. Esse BAC encontra-se associado à região gênica que confere resistência ao vírus da tristeza dos citros (CTV) e que está situado dentro de um contig de 1,2 Mpb (Yang et al. 2001). Aparentemente, esse loco está conservado quanto à sua localização nas espécies cítricas até então estudadas (Moraes et al. 2008; Mendes et al. 2011; Silva et al. 2011; Silva et al. em preparação).

As relações filogenéticas estabelecidas através de marcadores moleculares para o grupo (Nicolosi et al. 2000; Barkley et al. 2006; Pang et al. 2007; Uzun et al. 2009) indicam que *C. maxima* é mais proximamente relacionada à *C. reticulata* do que a *C. medica*, sendo *P. trifoliata* a espécie mais distante (ver Fig. 4). Uma análise baseada na comparação dos mapas de *C. reticulata*, *C. medica* e *P. trifoliata* sugeriu que possivelmente houve uma série de mudanças na linhagem de *C. medica* e uma relativa conservação do cariótipo de *C. reticulata* em relação a um cariótipo mais basal do gênero, compartilhado com *P. trifoliata*. A inclusão de *C. maxima*, entretanto, revelou similaridades entre os cromossomos 2 e 5 dessa espécie e de *C. medica*, sugerindo que é possível que parte das similaridades cariotípicas observadas entre *C. reticulata* e *P. trifoliata* podem ser resultado de reversão dentro de *Citrus* (Fig. 4), enquanto os cromossomos 1 (F_L), 4 (D) e 8 (F) parecem ter se mantido inalterados nas espécies até então analisadas (Mendes et al. 2011; Silva et al. 2011; Silva et al. em preparação). O par 3 destaca-se como o mais polimórfico. Em todo caso, o mapeamento de *C. maxima* confirma que mudanças no número e posição das bandas CMA⁺ são frequentes no gênero (Mendes et al. 2011; Silva et al. em preparação). Além desses eventos de expansão e/ou retração das bandas heterocromáticas, é possível que um evento de inversão pericêntrica tenha ocorrido no ancestral do gênero *Citrus*. Entretanto, nenhuma translocação foi observada, sugerindo uma alta sintenia entre ambos os gêneros.

Vários trabalhos sugerem que *C. sinensis* é um híbrido originado do cruzamento de *C. maxima* e *C. reticulata* (Scora 1975; Barrett e Rhodes 1976; Green et al. 1986; Yamamoto et al. 1993; Nicolosi et al. 2000; Moore 2001; Barkley et al. 2006; Yingzhi et al. 2007; Uzun et al. 2009; Li et al. 2010; Froelicher et al. 2011). Possivelmente um único híbrido, que foi propagado assexuadamente, sofreu mutações gênicas durante sua evolução, formando assim as diversas cultivares de laranja doce (Barrett e Rhodes 1976; Guerra 2009). Com base no reconhecimento dos pares de homólogos dos prováveis parentais (Silva et al. em preparação e presente trabalho) é possível sugerir que os gametas que deram origem a laranja doce foram: (i) *C. reticulata* - $1C_{[\text{cromossomo } 3]} + 5D_{[2, 4, 5, 6 \text{ e } 7]} + 2F_{[8 \text{ e } 9]} + 1F_{L[1]}$ e (ii) *C. maxima* - $2A_{[3 \text{ e } 7]} + 1C_{[6]} + 2D_{[2 \text{ e } 4]} + 3F_{[5, 8 \text{ e } 9]} + 1F_{L[1]}$. A hibridização com BACs marcadores dos cromossomos 2 e 3 dão suporte a essa hipótese e fornecem informações adicionais considerando-se também a posição de cada marcador no cromossomo. O par 2 de *C. sinensis* (ambos do tipo D) seria formado por um cromossomo de *C. reticulata*, cujo BAC foi mapeado na região terminal do braço curto, e outro de *C. maxima*, cujo BAC foi mapeado na região terminal do braço longo. O par cromossômico 3 de *C. sinensis* foi reconhecido com o uso de BACs (14A12 e 28A07), os quais foram mapeados no cromossomo 3 (tipo B) de *C. maxima* e no 3 (tipo C) de *C. reticulata*. Por se tratar de um híbrido originado de *C. maxima*, seria esperado que um homólogo de cada um dos dois pares de cromossomos tipo A tivessem sido passados ao descendente (Guerra 2009). Entretanto, o que se observa é a presença de dois cromossomos do tipo B (Matsuyama et al. 1996; Miranda et al. 1997a; Befu et al. 2000; Pedrosa et al. 2000; Barros e Silva et al. 2010; no presente trabalho). Uma hipótese para justificar a presença de cromossomos Bs seria que a laranja doce, bem como da laranja-azeda, é que estas espécies seriam derivadas de um híbrido secundário, contendo germoplasma de duas ou mais espécies

(Guerra 2009). Alternativamente, considerando a alta variabilidade nas bandas CMA⁺ no grupo, é provável que este cromossomo tenha sofrido perdas (desamplificações) de sequências de DNA repetitivo que constituem a banda terminal de seu braço curto, explicando assim as mudanças do tipo cromossômico A para o tipo B no cariótipo atualmente conhecido desta espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Sr. Getúlio de Souza Vieira (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical) pelo apoio de campo. Este trabalho contou com o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

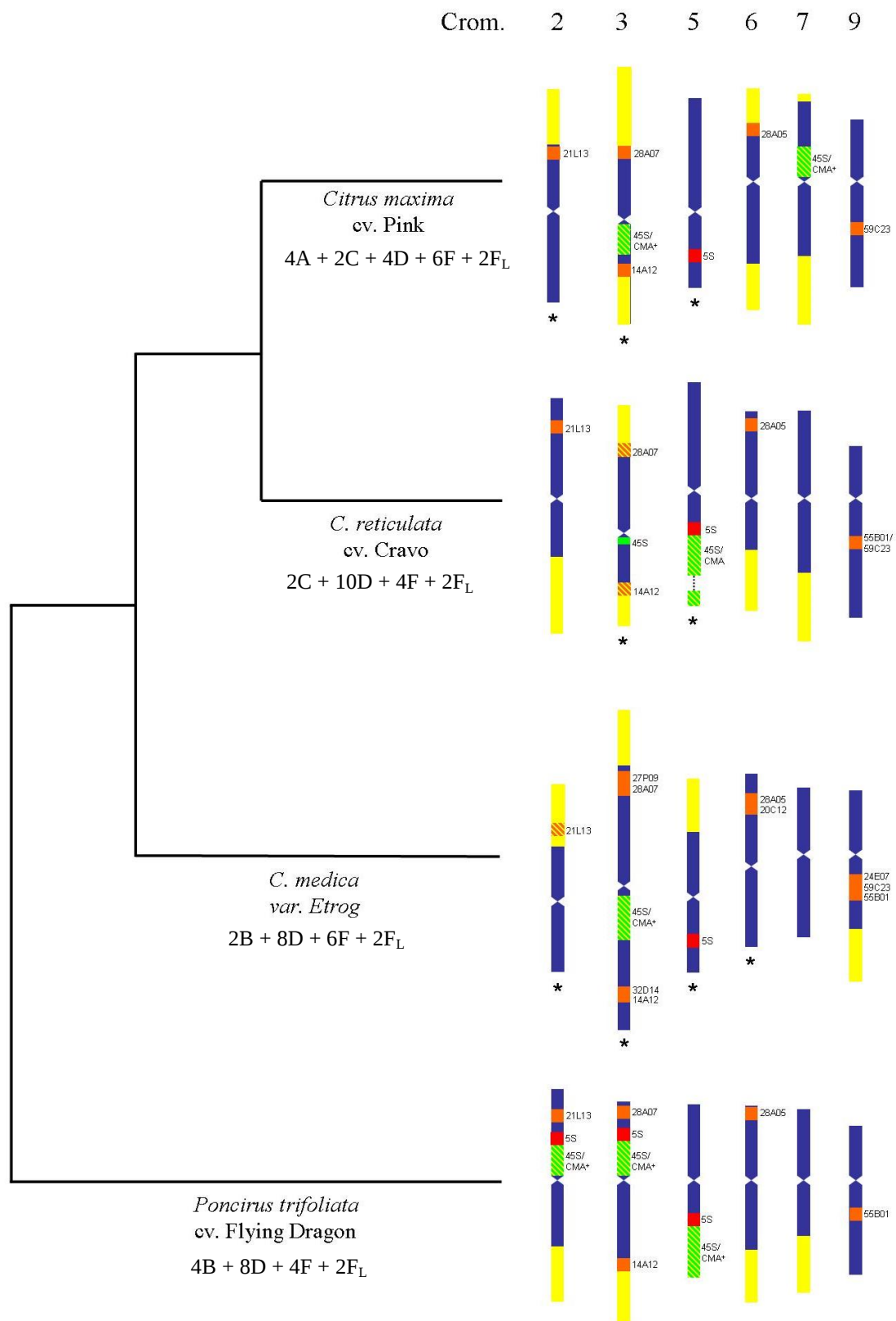


Fig. 4 Representação esquemática dos cromossomos 2, 3, 5, 6, 7 e 9 de *Citrus maxima*, *C. reticulata*, *C. medica* e *Poncirus trifoliata* mostrando as diferenças entre os tipos cromossômicos, tamanho das bandas heterocromáticas CMA⁺, distribuição dos sítios de DNAr e BACs (adaptado de Silva et al. 2011; Mendes et al. 2011, Silva et al. em

preparação). As relações filogenéticas entre as espécies foram baseadas na topologia das árvores filogenéticas estabelecidas por Nicolosi et al. (2000), Barkley et al. (2006), Pang et al. (2007) e Uzun et al. (2009). Os asteriscos indicam uma rotação de 180° dos cromossomos em relação ao idiograma visando manter a colinearidade dos marcadores de *P. trifoliata*. Os cromossomos foram representados na mesma escala.

Referências

- Barkley NA, Roose ML, Krueger RR, Federici CT (2006) Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theor Appl Genet* 112:1519–1531
- Barrett HC, Rhodes AM (1976) A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Syst Bot* 1:105–136
- Barros e Silva AE, Marques A, Santos KGB, Guerra M (2010) The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. *Chromosome Res* 18:503–514
- Befu M, Kitajima A, Hasegawa K (2001) Chromosome composition of some *Citrus* species and cultivars based on the chromomycin A₃ (CMA) banding patterns. *J Japan Soc Hort Sci* 70:83–88
- Befu M, Kitajima A, Hasegawa K (2002) Classification of the *Citrus* chromosomes with same types of chromomycin A banding patterns. *J Japan Soc Hort Sci* 71:394–400
- Befu M, Kitajima A, Ling YX, Hasegawa K (2000) Classification of ‘Tosa-Buntan’ pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.), ‘Washington’ navel orange (*C. sinensis* [L.] Osb.) and trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) chromosomes using young leaves. *J Japan Soc Hort Sci* 69:22–28
- Brasileiro-Vidal AC, dos Santos-Serejo JA, Soares Filho WS, Guerra M (2007) A simple chromosomal marker can reliably distinguishes *Poncirus* from *Citrus* species. *Genetica* 129:273–279
- Carvalho R, Soares Filho WS, Brasileiro-Vidal AC, Guerra M (2005) The relationship among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenet Genome Res* 109:276–282

- Cornélio MTMN, Figueirôa ARS, Santos KGB, Carvalho R, Soares Filho WS, Guerra M (2003) Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. *Plant Syst Evol* 240:149–161
- Fonsêca A, Ferreira A, Santos TRB, Mosiolek M, Bellucci E, Kami J, Gepts P, Geffroy V, Schweizer D, Santos KGB, Pedrosa-Harand A (2010) Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Res* 18:487–502
- Froelicher Y, Mouhaya W, Bassene JB, Costantino G, Kamiri M, Luro F, Morillon R, Ollitrault P (2011) New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. *Tree Genet Genomes* 7:49–61
- Green RM, Vardi A, Galun E (1986) The plastome of *Citrus*. Physical map, variation among *Citrus* cultivars and species, and comparison with related genera. *Theor Appl Genet* 72:170–177
- Guerra M (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Brazil J Genetics* 9:741–743
- Guerra M (1993) Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity* 71:234–241
- Guerra M (2009) Chromosomal variability and the origin of *Citrus* species. In: Mahoney CL, Springer DA (eds.) *Genetic Diversity*. Nova Science Publishers, Inc., New York, pp 51–68
- Heslop-Harrison JS, Harrison GE, Leitch IJ (1992) Reprobing of DNA: DNA *in situ* hybridization preparations. *Trends Genet* 8:372–373
- Kayum M, Koç NK, Rokka VM (1998) Variation of the nuclear DNA content of species of subtribe Citrinae (Rutaceae). *HortScience* 33:1247–1250

- Li X, Xie R, Lu Z, Zhou Z (2010) The origin of cultivated *Citrus* as inferred from internal transcribed spacer and chloroplast DNA sequence and amplified fragment length polymorphism fingerprints. *J Am Soc Hortic Sci* 135:341–350
- Marques A, Fuchs J, Ma L, Heckmann S, Guerra M, Houben A (2011) Characterization of Eu- and Heterochromatin of Citrus with a Focus on the Condensation Behavior of 45S rDNA Chromatin. *Cytogenet Genome Res* 134:72–82
- Matsuyama T, Akihama T, Ito Y, Omura M, Fukui K (1996) Characterization of heterochromatic regions in ‘tróvita’ orange (*Citrus sinensis* Osbeck) chromosomes by the fluorescent staining and FISH methods. *Genome* 39:941–945
- Mendes S, Moraes AP, Mirkov TE, Pedrosa-Harand A (2011) Chromosome homeologies and high variation in heterochromatin distribution between *Citrus* L. and *Poncirus* Raf. as evidenced by comparative cytogenetic mapping. *Chromosome Res* 19:521–530
- Miranda M, Ikeda F, Endo T, Moriguchi T, Omura M (1997a) Comparative analysis on the distribution of heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* chromosomes. *Chromosome Res* 5:86–92
- Miranda M, Ikeda F, Endo T, Moriguchi T, Omura M (1997b) rDNA sites and heterochromatin in Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia* Swing.) chromosome revealed by FISH and CMA/DAPI staining. *Caryologia* 50:333–340
- Moore GA (2001) Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends Genet* 17:536–540
- Moraes AP, Lemos RR, Brasileiro-Vidal AC, Soares Filho WS, Guerra M (2007b) Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrid accessions of mandarin. *Cytogenet Genome Res* 119:275–281

- Moraes AP, Mirkov TE, Guerra M (2008) Mapping the chromosomes of *Poncirus trifoliata* Raf. by BAC-FISH. *Cytogenet Genome Res* 121:277–281
- Moraes AP, Soares Filho WS, Guerra M (2007a) Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Res* 15:115–121
- Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, La Malfa S, Continella G, Tribulato E (2000) *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor Appl Genet* 100:1155–1166
- Ollitrault P, Dambier D, Luro F, Duperray C (1994) Nuclear genome size variations in *Citrus*. *Fruits* 49:390–393
- Pang XM, Hu CG, Deng XX (2007) Phylogenetic relationship within *Citrus* and related genera as inferred from AFLP markers. *Genet Resour Crop Evol* 54:429–436
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A (2002) Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161:1661–1672
- Pedrosa A, Schweizer D, Guerra M (2000) Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Theor Appl Genet* 100:361–367
- Scora RW (1975) On the history and origin of citrus. *Buly Botanical Club* 102: 369–375
- Scora RW (1988) Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated *Citrus*. In: Goren RK, Mendel K (eds.), *Proc. 6th Int. Citrus Cong.*, vol. 1. Margraf Publishers, Weikersheim, Germany, pp. 277–289
- Silva SC, Marques A, Soares Filho WS, Mirkov TE, Pedrosa-Harand A, Guerra MS (2011) The cytogenetic map of the *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. - a nomenclature system for chromosomes of all citric species. *Trop Plant Biol* 4:99–105

- Swingle WT, Reece PC (1967) The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: Reuther W, Weber HJ, Batchelor LD (eds) The *Citrus* industry. History, world distribution, botany and varieties, vol I. University of California Press, Berkeley, pp 190–430
- Uzun A, Yesiloglu T, Aka-Kacar Y, Tuzcu O, Gulsen O (2009) Genetic diversity and relationships within *Citrus* and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs). *Sci Hortic* 121:306–312
- Winterfeld G, Röser M (2007) Chromosomal localization and evolution of satellite DNAs and heterochromatin in grasses (Poaceae), especially tribe Aveneae. *Plant Syst Evol* 264:75–100
- Yamamoto M, Abkenar AA, Matsumoto R, Nesumi H, Yoshida T, Kuniga T, Kubo T, Tominaga Shigeto (2007) CMA banding patterns of chromosomes in major *Citrus* species. *J Japan Soc Hort Sci* 76:36–40
- Yamamoto M, Kobayashi S, Nakamura Y, Yamada Y (1993) Phylogenic relationships of *Citrus* revealed by diversity of cytoplasmic genomes. In: Hayashi T, Omura M, Scott NS (eds.) Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit trees. Fruit Trees Research Station, Okitsu, Japan, pp 39–46
- Yang X, Kitajima A, Hasegawa K (2002) Chromosome pairing set and the presence of unreduced gametes explain the possible origin of polyploidy progenies from the diploids ‘Tosa-Buntan’ x Suisho-Buntan’ pummelo. *J Japan Soc Hort Sci* 71:538–543
- Yang ZN, Ye XR, Choi S, Molina J, Moonan F, Wing RA, Roose ML, Mirkov TE (2001) Construction of a 1.2 Mb contig including the citrus tristeza virus resistance gene locus using a bacterial artificial chromosome library of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genome* 44:382–393

Yingzhi1 L, Yunjiang C, Nengguo T, Xiuxin D (2007) Phylogenetic analysis of mandarin landraces, wild mandarins, and related species in china using nuclear LEAFY second intron and plastid *trnL-trnF* sequence. J Amer Soc Hort Sci 132(6):796–806

7. Conclusões

1. A FISH com sondas de BACs oriundos de uma biblioteca de *Poncirus trifoliata*, associadas ao bandejamento CMA/DAPI e localização de sítios de DNAr 5S e 45S, permitiu estabelecer os mapas citogenéticos das principais espécies cítricas puras e estabelecer homeologias entre espécies do gênero *Citrus*.
2. A nomenclatura proposta oferece a oportunidade de unificar a nomenclatura cromossômica das espécies cítricas para estudos comparativos e projetos de genômica deste grupo.
3. Apenas os cromossomos 1, 4 e 8 foram conservados quanto ao tipo cromossômico entre as espécies estudadas.
4. Os pares 2 e 3 estão entre os menos conservados dentre as espécies cítricas. As mudanças observadas sugerem que eventos de transposição ou inversão pericêntrica também tenha ocorrido nestes cromossomos.
5. Diferenças observadas nos pares 2 e 5 de *P. trifoliata* provavelmente estão relacionadas a variações no número de *repeats* da família de DNAsat.
6. A hibridização *in situ* dos BACs de *P. trifoliata* que apresentaram sinal de cópia única em *C. reticulata* e em *C. maxima* confirmam a condição homomórfica destas espécies, corroborando com os dados de bandejamento CMA/DAPI e da localização de sítios de DNAr 5S e 45S disponíveis na literatura.
7. Com base nas informações obtidas no presente trabalho, foi constatado que não houve nenhuma quebra de sintenia, sugerindo a ausência de translocações entre as espécies analisadas.
8. Duplicações e/ou deleções de sequências repetidas em tandem que formam os blocos CMA⁺ presentes no grupo, parecem ser os principais eventos que contribuíram para a divergência dos cariótipos de *C. reticulata*, *C. maxima* e *P. trifoliata*.

9. Os dados obtidos a partir do mapeamento dos BACs nos cromossomos 2 e 3 de laranja doce dão suporte à hipótese de que *C. maxima* e *C. reticulata* estiveram envolvidas na origem deste híbrido
10. Baseado nas informações de tipos e subtipos cromossômicos seria esperado que as divergências encontradas nos cariótipos de *P. trifoliata* e *C. medica* fossem em menor número. Por outro lado, os cariótipos de *P. trifoliata* e *C. reticulata* são mais similares. Logo, é provável que as semelhanças no padrão de bandas CMA encontradas entre espécies filogeneticamente distantes possivelmente estão relacionadas a reversões e não da conservação de um cariótipo ancestral.

8.1. Normas para submissão do manuscrito à revista “*Tropical Plant Biology*”

Instructions for Authors

Tropical Plant Biology

Editors-in-Chief

Paul H. Moore, USDA-ARS, Pacific Basin Agriculture Research Center, Aiea, HI 96701 USA

Ray Ming, Department of Plant Biology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801 USA

Manuscript Submission

All manuscripts should be submitted using the journal's online manuscript submission system. The Journal is committed to a rapid editorial review process and will inform authors of the status of their manuscript as quickly as possible.

Springer is pleased to offer to authors, editors and reviewers of Tropical Plant Biology the option to use the fully web-enabled online manuscript submission and review system. Our online manuscript submission and review system offers authors the option to track in real time the progress of the review process of their manuscripts.

Tropical Plant Biology's online manuscript and review system offers easy and straightforward log-in and submission procedures. It supports a wide range of submission file formats, including: Word, WordPerfect, RTF, TXT, TIFF, GIF, JPEG, EPS, PDS, LaTeX2E, TeX, Postscript, PICT, Excel, Tar, Zip and PowerPoint.

PDF is not an acceptable file format.

Authors should follow the regular instructions for authors when preparing their manuscripts (see below).

The journal only accepts manuscripts written in English. British or American English spelling and terminology may be used, but either should be followed consistently throughout the article. Please double-space all materials, including notes and references.

Upon submission, authors will be prompted to sign a form for Consent to Publish and Transfer of Copyrights. This form must be completed for a submission to reach publication.

Manuscripts should be submitted to:

- www.trpb.edmgr.com

Manuscript Presentation

The characteristics and requirements of research papers and reviews published in Tropical Plant Biology are listed below.

Research Papers. Reports of new research results that significantly advanced our knowledge in a particular area. There is no fixed limit on the length of full-length research articles but a concise presentation is expected.

Reviews. New concepts or methods that may be applied to plant systems or new developments in research. Reviews may identify areas of plant sciences that appear to be appropriate for molecular analyses. Please consult the editor or a member of the editorial board in advance of submission.

Number the pages consecutively with the first page containing:

- Running head (shortened title)
- Article type
- Title
- Author(s)
- Affiliation(s)
- Full address for correspondence, including telephone and fax number and e-mail address
- Abstract and Key Words

Please provide a short abstract of 100 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references. Please provide 5 key words or short phrases in alphabetical order.

- Abbreviations

Abbreviations and their explanations should be collected in a list. Abbreviations should be explained at first occurrence.

- Symbols and Units

Metric units and Celsius (Centigrade) temperatures should be used for all measurements. SI units should be used throughout.

- Nomenclature

Chemical and biochemical

Names of chemical compounds follow the Chemical Abstracts (Chemical Abstract Service, Ohio State University, Columbus) and its indexes.

Biochemical terminology, including abbreviations and symbols, follows the recommendations of the IUPAC–IUB Commission on Biochemical Nomenclature.

Enzyme activity in units follows the Enzyme Nomenclature (Academic Press, 1979).

Taxonomical

Binary nomenclature: names of genera and higher categories may be used alone.

Genetic

Application of the term phenotype and genotype should be in accordance with Demerec et al. (Genetics 54: 61–74, 1966).

For summaries of the abbreviations, consult Journal of Bacteriology, Instructions to Authors.

TEXT, arranged in the order:

1) INTRODUCTION - Give background information strictly on the subject. Summarize the rationale for the study or observation. Clearly state the purpose of the article.

2) RESULTS - Present your data in a logical sequence starting with a short description of the incentive of the experiment, followed by a description of the results, if appropriate in the form of tables or figures. Do not repeat in the text all the data in the tables and/or illustrations; emphasize or summarize only important observations.

3) DISCUSSION - Discuss the implications of the findings and their limitations and relate the observations to other relevant studies. The first or final paragraph of the discussion should clearly describe the main conclusions of the work, their importance and potential for further studies. Avoid repeating Introduction or Results

4) METHODS - Describe your selection of the observational or experimental subjects clearly. Identify the methods, apparatus (manufacturer's name and address in parenthesis), and procedures in sufficient detail to allow others to reproduce the results. Give references to established methods, including statistical methods; provide references and brief descriptions of methods that have been published but are not well-known, describe substantially modified methods, including statistical methods, give reasons for using them, and evaluate their limitations.

Figures and Tables

ALL FIGURES, whether photographs, graphs, or diagrams, should be numbered consecutively. If figures are created electronically, please see Guidelines for Electronically Produced Figures for Print. Line drawings should be supplied as clear black and white drawings suitable for reproduction. All lines should be of uniform thickness. Letters and numbers should be of professional quality and proper dimensions. All figures submitted should allow for high quality reproduction at a same size permitting direct printing (with no reduction), usually 12.7 by 17.3 cm (5 by 7 inches) but no larger than 20.3 by 25.4 cm (8 by 10 inches). The publisher reserves the right to reduce figures. Micrographs have an internal magnification marker; the magnification should also be stated in the legend. If photographs of persons are used, either the subjects must not be identifiable or their pictures must be accompanied by written permission to use the photograph. Please note that Publisher cannot return original art to authors

Guidelines for electronically produced illustrations for print

GENERAL

- Send figures separately from the text (i.e. files should not be integrated with text files).

VECTOR (line) GRAPHICS

- Vector graphics exported from a drawing program should be stored in EPS format.
- Suitable drawing program: Adobe Illustrator. For simple line art the following drawing programs are also acceptable: Corel Draw, Freehand, Canvas
- No rules narrower than .25 pt.
- No gray screens paler than 15% or darker than 60%.
- Screens meant to be differentiated from one another must differ by at least 15%.

SPREADSHEET/PRESENTATION GRAPHICS

Most presentation programs (Excel, PowerPoint, Freelance) produce data that cannot be stored in an EPS format. Therefore graphics produced by these programs cannot be used to print.

HALFTONE FIGURES

- Black & white and color figures should be saved in TIFF and EPS formats.
- Figures should be created using Adobe Photoshop whenever possible.

SCANS

- Scanned reproductions of black and white photographs should be provided as 300 ppi TIFF files.
- Scanned color figures should be provided as TIFF files scanned at the minimum of 300 ppi with a 24-bit color depth.
- Line art should be provided as TIFF files at 600 ppi.
- We do prefer having the original art as our printers have drum scanners, which allow for better reproduction of critical medical halftones.

GRAPHICS QUALITY

If you are submitting electronic graphics that you have scanned, be prepared to send the hard copy originals upon request. While the electronic files you have created are satisfactory for the review process, they may not be of sufficient quality for printing.

This also holds true for files created in low-resolution graphics environments such as MS PowerPoint, etc.

GRAPHICS FROM VIDEOS

Separate files should be prepared for the frames from a video that are to be printed in the journal. When preparing these files you should follow the same rules as listed under Halftone Figures.

MULTIMEDIA ARTICLE AND DYNAMIC MANUSCRIPT SUBMISSION REQUIREMENTS (I.E. STREAMING VIDEOS)

Multimedia articles are papers where the heart of the article is the video and, generally, only an abstract and references are included. Dynamic articles are regular articles with video(s) included as electronic supplementary material.

Upon submission of multimedia or dynamic articles, the author(s) will be required to submit the video in the following format:

- For multimedia articles, video clips should not exceed 9 minutes. For dynamic articles, video clips should not exceed 3 minutes and each manuscript should not contain more than 3 video clips.
- Multimedia file for review and submission: MPEG-1 file with the largest frame size (usually 320 x 240 pixels) that will fit on a CD and will be playable on a Windows-based computer.
- The content of these files must be identical to that reviewed and accepted by the editors of the In Vitro Plant and Animal Journals.
- All narration should be in English.
- There should be a “manuscript” submitted with the video that includes a title page, abstract and key words, as well as references if needed.

DYNAMIC MANUSCRIPT:

A dynamic manuscript is a print article with imbedded video material. Up to 3 (one minute maximum each) videos per manuscript submission will be accepted. Make sure to note in your manuscript the placement of the video clips. All standard instructions for manuscript and video submission should be followed for a dynamic manuscript submission.

EACH TABLE should be numbered consecutively with Arabic numerals. Footnotes to tables should be indicated by lower-case superscript letters. If you use data from another published or unpublished source, obtain permission and acknowledge fully.

Section Headings

First-, second-, third-, and fourth-order headings should be clearly distinguishable but not numbered.

Appendices and Supplementary Material

- Authors who wish to publish electronic supplementary material to their article (Excel files, images, audio/video files) are requested to submit these with their manuscript via our online submission system.

Notes

- Please use footnotes rather than endnotes. Notes should be indicated by consecutive superscript numbers in the text. A source reference note should be indicated by means of an asterisk after the title. This note should be placed at the bottom of the first page.

Cross-Referencing

- In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parentheses and page number(s) where appropriate. When there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al.'. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works.

Examples:

- Winograd (1986, p. 204)

(Winograd, 1986a,b)

(Winograd, 1986; Flores et al., 1988)

(Bullen and Bennett, 1990)

Acknowledgements

References

References should be formatted alphabetically by author.

1. Journal article:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

2. Inclusion of issue number (optional):

Saunders DS (1976) The biological clock of insects. *Sci Am* 234(2):114–121

3. Journal issue with issue editor:

Smith J (ed) (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14(6):126–233

4. Journal issue with no issue editor:

Mod Genomics J (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14(6):126–233

5. Book chapter:

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York

6. Book, authored:

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

7. Book, edited:

Smith J, Brown B (eds) (2001) *The demise of modern genomics*. Blackwell, London

8. Chapter in a book in a series without volume titles:

Schmidt H (1989) Testing results. In: Hutzinger O (ed) *Handbook of environmental chemistry*, vol 2E. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 111

9. Chapter in a book in a series with volume title:

Smith SE (1976) Neuromuscular blocking drugs in man. In: Zaimis E (ed) *Neuromuscular junction*. *Handbook of experimental pharmacology*, vol 42. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp593–660

10. Proceedings as a book (in a series and subseries):

Zowghi D et al (1996) A framework for reasoning about requirements in evolution. In: Foo N, Goebel R (eds) *PRICAI'96: topics in artificial intelligence*. 4th Pacific Rim conference on artificial intelligence, Cairns, August 1996. *Lecture notes in computer science (Lecture notes in artificial intelligence)*, vol 1114. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 157

11. Proceedings with an editor (without a publisher):

Aaron M (1999) The future of genomics. In: Williams H (ed) Proceedings of the genomic researchers, Boston, 1999

12. Proceedings without an editor (without a publisher):

Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. In: Abstracts of the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978

13. Paper presented at a conference:

Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. Paper presented at the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978

14. Patent:

Name and date of patent are optional

Norman LO (1998) Lightning rods. US Patent 4,379,752, 9 Sept 1998

15. Dissertation:

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

16. Institutional author (book):

International Anatomical Nomenclature Committee (1966) *Nomina anatomica. Excerpta Medica*, Amsterdam

17. Non-English publication cited in an English publication:

Wolf GH, Lehman P-F (1976) *Atlas der Anatomie*, vol 4/3, 4th edn. Fischer, Berlin.

[NB: Use the language of the primary document, not that of the reference for "vol" etc.!]

18. Non-Latin alphabet publication:

The English translation is optional.

Marikhin VY, Myasnikova LP (1977) *Nadmolekulyarnaya struktura polimerov* (The supramolecular structure of polymers). Khimiya, Leningrad

19. Published and In press articles with or without DOI:

19.1 In press

Wilson M et al (2006) References. In: Wilson M (ed) *Style manual*. Springer, Berlin Heidelberg New York (in press)

19.2. Article by DOI (with page numbers)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* 78:74–80. DOI 10.1007/s001090000086

19.3. Article by DOI (before issue publication with page numbers)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med* (in press). DOI 10.1007/s001090000086

19.4. Article in electronic journal by DOI (no paginated version)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med*. DOI 10.1007/s801090000086

20. Internet publication/Online document

Doe J (1999) Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. <http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document>. Cited 15 Jan 1999

20.1. Online database

Healthwise Knowledgebase (1998) US Pharmacopeia, Rockville. <http://www.healthwise.org>. Cited 21 Sept 1998

Supplementary material/private homepage

Doe J (2000) Title of supplementary material.

<http://www.privatehomepage.com>. Cited 22 Feb 2000

University site

Doe J (1999) Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html>. Cited 25 Dec 1999

FTP site

Doe J (1999) Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt>. Cited 12 Nov 1999

Organization site

ISSN International Centre (1999) Global ISSN database. <http://www.issn.org>. Cited 20 Feb 2000

Proofs

Proofreading will be arranged by the Publisher. One proof, however, will be sent to the corresponding author. Within 48 hours of receipt, the author should return corrections to the Typesetter through its online correction system or, if preferred, by fax.

Offprints

25 offprints of each article will be provided free of charge. Additional offprints can be ordered by means of an offprint order form supplied with the proofs.

Page Charges and Color Figures

No page charges are levied on authors or their institutions. Please refer to the Figures and Tables section for more information on color figures.

Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher. This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.

Permissions

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or 500 words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures or tables from unpublished or copyrighted material.

Cover Photo

Authors are encouraged to submit a color photograph that could be considered for publication as a cover of the journal. An electronic file and a 150-word summary of what the illustration shows should be submitted. The illustration should be relevant to your paper but it must be an extra, different color figure than those to be published in the article itself. The candidate figure must be submitted as TIFF or JPEG at a resolution of 300-600 dpi or as clean hard copy on photographic paper.

Springer Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's

online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please click on the link below to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

- www.springer.com/openchoice

NIH Open Access Policy

It is now NIH policy that all articles on research supported by NIH be freely accessible within 12 months of publication, and the articles must be deposited in PubMed Central. Springer offers two options, both of which comply with the NIH directive: 1) by purchasing Open Choice for \$3,000 the authors can make their paper open access immediately, and Springer will deposit it in PubMed Central; 2) the authors can deposit the final typescript (but not typeset) version of their manuscript in PubMed Central and it will become freely accessible after 12 months.

www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/M9551R_NIH_OpenAccess_Flyer.pdf?SGWID=0-0-45-549098-0

Additional Information

Additional information can be obtained from:

Jinnie Kim

Springer

233 Spring Street

New York, NY 10013

USA

Tel: 1-212-460-1696

Fax: 1-212-463-0742

E-mail: jinnie.kim@springer.com

Homepage:

www.springer.com/12042

8.2. Normas para submissão do manuscrito à revista “*Tree Genetics & Genomes*”

Instructions for Authors

Editorial procedure

Reviews are published online freely available for the public for one year.

Manuscript submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Language

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to ask a native speaker to help you or arrange for your manuscript to be checked by a professional language editor prior to submission. A clear and concise language will help

editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in medicine, biomedical and life sciences, chemistry, physics, engineering, business/economics, and humanities

- Edanz Editing Global

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Types of papers

- Original papers:

Articles of this category should present substantial original work and should be organized as detailed below.

- Reviews:

Articles of this category can either summarize recently terminated research areas of wide importance, provide an up-to-date account of the present status of active research areas, or set the perspective for future research.

- Opinion papers:

Articles in this category should be short papers with the intent to provide contrary and/or broader perspectives on papers recently published in “Tree Genetics & Genomes”. The papers should be relatively short (3-5 printed pages) and should contain not only an opinion or criticism on methods or statistics, but also relevant data or original analyses that support the opposing view or comment.

- Short communications:

Articles of this category are restricted to I) major genetic resource developments such as sequences (genomic or EST), maps and genetic stocks, ii) major software and database developments, and iii) Meeting reports. The size limit is 4 printed pages.

Title page

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title

- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
 - Use italics for emphasis.
 - Use the automatic page numbering function to number the pages.
 - Do not use field functions.
 - Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
 - Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
 - Use the equation editor or MathType for equations.
 - Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
 - [Word template \(zip, 154 kB\)](#)
- Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.
- Genus and species names should be in italics.
- Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

Data Submission Standards

Submission of a manuscript to Tree Genetics and Genomes implies that readily reproducible materials described in the manuscript, including all relevant raw data, will be freely available to any scientist wishing to use them for non-commercial purposes. Nucleic acid sequences, protein sequences, genetic maps, SNPs, expression data, etc. must be deposited in the databases detailed below.

Enforcement of sequence submissions will occur during the review process. It is recommended that authors submit all relevant data types to the NCBI repositories in advance of submission to TGG (due to the longer timeline involved for formatting/submission). Submissions to organism-specific databases (for genetic maps and association studies) can be completed during the review/in response to reviews. Final acceptance of a manuscript into TGG is contingent on all relevant accession

numbers being made available in text. In all cases, public release of the data itself can be held by the respective databases until publication.

In addition to including relevant accession numbers in the manuscript text, authors are required to list the data types and the accession numbers (or indication of submissions in progress) in the cover letter.

Nucleotide sequences

Nucleotide sequences must be deposited with the DNA Data Bank of Japan (DDBJ), European Molecular Biology Laboratory (EMBL/EBI) Nucleotide Sequence Database, or GenBank (National Center for Biotechnology Information).

- [DNA Data Bank of Japan](#)
- [European Molecular Biology Laboratory](#)
- [GenBank](#)

Next-Generation Sequencing Reads

Raw sequence data must be submitted to NCBI's Short Read Archive (SRA).

Transcriptome assemblies should be submitted to NCBI's Transcriptome Shotgun Assembly Sequence Database (TSA). Note: Sequences in dbEST/SRA are single-pass reads are determined by different sequencing techniques. TSA sequences are computationally assembled sequences from these single-pass reads.

- [Short Read Archive](#)
- [Transcriptome Shotgun Assembly Sequence Database](#)

Sequence Alignments

Aligned sequence sets used for population genetics analysis must be submitted to PopSet.

- [PopSet](#)

Protein sequences

Protein sequences must be deposited with SwissProt or the Protein Information Resource (PIR).

- [SwissProt](#)
- [Protein Information Resource](#)

SNPs

Single nucleotide polymorphisms must be deposited into dbSNP.

- [dbSNP](#)

Genetic Maps

Genetic maps must be submitted to the relevant organism-specific database.

For forest tree species, submit all maker/position data to the TreeGenes database. Please contact tg-help@ucdavis.edu for submission assistance.

For horticulture tree species, please follow instructions and submit all marker/position data to the Genome Database for Rosaceae (GDR) or the Citrus Genome Database. Please contact tgg@bioinfo.wsu.edu for submission assistance.

- [TreeGenes database](#)
- [Genome Database for Rosaceae](#)
- [Citrus Genome Database](#)

Association, Population/Diversity, and Common Garden Studies (Genotype/Marker, Phenotype, Environment)

Supplemental files in the form of marker/genotype data, phenotype data, and environmental descriptors should be submitted to the relevant organism database.

For forest tree species, submit all formatted files to the TreeGenes Database. Please contact tg-help@ucdavis.edu for submission assistance.

For horticulture tree species, submit formatted files to the Genome Database for Rosaceae (GDR) or the Citrus Genome Database. Please contact tgg@bioinfo.wsu.edu for submission assistance.

- [TreeGenes database](#)
- [Genome Database for Rosaceae](#)
- [Citrus Genome Database](#)

Gene Expression data

Where appropriate, authors should adhere to the standards proposed by the Microarray Gene Expression Data Society and must deposit microarray data in one of the two public repositories: ArrayExpress or Gene Expression Omnibus (GEO). GEO also accepts chIP-Seq, methyl-Seq, SAGE, mRNA profiling, and small RNA profiling

- [Microarray Gene Expression Data Society](#)
- [ArrayExpress](#)
- [Gene Expression Omnibus](#)

Computational modeling

We encourage authors to prepare models of biochemical reaction networks using the Systems Biology Markup Language and to deposit the model with the BioModels database

- [Systems Biology Markup Language](#)
- [BioModels database](#)

Other Supplemental Data

For supplemental files that do not fit into one of the categories above, please send this information as flat files to Dryad.

- [Dryad](#)

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1993).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. Eur J Appl Physiol 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- [EndNote style \(zip, 3 kB\)](#)

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

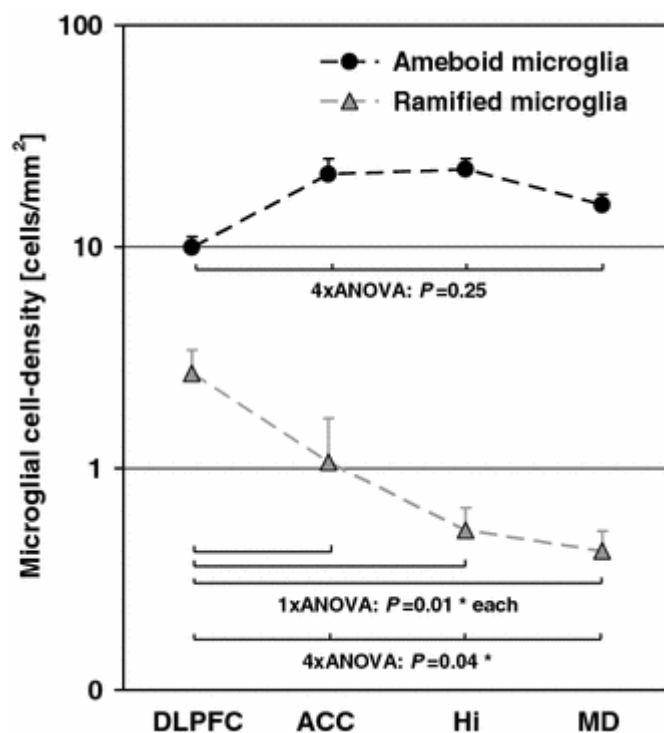
Artwork

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

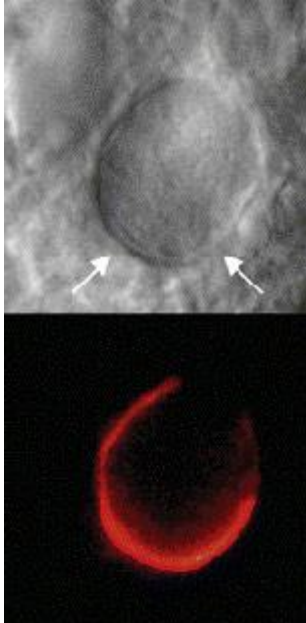
Line Art



- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

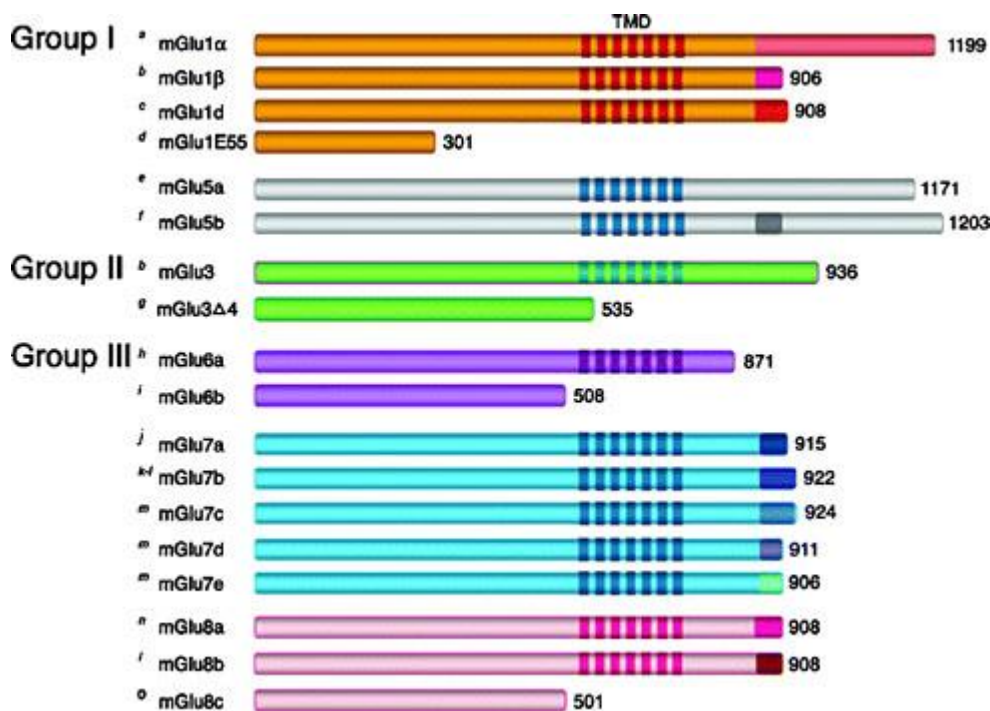
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

- Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Integrity of research and reporting

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a declaration that the experiments comply with the current laws of the country in which they were performed. Please include this note in a separate section before the reference list.

Conflict of interest

All benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript or any of the authors must be acknowledged. For each source of funds, both the research funder and the grant number should be given. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

8.3. Normas para submissão do manuscrito à revista “*Chromosome Research*”

Instructions for authors

Manuscript Submission

There are no page charges or charges for the publication of colour illustrations or administration charges for papers published in Chromosome Research.

It is understood that papers submitted for publication have not been published previously and are not simultaneously offered to any other journal. Before submission, the submitting author must ensure that the manuscript has been seen and approved by all other named authors.

How to Submit your Manuscript

Authors should submit their manuscripts online. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right of the Chromosome Research web page, or follow this link: <http://www.editorialmanager.com/chromres/>

Upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen. A decision with regard to acceptance for publication will normally be given within 21 days of receipt of the manuscript.

When submitting your manuscript, please choose one of the Associate Editors as your preferred handling editor. If you do not have a preference, or leave this option open, your submission will be handled by the Editor-in-Chief.

Editors-in-Chief:

Professor Herbert Macgregor

School of Biosciences

University of Exeter, UK

Professor Conly L. Rieder

Wadsworth Center, Biggs Laboratory

New York State Department of Health

Albany, NY, USA

Associate Editors:

Professor Wendy Bickmore
MRC Human Genetics Unit
Western General Hospital NHS Trust
Edinburgh, Scotland, UK

Professor Job Dekker
Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology
University of Massachusetts
Worcester, MA, USA

Dr. Mary E. Delany
Department of Animal Science
University of California
Davis, CA USA

Dr. Tatsuo Fukagawa
National Institute of Genetics
Mishima, Japan

Professor. J.S. (Pat) Heslop-Harrison
Department of Biology
University of Leicester
Leicester, UK

Dr. Dean Jackson
Faculty of Life Sciences
The University of Manchester
Manchester, UK

Dr. Jiming Jiang
Department of Horticulture
University of Wisconsin-Madison
Madison, WI, USA

Dr. Hans de Jong
Laboratory of Genetics
Wageningen Universiteit
Wageningen, the Netherlands

Dr. Irina Solovei
School of Biosciences
University of Exeter
Exeter, UK

Dr. Beth A Sullivan
Duke University
Durham, NC, USA

Dr. Walther Traut
Institut fuer Biologie
Universitaet Luebeck
Luebeck, Germany

Dr. Fengtang Yang
The Wellcome Trust Sanger Institute
Wellcome Trust Genome Campus
Hinxton, Cambridge, UK

Style and Presentation

The manuscript should be typed with double spacing throughout, allowing for ample margins. The title page should show the paper title, names and addresses of all authors, a short running title, and fax and telephone numbers and the e-mail address for the corresponding author. The text of the paper should be arranged in the following sequence: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References. Informative legends should be provided for all illustrations and should be grouped together at the end of the paper, along with all tables. Subheadings may be inserted in the main text, but should not be numbered or

lettered. Manuscripts should be written in clear, grammatical, idiomatic English. Spelling should conform to Webster's International Dictionary or The Concise Oxford English Dictionary and data should be presented simply and concisely, using Systeme International (SI) units.

Abbreviations

All abbreviations not obvious to the general reader should be defined the first time they are used. A complete alphabetically arranged list of all abbreviations used, including the definitions, should be included in the manuscript.

References

References should be cited in the text using the Harvard (name–date) system. Where there are three or more authors, only the first author's name should appear, followed by et al. Where several references are cited at the same point in the text, these should be arranged in chronological order. The reference list should be typed with double spacing and arranged in alphabetical order. References should include: names and initials of all authors (unless there are more than six authors, when only the first three authors should be given, followed by et al.); year of publication; full title of the article; source using abbreviations for journals as shown in Index Medicus; volume number; and first and last page numbers. Abstracts should be identified as such. For citations from books, the chapter title should be followed by the names and initials of all editors, the title of the book, edition, place of publication, publisher and first and last page numbers.

Examples:

Thomas HM, Harper JA, Morgan WG (2001) Gross chromosome rearrangements are occurring in an accession of the grass *Lolium rigidum*. *Chromosome Res* 9: 585–590.

Ohno S (2001) The one–to–four rule and paralogues of sex determining genes. In: Scherer G, Schmid M, eds. *Genes and Mechanisms in Vertebrate Sex Determination*. Birkhauser Verlag, pp 1–10.

Engel E, Antonarakis SE (2002) *Genomic Imprinting and Uniparental Disomy in Medicine*. New York: Wiley–Liss.

Only accepted papers should be referenced; all other material should be referred to in the text as 'in preparation', 'personal communication' 'unpublished observations' and should not be included in the reference list.

Citing Internet References

World Wide Web: All references should include the same information that would be provided for a printed source (or as much of that information as possible). The Web information is then placed at the end of the reference. It is important to use "Retrieved from" and the date because documents on the Web may change in content, move, or be removed from a site altogether. To cite a Web site in text (but not a specific document), it is sufficient to give the address (e.g., <http://www.apa.org>) there and no reference entry is needed. However, when citing a particular web page a citation in the text (e.g. Gaten 2000) and an entry in the reference list will be required.

For example:

Gaten E. (2000) Internet references. Retrieved from <http://www.le.ac.uk/biology/teach/mod300/ecitations.html> 19/9/2000

E-mail: E-mail communications from individuals should be cited as personal communications. The format in the text (personal communications are not cited in the reference list) is as follows:

(E. Gaten personal communication, March 28, 2001).

It is possible to send an e-mail note disguised as someone else. Authors – not journal editors or copy editors – are responsible for the accuracy of all references, which includes verifying the source of e-mail communications before citing them as personal communications in manuscripts.

One of the most comprehensive guides to citing internet references is provided by the American Psychological Association: <http://www.apastyle.org/electref.html>

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes. Key words should be chosen carefully, they are essential to electronic search tools.

Tables and Illustrations

All tables and illustrations should be referred to in the text, with appropriate locations indicated in the text margin. Tables should present new information and not duplicate data included in the text. Every table should have a descriptive title and, if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Line drawings should be supplied in a form suitable for high-quality reproduction. Axes should be labelled clearly; other lettering should be kept to a minimum. Avoid the use of fine tints, especially as background to text.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically. For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel) TIFF.

Photographs and photomicrographs should be cropped as close as possible to the area of interest and should be submitted as high resolution (>300dpi) as electronic files together with the manuscript. All photomicrographs must be accompanied by a scale bar with the equivalent measurement stated in the figure legend.

Colour figures

There are no charges for the publication of colour illustrations, either in the online or in the printed version of Chromosome Research.

Electronic Supplementary Material

Electronic Supplementary Material (ESM) for a paper will be published in the electronic edition of this journal provided the material is submitted in electronic form together with the manuscript and accepted after peer review. Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting. After acceptance for publication, ESM will be published as received from the author in the online version only. Reference will be given in the printed version.

ESM may consist of:

- Information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings (use PDF, QuickTime, .avi, .mpeg, animated GIFs, or any other common file format) Submit your text or presentation material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for longterm storage.
- Information that is more convenient in electronic form: sequences, spectral data, etc.
- Large quantities of original data that relate to the paper, e.g. additional tables, large numbers of illustrations (colour and black & white), etc.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables (e.g., ". . . as shown in supplement S3").

Legends

Legends must be brief, self-sufficient explanations of the ESM. ESM is to be numbered and referred to as S1, S2, etc.

Permission and Copyright

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or 500 words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures or tables from unpublished or copyrighted material. Copyright in articles published in this journal is the property of Springer to the extent transferable. Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources. There are no page charges or administration charges for papers published in this journal.

Open access publishing: Springer Open Choice™

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice™. A Springer Open Choice™ article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly (free of charge) through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice™, upon acceptance please visit www.springer.com/openchoice to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice™ cannot be ordered for published articles.

Please note that funding agencies with mandatory open access or public access (i.e. USA NIH and the UK Wellcome Trust) and several other institutes (The Max Planck in Germany, the Dutch UKB and others) have special arrangements for Open Access publishing with Springer. Please consult your funding agency's representative for specific details.

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author by email. Your response, with or without corrections, should be sent within 72 hours.

Off-prints

Authors may order additional off-prints on the form which accompanies the proofs.

Additional Information

Max Haring, PhD

Publishing editor for Chromosome Research

Springer Science & Business Media

P.O. Box 17

3300 AA Dordrecht

The Netherlands

E-mail: Max.Haring@springer.com

<http://www.springer.com/journal/10577>