

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Curso de Pós- Graduação em Ciências Biológicas

EVOLUÇÃO DO DNA SATÉLITE NA SUBFAMÍLIA
AURANTIOIDEAE
(RUTACEAE)

Recife
Setembro 2007

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que de uma maneira ou de outra contribuíram para realização desse trabalho, em especial:

Ao Prof. Marcelo Guerra, não só pelo seu papel impecável como orientador, por ser a pessoa responsável por toda minha formação profissional, mas pela grande amizade, pelo conselheiro de todas as horas e situações, pelos seus ensinamentos e exemplos não só como profissional, mas acima de tudo como ser humano.

Aos amigos do Laboratório, Ana Christina, Ana Paula, Andrea, André, Adriana, Aretuza, Artur, Cícero, Eliene, Fagna, Fernando, Felipe, Gabriela, Gustavo, Ivan, Joana, Leonardo, Liliane, Rogério, Sandra, Silvana, Tiago (Tel), Tiago (Ribeiro) pelo espírito de companheirismo, amizade e pelas contribuições dadas para a realização desse trabalho.

A minha mãe Nerine e a Eliane por estarem sempre ao meu lado, apoiando e incentivando.

Às amigas Avani, Gabriela, Glauce, Graciane, Virginia, Verônica pelo apoio, amizade e incentivo.

À chefia do Departamento de Botânica da UFPE pelo apoio dado para que eu pudesse realizar esse curso.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, na pessoa da Prof^a Suely Galdino pelo apoio prestado.

À funcionária da Pós-Graduação, Adenilda, pelo apoio prestado.

Aos vigilantes do Centro de Ciências Biológicas, pelo apoio prestado, o qual possibilitou a minha permanência no laboratório, com segurança, nos horários fora do expediente normal.

Silva, Ana Emília Barros e

Evolução do DNA satélite na subfamília aurantioideae (Rutaceae) / Ana Emília Barros e Silva. – Recife: O Autor, 2007.

119 folhas : il., fig., tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2007.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Biologia vegetal 2. Dicotiledôneas 3. Aurantioideae (Rutaceae) 4. Citogenética I. Título.

583.77 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB - 2009-192

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Curso de Pós- Graduação em Ciências Biológicas

EVOLUÇÃO DO DNA SATÉLITE NA SUBFAMÍLIA
AURANTIOIDEAE
(RUTACEAE)

Tese apresentada por Ana Emília
Barros e Silva como requisito para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Biológicas (área de concentração em
Genética) pelo curso de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas da UFPE

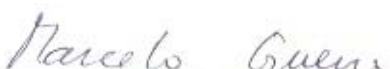
Orientador: Profº Marcelo Guerra
(Depto. Botânica, UFPE)

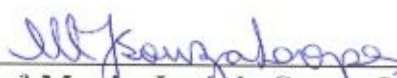
Recife
Setembro 2007

A evolução do DNA satellite na subfamília Aurantioideae (Rutaceae)

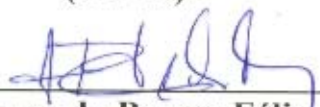
Banca Examinadora

Titulares


Prof. Dr. Marcelo dos Santos Guerra Filho
Orientador (UFPE)


Prof.^a Dr.^a Maria José de Souza Lopes
(UFPE)


Prof.^a Dr.^a Ana Christina Brasileiro Vidal
(UFPE)


Prof. Dr. Leonardo Pessoa Félix
(UFPB)


Prof.^a Dr.^a Eliana Regina Forni Martins
(UNICAMP)

Suplentes

Prof.^a Dr.^a Ana Maria Benko Iseppon
(UFPE)

Prof.^a Dr.^a Andréa Pedrosa Harand
(UFPE)

Ao grande amigo, conselheiro e mestre, Marcelo
Guerra, com muito carinho e gratidão
Dedico

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELA	
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO I - A Citogenética de <i>Citrus</i> e Gêneros Próximos	4
1. contribuição da citogenética ao melhoramento de plantas	5
2. A citogenética de <i>Citrus</i>	8
2.1. Número e morfologia dos cromossomos	8
2.2. Análise meiótica	10
2.3. Poliplóidia e haplóidia	12
2.4. Origem dos poliplóides	13
2.5. Bandeamento cromossômico	15
2.6. Padrão de bandas CMA entre cultivares	16
2.7. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente	18
3. Citogenética dos gêneros próximos a <i>Citrus</i>	19
4. Novas abordagens	22
5. Referências bibliográficas	24
CAPÍTULO II - Citogenética Molecular: uma Abordagem Alternativa para a Taxonomia dos <i>Citrus</i> L. (Rutaceae)	41
O problema taxonômico	42
A análise citogenética com CMA/DAPI	42
A distribuição dos genes ribossomais 5S e 45S	45
Novas marcas citomoleculares	46
Referências bibliográficas	47
CAPÍTULO III – Conservação da Ligação dos Sítios de DNAr 5S e 45S em	49

Representantes da Subfamília Aurantioideae (Rutaceae)

Resumo	51
Palavras chave	51
Introdução	52
Material e Métodos	54
Materiais	54
Preparação cromossômica	54
Coloração CMA/DAPI	55
Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (FISH)	55
Resultados	56
Discussão	59
Agradecimentos	65
Referências bibliográficas	65

CAPÍTULO IV Localização Cromossômica de uma Sequência Satélite em 75***Citrus* e Gêneros Relacionados**

Resumo	77
Palavras Chaves	77
Introdução	78
Materiais e Métodos	80
Materiais	80
Preparação das lâminas	81
Coloração com CMA e DAPI	81
Obtenção e marcação do DNA satélite	81
Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	82
Resultados	82
Discussão	84
Agradecimentos	87
Referências bibliográficas	87

CONCLUSÕES GERAIS 94**ANEXOS** 97

Normas para Publicação – EMBRAPA - CNPMF	98
Normas para Publicação – Sociedade Brasileira de Botânica	103
Normas para Publicação – Annals of Botany	104
Normas para Publicação- Chromosome Research	115

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
CAPÍTULO I		
Figura 1	Cromossomos de <i>Citrus</i> e gêneros próximos: a) metáfase de <i>Citrus depressa</i> Hay. mostrando a pequena variação de tamanho e morfologia cromossômica; b) prófase de <i>C. sunki</i> hort. ex Tan. x <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf., destacando-se a presença de diversos blocos heteropicnóticos; c) e d) metáfase de um acesso heterozigoto de <i>C. grandis</i> (L.) Osb. corada com DAPI (c) e com CMA (d). Observe que as regiões mais brilhantes com o CMA aparecem negativas com o DAPI.; e) metáfase de <i>Clausena lansium</i> (Lour.) Skeels; f) metáfase de <i>Murraya paniculata</i> (L.) Jack; (a) e (b) coradas convencionalmente com Giemsa; (e) e (f) coradas com CMA. Fotos: a, b, originais; c, d, reproduzidas de Guerra (1993); e, f, reproduzidas de Guerra <i>et al.</i> , (2000)	39
Figura 2	Tipos cromossômicos encontrados nos cariótipos de espécies cítricas após coloração com o fluorocromo CMA (de acordo com Carvalho <i>et al.</i> , 2005)	40
CAPÍTULO II		
Figura 1	Fórmula cariotípica de algumas espécies de <i>Citrus</i> mostrando cariótipos homomórficos (a-d) e heteromórficos (e-h). Nesses idiogramas é mostrada apenas a distribuição das bandas nos cromossomos, não respeitando a variação de tamanho cromossômico e a posição do centrômero.	44

CAPÍTULO III

Figura 1	Figura 1. Hibridização <i>in situ</i> com sondas de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) em células coradas com CMA de <i>Glycosmis pentaphylla</i> (a-b), <i>Clausena excavata</i> (c-e), <i>Bergera koenigii</i> (f-h), <i>Murraya paniculata</i> (i-j), <i>Merrillia caloxylon</i> (k-m). Setas em (e) mostram os cromossomos que possuem sítios de DNAr 5S. Barra corresponde a 5 µm	72
Figura 2	Hibridização <i>in situ</i> com sondas de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) em células coradas com CMA de <i>Citrus hystrix</i> (a-c), <i>Fortunella obovata</i> (d-e), <i>Swinglea glutinosa</i> (f-g), <i>Severinia buxifolia</i> (h-i) <i>Atalantia monophylla</i> (j-k). Barra corresponde a 5 µm	73
Figura 3	Cladograma baseado em Samuel <i>et al.</i> (2001) mostrando o número e a distribuição dos sítios de DNAr 45S e 5S nas espécies analisadas, em <i>Citrus medica</i> (Carvalho <i>et al.</i> 2005), <i>C. sinensis</i> (Pedrosa <i>et al.</i> 2000), <i>C. grandis</i> (Moraes <i>et al.</i> 2007) e <i>Poncirus trifoliata</i> (Brasileiro-Vidal <i>et al.</i> 2007). Blocos de heterocromatina CMA ⁺ em amarelo, sítios de DNAr 5S em vermelho e sítios de DNAr 45S em verde	74

CAPÍTULO IV

Figura 1	Células metafásicas coradas com CMA (A, C, E, G, I) e hbridizadas com a seqüência CsSat181 (B, D, F, H, J). <i>C. sinensis</i> (A-B); <i>C. aurantium</i> (C-D); <i>C. medica</i> (E-F); <i>P. trifoliata</i> (G-H), <i>F. crassifolia</i> (I-J) e <i>M. paniculata</i> (K-L). Setas indicam a localização dos sítios de DNAr 45S. Barra corresponde a 5 µm	93
----------	---	----

LISTA DE TABELAS

	Pág,
CAPÍTULO III	
Tabela 1	Fórmula cariotípica baseada no padrão de bandas CMA, número e distribuição dos sítios de DNAr em representantes da subfamília Aurantioideae
	70

RESUMO

A subfamília Aurantioideae (Rutaceae) está representada por cerca de 200 espécies, destacando-se àquelas pertencentes ao gênero *Citrus*, pela sua importância econômica. Do ponto de vista citogenético, o padrão de bandas heterocromáticas de *Citrus* e gêneros relacionados é o parâmetro mais importante para comparação entre espécies, por ser bastante variável. Embora essas bandas sejam ricas em GC, o que é demonstrado pela coloração com cromomicina A3 (CMA), a natureza dessas bandas ainda é desconhecida. Neste trabalho foi realizada uma análise comparada da distribuição das bandas CMA, dos sítios de DNAr 5S e 45S e de uma sequência satélite isolada de *Citrus sinensis* nos cromossomos de representantes de alguns gêneros, através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), visando compreender a evolução da heterocromatina dentro da subfamília. Os resultados mostraram que os sítios de DNAr 5S ocorrem quase sempre muito proximamente ligados aos sítios de DNAr 45S, sugerindo que a conservação dessa ligação foi mantida por pressão de seleção. Um aspecto importante dessa associação é que a posição cromossômica dos sítios de DNAr 5S e 45S variou entre as espécies sem alterar a orientação cromossômica destes, indicando a ocorrência de diversos rearranjos cromossômicos. Por outro lado, o DNA satélite rico em GC isolado de *C. sinensis*, hibridizou na maioria dos blocos heterocromáticos das três espécies investigadas de *Citrus*, em *Fortunella obovata* e em *Poncirus trifoliata*, sugerindo que essa sequência seja um dos principais componentes das bandas CMA observadas em *Citrus* e gêneros próximos. Contudo, essa sequência não hibridizou em *Murraya paniculata*, uma espécie mais afastada de *Citrus*, mas com padrão de bandas heterocromáticas similar a este. Portanto, sequências satélites diferentes podem ter sido amplificadas em grupos distintos de espécies de Aurantioideae, gerando padrões de bandas similares. Esses dados indicam que padrões de bandas similares não indicam necessariamente homeologia cromossômica.

Palavras Chaves: Aurantioideae, *Citrus*, cromossomos, DNAr, DNA satélite e FISH

e-mail: aebsilva@hotmail.com

ABSTRACT

The subfamily Aurantioideae (Rutaceae) is represented by about 200 species from which the *Citrus* species are the most known due to their economical importance. From the cytogenetic point of view, the heterochromatic banding pattern of *Citrus* and other related genera is the most useful character for species comparisons, since it is quite variable. The bands observed are GC-rich, since they are revealed by chromomycin A3 (CMA), but the real nature of these bands is still unknown. In this work, the distribution of CMA bands was compared with that of 5S and 45S rDNA sites and the location of a GC-rich satellite DNA sequence isolated from *C. sinensis* using fluorescent *in situ* hybridization. This analysis was performed in representatives of some genera, aiming to understand the nature and evolution of heterochromatin within this subfamily. The results showed that the 5S rDNA sites were almost always very closely linked to the 45S rDNA sites, suggesting that the maintenance of this linkage was positively selected. Noteworthy, the number and position of the 5S-45S rDNA sites varied among the species investigated without disturbing the chromosomal orientation of the two gene arrays, pointing to the occurrence of several chromosome rearrangements. On the other hand, the satellite DNA sequence isolated from *C. sinensis* hybridized in most heterochromatin blocks of all three species of *Citrus* investigated, in *Fortunella crassifolia*, and in *Poncirus trifoliata*. It suggests that this sequence is one the main components of the CMA bands observed in *Citrus* and closely related genera. On the other hand, this sequence did not hybridized with the CMA bands of *Murraya paniculata*, a far related species within the subfamily, bearing similar banding pattern. Therefore, different satellite sequences may have been amplified in distinct groups of Aurantioideae species, generating similar banding patterns. These data indicate that similar banding patterns do not always reflect chromosome homoeology.

Keywords: Aurantioideae, *Citrus*, chromosomes, rDNA, FISH and satellite DNA

e-mail: aebsilva@hotmail.com

Introdução

Introdução

A subfamília Aurantioideae (Rutaceae), possui cerca de 200 espécies distribuídas em 33 gêneros, destacando-se o gênero *Citrus*, por sua importância econômica (Swingle e Reece, 1967). Taxonomicamente *Citrus* não é um grupo bem definido, existindo alguns sistemas de classificação que admitem três, 16 ou até 157 espécies diferentes. Por outro lado, a separação da família em tribos e subtribos tem sido questionada por alguns autores (Samuel *et al.*, 2001; De Araújo *et al.*, 2003). Diferentes abordagens têm sido realizadas visando uma melhor caracterização das espécies e gêneros dessa subfamília e das relações filogenéticas entre as mesmas. Do ponto de vista citogenético, é conhecido que a heterocromatina, constituída de DNA satélite, tem um papel muito importante na diversificação cariotípica das Aurantioideae, permitindo caracterizar a maioria das espécies (Guerra *et al.*, 2000).

Citogeneticamente as espécies de Aurantioideae divergem entre si principalmente em relação ao padrão de distribuição e quantidade de heterocromatina no cariótipo. A heterocromatina neste grupo é rica em pares de bases GC e está localizada em um ou ambos os terminais da região telomérica de muitos cromossomos, e na região pericentromérica de alguns cromossomos. A quantidade de heterocromatina entre as espécies varia de 3 a 30 % por genoma diplóide. Esta variação parece não ser ao acaso, uma vez que, as espécies consideradas mais primitivas possuem em geral pouca heterocromatina e as mais avançadas possuem uma quantidade mais elevada (Guerra *et al.*, 2000). O aspecto mais intrigante é que diferentes linhagens evolutivas apresentam padrões muito similares de distribuição da heterocromatina. Essa coincidência de padrões de bandas pode ser devida a uma falha na classificação, principalmente na divisão das tribos e subtribos, ou à amplificação/desamplificação paralela do DNA satélite nas diferentes linhagens.

Em outros grupos de plantas, o estudo comparado das seqüências de DNA satélite tem contribuído bastante para caracterização das espécies e para uma melhor compreensão das relações filogenéticas (ver por exemplo, Lim *et al.*, 2006; Stevenson *et al.*, 1999). Dentro de Aurantioideae as pesquisas nessa área são restritas à análise das seqüências de DNAr 5S e 45S em algumas poucas espécies cítricas (ver Pedrosa *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2005, Brasileiro-Vidal *et al.*, 2007). Neste trabalho foi feita uma análise comparativa da distribuição dos sítios de DNAr e de uma seqüência satélite isolada de *C. sinensis* em vários representantes da subfamília através do método de hibridização *in situ*, visando entender a evolução dessa fração de DNA no genoma do grupo.

Capítulo I

A citogenética de *Citrus* e gêneros próximos

Capítulo de livro sobre citros a ser publicado pela EMBRAPA-CNPMF

A CITOGENÉTICA DE *Citrus* E GÊNEROS PRÓXIMOS

Ana Emília Barros e Silva¹ e Marcelo Guerra¹

1. CONTRIBUIÇÃO DA CITOGENÉTICA AO MELHORAMENTO DE PLANTAS

Nos últimos 30 anos, tem sido feito um grande esforço para caracterizar os germoplasmas de plantas cultivadas e de seus parentes silvestres por meio de marcadores genéticos, isto é, com base em características genéticas que possam ser reconhecidas em qualquer condição ambiental e em híbridos interespecíficos. Vários tipos de marcadores foram desenvolvidos, destacando-se os marcadores isoenzimáticos (com alguma restrição) e os marcadores moleculares, ambos amplamente utilizados em *Citrus* (revisado por Moore, 2001). O objetivo, em todos os casos, é criar ou estabelecer um tipo de *etiqueta genética* que permita reconhecer inconfundivelmente cada germoplasma. Nesse sentido, os diferentes marcadores moleculares apresentam a vantagem de possibilitar a obtenção de um grande número de marcas para cada genótipo.

Um outro tipo de caracterização genética de cultivares e de espécies próximas utiliza marcadores cromossômicos. Esse tipo de marcador tem sido mais empregado em algumas gramíneas, como milho e trigo, mas atualmente tem sido utilizado em diversas espécies (ver Puertas & Naranjo, 2005). Uma vantagem dos marcadores cromossômicos é que, à semelhança dos marcadores moleculares, as características citogenéticas dizem respeito ao próprio material genético e não à expressão do genoma, como ocorre para os marcadores morfológicos e

isoenzimáticos. A análise do conjunto cromossômico oferece uma visão global do genoma ao nível citológico, isto é, não investiga um determinado conjunto de genes ou de fragmentos de DNA, mas, de forma mais “macroscópica”, todo o material genético contido no núcleo. Além disso, a análise citogenética produz informações exclusivas, como o comportamento meiótico, que se reflete diretamente na fertilidade, e as alterações cromossômicas numéricas ou estruturais, especialmente freqüentes em híbridos e em plantas obtidas via cultura de tecidos prolongada ou fusão de protoplastos (Iwamasa & Nito, 1988; Fluminhan *et al.*, 1996). Por outro lado, essa visão “macroscópica” do genoma dificulta ou impede que pequenas alterações nos genes, ou em fragmentos de DNA, sejam detectadas. Com a introdução de técnicas citogenéticas mais refinadas, a observação cromossômica tornou-se muito mais detalhada, principalmente com o desenvolvimento das técnicas de *bandeamento cromossômico* e de *hibridização in situ*.

As técnicas de bandeamento permitem corar diferencialmente regiões cromossômicas formadas por segmentos de DNA repetidos centenas ou milhares de vezes *em tandem* (um em seguida ao outro), constituindo os chamados *blocos ou bandas de heterocromatina*. A observação de tais blocos é feita geralmente por meio de duas técnicas principais: o bandeamento C, que revela geralmente toda a heterocromatina do genoma, e a coloração com fluorocromos que se ligam preferencialmente a regiões do cromossomo ricas nos nucleotídeos citosina e guanina (GC) ou adenina e timina (AT). Entre esses fluorocromos, os mais extensamente utilizados são a cromomicina A₃ (CMA), que revela regiões ricas em GC, e o 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), para regiões ricas em AT (revisado por Guerra, 2000). A coloração com CMA é particularmente útil na análise de bandas

heterocromáticas em espécies cítricas (ver por exemplo, Guerra, 1993; Cornélio *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2007)

Na técnica de hibridização *in situ*, o objetivo é localizar, um determinado gene ou fragmento de DNA no complemento cromossômico. Para isso, é necessário isolar esse fragmento de DNA marcá-lo com uma molécula marcadora de fácil detecção, como por exemplo a biotina. O fragmento marcado, chamado de sonda, pode ser hibridizado *in situ*, isto é, no sítio ou local do cromossomo onde essa seqüência se encontra presente. Com o uso de anticorpos ligados a corantes fluorescentes, como a antibiotina-rodamina, é possível visualizar em qual, ou quais, cromossomos se localiza o DNA hibridizado. Um ponto crítico nessa análise é o tamanho da seqüência de DNA que se quer localizar – quanto maior a seqüência mais fácil será sua localização (para uma descrição detalhada dessa técnica ver Guerra, 2004).

Tanto os blocos de heterocromatina quanto os sítios visualizados por hibridização *in situ* permitem estabelecer novas marcas nos cromossomos, possibilitando caracterizar mais precisamente cada genoma. A técnica de hibridização *in situ* permite também analisar híbridos interespecíficos, corando diferencialmente os genomas das espécies envolvidas na formação dos híbridos. Com isso, pode-se visualizar, por exemplo, nos experimentos de transferência de genes de espécies silvestres para cultivadas, qual a porcentagem do genoma da espécie silvestre está presente na cultivada (Brasileiro-Vidal & Guerra, 2002). Essa técnica, denominada de GISH (*Genomic In Situ Hybridization*), será também discutida mais adiante.

Entre as espécies cultivadas, a contribuição da citogenética tem sido notavelmente maior nas gramíneas, mas, recentemente, tem sido estendida a

muitas outras culturas, como diversas espécies silvestres e cultivadas de mandioca (Carvalho & Guerra, 2002), maracujá (Melo & Guerra, 2003), espécies forrageiras, como por exemplo *Paspalum* (Vaio *et al.*, 2005) e feijão comum (Pedrosa *et al.*, 2003; Pedrosa-Harand *et al.*, 2006). A contribuição da citogenética em diversos outros grupos de plantas cultivadas se encontra revisada em Gupta & Tsuchiya (1991), Tsuchiya & Gupta (1991), Sybenga (1993) e Puertas & Naranjo (2005). Neste capítulo, será apresentada uma revisão completa da literatura sobre a citogenética de *Citrus* e gêneros afins e de suas implicações para a taxonomia e para o melhoramento genético.

2. A CITOGENÉTICA DE *CITRUS*

2.1. NÚMERO E MORFOLOGIA DOS CROMOSSOMOS

A análise cromossômica das espécies de *Citrus* L. foi inicialmente desestimulada pelo pequeno tamanho dos cromossomos e pela similaridade cromossômica dentro de cada cariótipo e entre cariótipos de espécies diferentes. O tamanho do genoma de *Citrus* foi inicialmente estimado em 0,62 pg de DNA por núcleo haplóide de laranja doce [*C. sinensis* (L.) Osb.], utilizando-se citodensitometria com coloração Feulgen (Guerra, 1984). Isso significa que esse genoma é quase 30 vezes menor que o de trigo ou de cebola. Ollitrault & Michaux-Ferrière (1994) analisaram várias espécies de *Citrus* por citometria de fluxo e encontraram valores superiores (1C = 0,8-1,0 pg). Valores semelhantes foram encontrados em espécies de outros gêneros próximos a *Citrus*, como *Murraya*

paniculata (L.) Jack (1C = 0,5 pg; Guerra, 1984), *M. koenigii* (L.) Spreng. e *Atalantia monophylla* DC., com 1C = 0,65 e 0,58 pg, respectivamente (Ohri & Kumar, 1986).

Os primeiros relatos sobre o número cromossômico de espécies de *Citrus*, realizados por Strasburger, em 1907, e por Osawa, em 1921, registraram $n = 8$ e $2n = 14$ ou 16 (revisado por Frost, 1925b). Contudo, numerosos trabalhos posteriores demonstraram que o número cromossômico em todas as espécies do gênero era sempre $n = 9$, em meiose, ou $2n = 18$, em células somáticas (Stace *et al.*, 1993). Outros números cromossômicos (haplóides, aneuplóides e poliplóides) têm sido observados exclusivamente em condições de cultivo (Bacchi & Krug, 1943; Barrett & Hutchinson, 1978; Iwamasa & Nito, 1988; Miranda *et al.*, 1997b). Frost (1925b), que primeiro contou corretamente os cromossomos de algumas espécies de *Citrus*, atribuiu o erro dos primeiros autores ao pequeno tamanho dos cromossomos e à técnica de coloração utilizada. Igualmente, a grande variação no número de cromossomos observada por Sharma & Bal (1957) deve-se certamente à inadequação da técnica citológica empregada.

A morfologia dos cromossomos das espécies de *Citrus* é ligeiramente variável, com a maioria dos cromossomos sendo metacêntricos ou submetacêntricos e uns poucos acrocêntricos (Figura 1a). Agarwal (1987a), por exemplo, observou que os cromossomos de *C. tamurana* Hort. ex Tan. eram todos meta a submetacêntricos e variavam de 1,88 a 2,73 μm de comprimento. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores (ver, por exemplo, Sharma & Bal, 1957; Guerra, 1993; Miranda *et al.*, 1997a; Befu *et al.*, 2001), muitos dos quais apresentaram idiogramas representando a morfologia dos cromossomos dessas espécies. Entretanto, devido à similaridade de forma e à variação causada pelo grau de contração dos cromossomos, não é possível utilizar apenas esses parâmetros

para caracterizar citologicamente as espécies de *Citrus*. Além disso, a presença de blocos de heterocromatina terminais, fortemente condensados e relativamente grandes (Guerra, 1985), pode confundir a localização das constrições primárias e secundárias em cromossomos profásicos - o que explica o grande número de constrições secundárias registrado por Sharma & Bal (1957). A Figura 1b mostra cromossomos profásicos característicos das espécies de *Citrus*, corados convencionalmente com Giemsa, onde se observa a presença de diversos blocos heteropicnóticos terminais.

Guerra *et al.* (1997) examinaram os cromossomos de 51 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de *Citrus* da **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, Cruz das Almas, BA, incluindo 20 espécies de *Citrus*, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e sete híbridos artificiais. Nesse estudo, não foi encontrada nenhuma variação numérica ou morfológica evidente, exceto no número e posição das constrições secundárias. Cada acesso apresentou um a três cromossomos com constrições secundárias na posição proximal ou terminal/subterminal. A análise detalhada dessas constrições, feita em 206 células de um único indivíduo de *C. sinensis* (Pedrosa *et al.*, 1997), confirmou a ocorrência de apenas três constrições nessa espécie, sendo que na maioria das células apenas duas constrições foram ativadas (uma proximal, localizada em um cromossomo maior, e uma subterminal, localizada em um cromossomo menor). A terceira constrição (também proximal) teve sua ativação fortemente restrita pela ativação de sua homóloga. Entre todos os materiais investigados, *C. depressa* Hayata e *C. longispina* Wester destacaram-se como as únicas espécies com três constrições secundárias proximais.

2.2. ANÁLISE MEIÓTICA

A análise das células meióticas das anteras mostra, freqüentemente, um número variável de alterações cromossômicas, principalmente pontes anafásicas e univalentes (Naithani & Raghuvanshi, 1958a, 1958b, 1963; Raghuvanshi, 1962a, 1962b; Moscoso & Shambulingappa, 1972; Sellito-Boaventura & Pio, 1989). Essas alterações foram atribuídas à heterozigosidade estrutural cromossômica para inversões e translocações, o que poderia estar relacionada à aparente origem híbrida de algumas espécies de *Citrus* (Barrett & Rhodes, 1976). Contudo, alguns autores têm observado uma meiose normal ou com alterações esporádicas e não-significativas (Oppenheim & Frankel, 1929; Banerji, 1954; Cornélio, 1994). Agarwal (1987b, 1987c) analisou a meiose de três espécies, supostamente de origem híbrida (*C. jambhiri* Lush., *C. limonia* Osb. e *C. karna* Raf.), de um híbrido artificial (*C. paradisi* Macf. x *C. sinensis*) e de três híbridos intergenéricos com *P. trifoliata*, encontrando alterações meióticas apenas em *C. limonia*. Cavalcante *et al.* (2000) analisaram o comportamento meiótico de 70 plantas de tangerina 'Lee', um híbrido de *C. clementina* Hort. ex Tan. com *C. paradisi* x *C. tangerina* Hort. ex Tan., e concluíram que apenas 11 dessas tinham alguma alteração meiótica.

Raghuvanshi (1962b), baseado na análise de 25 cultivares e espécies, a maioria das quais apresentando alterações meióticas, concluiu que a evolução do gênero teria se dado basicamente por alterações estruturais cromossômicas associadas a hibridizações interespecíficas. Contudo, nem sempre alterações meióticas são devidas a mudanças estruturais. Cornélio (1994) mostrou que cromossomos com padrões de bandas bem diferentes podem parear regularmente. Por outro lado, a ocorrência de univalentes (uma alteração meiótica muito comum) em uma variedade sem sementes de *C. reticulata* Blanco, pareceu ser devida à

presença de um único gene recessivo controlando o pareamento entre cromossomos homólogos (Vardi & Spiegel-Roy, 1981).

2.3. POLIPLOIDIA E HAPLOIDIA

Espécies poliplóides não ocorrem no gênero *Citrus*, embora em condições de cultivo seja freqüente o aparecimento de indivíduos poliplóides. Frost (1925a) foi o primeiro a demonstrar a ocorrência espontânea de *seedlings* (plantas oriundas de sementes) poliplóides em freqüência relativamente alta em cultivo (cerca de 2,5%), posteriormente confirmada por diversos autores. Apesar da maioria das espécies de plantas cultivadas ser poliplóide, os *Citrus* poliplóides raramente são mais produtivos que os diplóides, embora tenham a vantagem de apresentar baixa produção de sementes (Cameron & Burnett, 1978). O poliplóide mais conhecido é o limão 'Tahiti' (*C. latifolia* Tan.), um triplóide surgido espontaneamente no qual a meiose é quase completamente suprimida resultando em raríssimas sementes (Bacchi & Krug, 1943). Embora tenha sido tratada como uma espécie por Tanaka, essa cultivar é apenas um clone, incapaz de se reproduzir eficientemente na natureza.

Em *Citrus* são também conhecidos diversos haplóides (ver, por exemplo, Yamamoto & Tominaga, 2004a). Plantas haplóides podem surgir espontaneamente ou podem ser produzidas por meio de cultura de anteras, de micrósporos ou por polinização com pólen triplóide (Sybenga, 1993). Os haplóides são muito importantes para a obtenção de linhagens monossômicas (por cruzamento com plantas diplóides), visando o mapeamento gênico, construção de bibliotecas específicas de determinados cromossomos, análise da expressão gênica, etc. (ver

Chang & de Jong, 2005). Podem também ser utilizados para obter plantas inteiramente homozigotas através da duplicação de seu complemento cromossômico e produção de indivíduos duplo-haplóides (Yamamoto e Tominaga, 2004b). Análises dos padrões de bandas heterocromáticas de plantas haplóides, duplo-haplóides, triplóides e tetraplóides de *Citrus* foram realizadas por Yang *et al.* (2002) e Yamamoto e Tominaga (2004a, 2004b).

2.4. ORIGEM DOS POLIPLÓIDES

Em *Citrus*, sementes poliplóides podem surgir devido à formação de gametas femininos não-reduzidos, gerando embriões zigóticos triplóides (Esen & Soost, 1971), ou devido a duplicações espontâneas do conjunto cromossômico de células somáticas, resultando na formação de embriões nucelares tetraplóides (Barrett & Hutchinson, 1978). Em toranja, foi possível demonstrar, por meio de bandeamento cromossômico, que o gameta não-reduzido que gera o poliplóide pode vir tanto do micro- quanto do megagametófito (Yang *et al.*, 2002).

A frequência com que embriões poliplóides surgem espontaneamente é variável e parece depender tanto das características genéticas da cultivar investigada quanto de fatores externos. No orangelo (*C. paradisi* x *C. sinensis*) 'Sukega', por exemplo, fatores genéticos levam a uma produção de triplóides excepcionalmente alta, resultante da formação regular de 20% a 25% de megagametófitos diplóides. Isso provavelmente se deve a uma alteração na meiose feminina ou a uma duplicação do número cromossômico no megásporo funcional (Esen *et al.*, 1979). Por outro lado, Barrett & Hutchinson (1978) observaram, em diferentes cultivares, que a produção de *seedlings* poliplóides de um mesmo clone

pode ser quase 100% maior de um ano para outro e variar em até 200%, quando cultivados em diferentes localidades. A origem dos poliplóides conhecidos em *Citrus* e seu potencial agrônomo foram revisados por Lee (1988).

A formação de poliplóides pode também ser artificialmente induzida. Diversos mecanismos têm sido explorados para a obtenção de triplóides sem sementes. Para isso, plantas tetraplóides são fecundadas com pólen de plantas diplóides, formando embriões zigóticos triplóides (Cameron & Burnett, 1978). O cruzamento inverso, plantas diplóides polinizadas por pólen tetraplóide, é menos utilizado, mas também resulta na formação de triplóides, além de uns raros tetraplóides e hexaplóides (Oiyama *et al.*, 1981). Os pomelos triplóides 'Oroblanco' e 'Melogold', por exemplo, foram obtidos dessa última maneira (Soost & Cameron, 1980, 1985).

Cameron & Soost (1969) observaram que quando um indivíduo diplóide é polinizado com o pólen diplóide de uma planta tetraplóide, formam-se os esperados embriões zigóticos triplóides, mas formam-se também embriões tetraplóides, supostamente devido à duplicação do complemento cromossômico da oosfera na presença de pólen diplóide (Esen *et al.*, 1979). Esses embriões geralmente são abortados, aparentemente devido ao desbalanço genético na proporção de genomas por célula entre os tecidos do embrião e os do endosperma (Esen & Soost, 1973; Wakana *et al.*, 1981). Contudo, se os embriões forem excisados e cultivados *in vitro*, é possível aumentar a eficiência na obtenção de embriões zigóticos triplóides. Starrantino & Recupero (1981), utilizando esse procedimento com diferentes espécies e variedades monoembriônicas de *Citrus*, obtiveram 300 *seedlings*, dos quais pelo menos 211 eram triplóides. Poliplóides artificiais podem também ser obtidos por tratamento com colchicina (Barrett, 1974), por cultura de

endosperma (Gmitter Junior *et al.*, 1990) ou por fusão de protoplastos (Wu *et al.*, 2005).

2.5. BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO

Devido à similaridade morfológica dos cromossomos de *Citrus*, tem sido tentado encontrar outras formas de diferenciação cromossômica que permitam caracterizar cada um dos nove pares cromossômicos. O padrão de condensação dos cromossomos profásicos das espécies de *Citrus* revela a presença de numerosos blocos heteropicnóticos na maioria dos cromossomos. Entretanto, a visualização desses blocos em cromossomos corados com técnicas convencionais depende muito do grau de contração dos cromossomos (Guerra, 1985). O uso da técnica de bandeamento C permite localizar numerosas bandas heterocromáticas em cromossomos profásicos ou metafásicos, possibilitando distinguir diversos padrões de bandas diferentes (Guerra, 1985; Liang, 1988; Wei *et al.*, 1988). Essas bandas distribuem-se principalmente na região terminal dos braços longos, embora, mais raramente, ocorram também nos braços curtos e na região proximal do cromossomo. Por outro lado, Ito *et al.* (1993), utilizando a técnica de bandeamento HKG, encontraram apenas bandas proximais na maioria dos cromossomos da laranja doce de umbigo 'Trovita', mas não descreveram detalhes da técnica.

Um padrão de bandas muito semelhante ao das bandas C pode ser observado com o fluorocromo CMA, que cora fortemente a heterocromatina (Guerra, 1993). Este fluorocromo é geralmente utilizado em combinação com o DAPI, que funciona como um contra-corante, reforçando o contraste entre a heterocromatina e a eucromatina. Apenas a coloração com DAPI não produz nenhuma diferenciação

longitudinal (Guerra, 1993; Ito *et al.*, 1993). A coloração com o CMA tem a vantagem de ser tecnicamente mais simples e mais reproduzível que o bandeamento C e de não alterar a morfologia cromossômica, como freqüentemente ocorre com o bandeamento C. Por essa razão, esse tipo de coloração vem sendo amplamente utilizado em *Citrus* e gêneros próximos (Miranda *et al.*, 1997a; Guerra *et al.*, 2000). As Figuras 1c e 1d ilustram a coloração CMA/DAPI típica de *Citrus* em geral.

Quando corados com o fluorocromo CMA, os cromossomos das espécies de *Citrus* revelam a existência de cinco tipos cromossômicos principais, caracterizados por padrões de distribuição de bandas característicos, além de alguns tipos menos frequentes (Figura 2). Os cromossomos dos tipos A, B e C são os mais usados como *cromossomos marcadores* (cromossomos bem distintos, que ocorrem em pequeno número dentro de cada espécie). Cada uma das espécies investigadas até o momento distinguiu-se pela presença de alguns cromossomos marcadores (ver por exemplo, Guerra 1993).

Os padrões de bandas CMA têm sido utilizados para caracterizar germoplasmas, identificar a formação de duplo-haplóides, distinguir embriões nucelares dos zigóticos, identificar as espécies puras do gênero, caracterizar alterações estruturais e numéricas e caracterizar híbridos somáticos inter-específicos (Miranda *et al.*, 1997b; Yamamoto & Tominaga, 2003, 2004b; Cornélio *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.* 2007). Alguns autores relataram que é possível identificar cada um dos cromossomos de *Citrus* combinando-se o padrão de bandas CMA com o brilho e tamanho da banda e o tamanho do cromossomo (Befu *et al.*, 2000, 2002; Yamamoto & Tominaga, 2004a).

2.6. PADRÃO DE BANDAS CMA ENTRE CULTIVARES

Guerra (1993) observou heterozigossidade cromossômica em todos os acessos de *Citrus* inicialmente investigados. Posteriormente, foi demonstrado que algumas poucas espécies eram citologicamente homozigotas, incluindo algumas das supostas espécies puras de *Citrus* (Befu *et al.*, 2001; Cornélio *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2005). Em alguns *Citrus*, esses padrões de bandas e pares heterozigotos são muito bem conservados em diferentes cultivares. Por exemplo, o mesmo padrão de bandas CMA descrito inicialmente para um indivíduo de *C. sinensis*, por Guerra (1993), foi posteriormente confirmado em 13 cultivares dessa espécie (Matsuyama *et al.*, 1996 ; Miranda *et al.*, 1997a; Befu *et al.*, 2000; Pedrosa *et al.*, 2000; Cornélio *et al.*, 2003). Igualmente em quatro cultivares de limão verdadeiro [*C. limon* (L.) Burm. f.] foram observados o mesmo padrão de bandas e os mesmos heteromorfismos entre homólogos (Carvalho *et al.*, 2005).

Por outro lado, entre as tangerinas, o grupo de *Citrus* com taxonomia mais confusa, a análise de 30 cultivares diferentes com bandeamento CMA revelou que praticamente não existem duas cultivares citogeneticamente iguais (Cornélio *et al.*, 2003; Yamamoto & Tominaga, 2003). O alto nível de heterozigossidade citogenética nessas cultivares não interfere significativamente na fertilidade, aparentemente porque o heteromorfismo das bandas CMA não influi no pareamento dos homólogos na meiose (Cornélio, 1994). Isso explica o fato de que muitos híbridos não apresentam problemas de pareamento meiótico nem de fertilidade (Iwamasa & Nito, 1988; Cavalcante *et al.*, 2000).

Os dados existentes atualmente sobre bandeamento CMA em cerca de 100 cultivares de *Citrus* mostram que, ao lado da estabilidade de número cromossômico do gênero, há uma intensa variabilidade estrutural e heteromorfismos

de bandas CMA em quase todas as cultivares, o que comprova a natureza híbrida da maioria das espécies/cultivares de *Citrus* (ver Cornélio *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2005; Moraes *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2007).

2.7. HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE

Atualmente, o bandeamento com CMA tem sido utilizado em combinação com a técnica de hibridização *in situ*, visando obter uma maior diferenciação dos cromossomos de *Citrus* e localizar a posição de genes e de outras seqüências de DNA no cromossomo. Matsuyama *et al.* (1996) foram os primeiros a mostrar a distribuição do DNA telomérico e do DNAr 26S em cromossomos de *C. sinensis*, na qual foi observada a presença de apenas três sítios de DNAr. Resultados semelhantes foram observados por de Pedrosa *et al.* (1997), que constataram a existência de apenas três constrições secundárias (os sítios onde se encontra o DNAr).

Pedrosa *et al.* (2000) analisaram o padrão de bandas CMA em dez cultivares de *C. sinensis* e a localização dos sítios DNAr 5S e 45S em três dessas cultivares. Através dessas análises eles observaram que todos os acessos de *C. sinensis* tinham não apenas o mesmo padrão de bandas e os mesmos heteromorfismos mas também a mesma distribuição de sítios do DNAr 5S e 45S. A alta heterozigosidade encontrada reforça a conclusão de Barrett & Rhodes (1976) de que *C. sinensis* não é uma espécie verdadeira, mas sim um híbrido interespecífico. Além disso, a similaridade entre esses acessos sugere que as cultivares atuais de laranja doce conservam o genoma do híbrido original, mantido

por multiplicação vegetativa, com pequenas mutações gênicas que diferenciam as cultivares.

A distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S foi também investigada em 10 acessos de limas, limões e cidra por Carvalho *et al.* (2005). Esses autores concluíram que dentre esses acessos apenas a cidra (*C. medica* L.) era homozigota para o padrão de bandas CMA e sítios de DNAr. Essa análise permitiu identificar um complemento cromossômico haplóide de cidra em todos os acessos de lima e limões examinados, confirmando a indicação de diversos autores de que cidra (*C. medica*) seria uma das espécies puras do grupo e que cidra está intimamente relacionada às limas e limões (Moore, 2001).

Matsuyama *et al.* (1999) observaram, por FISH, a distribuição de um minissatélite 'iki6k' em todos os cromossomos de *C. sinensis*, sempre na região da eucromatina. Esses autores demonstraram também que a sequência do DNA telomérico de *Arabidopsis* se encontra presente nos telômeros de todos os cromossomos dessa espécie. Aparentemente, os grande blocos de heterocromatina positiva para CMA são constituídos principalmente por uma sequência satélite rica em GC (Fann *et al.*, 2001).

3. CITOGENÉTICA DOS GÊNEROS PRÓXIMOS A *CITRUS*

O gênero *Citrus* pertence à subfamília Aurantioideae, considerada como a que apresenta maior número de características derivadas, ou seja, mais inovações genéticas, dentro da família Rutaceae (Da Silva *et al.*, 1988). Essa subfamília divide-se em duas tribos, Clauseneae e Citreae, reunindo 33 gêneros e cerca de 200 espécies (Swingle e Reece, 1967; Samuel *et al.*, 2001). Cada uma dessas tribos

está dividida em três subtribos no sistema adotado por Swingle e Reece, baseado em Engler (1931). Entretanto, na análise filogenética realizada por Samuel *et al.* (2001), essa diferenciação de subtribos não faz sentido e a distribuição dos gêneros entre as tribos foi profundamente modificada (ver também De Araújo *et al.*, 2003).

De uma maneira geral, a citologia dos demais gêneros de Aurantioideae é muito parecida com a do gênero *Citrus*. A estrutura do núcleo interfásico observada nas espécies de *Citrus*, caracterizada pela presença de cromocentros bem delineados em uma rede de cromatina muito difusa e fracamente corada, é igualmente observada nos demais gêneros da subfamília. Esse tipo de núcleo interfásico, denominado núcleo arreticulado, é raramente encontrado em outras espécies da família Rutaceae, sendo uma das características citológicas mais marcantes da subfamília Aurantioideae (Guerra, 1987).

Outra característica importante é a ocorrência do número cromossômico $2n = 18$ em quase todas as espécies da subfamília, exceto em *Paramignya monophylla* Wight, *Atalantia ceylanica* (Arn.) Oliv., *Clausena excavata* Burm. f. e *C. willdenowii* (= *C. dentata* Willd.), que são tetraplóides ($2n = 36$), e *Glycosmis citrifolia* (Willd.) Lindl. e *G. pentaphylla* (Retz.) Corrêa, que são hexaplóides ($2n = 54$) (Stace *et al.*, 1993; Guerra *et al.*, 2000). *Fortunella hindsii* (Champ.) Swingle apresenta formas naturais diplóides e tetraplóides (Longley, 1925; Miranda *et al.*, 1997c). A morfologia e o tamanho cromossômico dessas espécies, com cromossomos meta a submetacêntricos, variando de 1 a 4 μm de comprimento, também são semelhantes aos de *Citrus* (Ghosh, 1966; Agarwal, 1988; Miranda *et al.*, 1997a; Guerra *et al.*, 2000). Alterações meióticas, como a presença de pontes anafásicas registradas em cultivares de *Citrus*, são conhecidas em sete híbridos intergenéricos (Agarwal, 1987c), mas não em espécies de outros gêneros da subfamília, como em *Aegle*

marmelos Corrêa (Banerji & Pal, 1957), o que provavelmente se relaciona com a menor incidência de híbridos nesses outros gêneros.

O padrão de bandas CMA e a distribuição dos sítios de DNAr observado nas espécies de *Citrus* repete-se de forma semelhante em *Poncirus* Raf. e *Fortunella* Swingle (Miranda *et al.*, 1997a, 1997c; Roose *et al.*, 1998; Befu *et al.*, 2000; Brasileiro-Vidal *et al.*, 2007). Guerra *et al.* (2000), analisando o padrão de bandas CMA em 14 gêneros da subfamília Aurantioideae, incluindo representantes de cinco de suas seis subtribos, observaram que os gêneros mais próximos a *Citrus* (*Poncirus*, *Fortunella*, *Eremocitrus* Swingle e *Microcitrus* Swingle, todos da subtribo Citrinae) mostraram uma maior similaridade cariotípica entre si, enquanto os gêneros mais afastados apresentaram padrões mais diferenciados. As Figuras 1e e 1f ilustram dois casos extremos dessa variação.

Curiosamente, tanto os gêneros *Severinia* e *Atalantia* Corrêa, tidos como primitivos na subtribo Citrinae, quanto os gêneros mais primitivos de outras subtribos, como *Glycosmis* Corrêa, *Clausena* Burm. f. e *Swinglea*, apresentam pouca heterocromatina. Por outro lado, gêneros taxonomicamente distantes de *Citrus*, mas também com características morfológicas derivadas, como *Murraya paniculata* L. e *Merrillia caloxylon* Swingle, possuem padrões de bandas mais semelhantes aos observados em *Citrus*. Esses fatos sugerem a ocorrência de uma evolução cromossômica paralela em diferentes subtribos de Aurantioideae, ou que a classificação do grupo precisa ser amplamente revista (Guerra *et al.*, 2000).

A diferença no padrão de bandas entre espécies e gêneros diferentes pode também ser muito útil na identificação de híbridos diplóides e alopoliplóides, baseando-se no número de cromossomos bandeados e/ou na presença de cromossomos marcadores (Miranda *et al.*, 1997b). Por exemplo, no caso do híbrido

diplóide entre *C. sunki* (com oito pares cromossômicos com bandas) e *Severinia buxifolia* (três ou quatro pares com bandas), obtido por Medina-Filho *et al.* (1998), a confirmação da condição híbrida pode ser feita pelo número intermediário de cromossomos com bandas. Os híbridos tetraplóides entre *C. sunki* e *P. trifoliata* (sete pares cromossômicos com bandas, incluindo quatro cromossomos com duas bandas, ausentes em *C. sunki*), obtidos por Cristofamil *et al.* (1999), podem ser caracterizados na F1 e F2 pelo número de cromossomos com bandas e principalmente pela presença de cromossomos com duas bandas (compare os idiogramas de Guerra *et al.*, 2000 e Cornélio *et al.*, 2003). Esses marcadores são particularmente úteis para caracterizar os diferentes híbridos assimétricos e os aneuplóides gerados por fusão de protoplastos irradiados e por variação somaclonal (ver por exemplo, Miranda *et al.*, 1997b; Liu & Deng, 1999; Hao & Deng, 2003).

4. NOVAS ABORDAGENS

Recentemente, Fu *et al.* (2004) analisaram por hibridização genômica *in situ* (GISH) um híbrido somático de *C. aurantium* L. e *P. trifoliata* e demonstraram que é possível corar diferencialmente os cromossomos de *Citrus* e os de *P. trifoliata* presentes em um híbrido. Isso sugere que existem seqüências de DNA repetitivo disperso espalhados pelo genoma de *Citrus* que diferem substancialmente das seqüências dispersas em *Poncirus*. Com essa técnica, foi possível detectar a ocorrência de uma translocação cromossômica intergenômica neste híbrido. Esse tipo de análise abre uma nova perspectiva para o estudo de híbridos intergenéricos, principalmente em programas de introgressão de genes de espécies silvestres por retrocruzamentos (ver Brasileiro-Vidal & Guerra, 2002).

Uma outra abordagem citológica inovadora foi apresentada por Huang *et al.* (2004a,b). Esses autores microdissecaram o maior cromossomo de uma cultivar de *C. grandis*, amplificaram o seu DNA por PCR e construíram uma biblioteca de DNA cromossomo-específica. Eles utilizaram essa metodologia para posteriormente clonar e sequenciar análogos de genes de resistência em seis cromossomos dessa espécie. Entretanto, como esses cromossomos não foram caracterizados por bandeamento CMA ou por FISH, não foi possível associar essas marcas a um tipo cromossômico particular. Bibliotecas desse tipo têm também sido usadas em outros organismos para selecionar sondas que permitam corar diferencialmente um único par cromossômico e detectar translocações dentro de um genoma (ver Guerra, 2004). O uso de bibliotecas cromossomo-específicas, aliado à identificação precisa dos cromossomos e à construção de mapas genéticos detalhados certamente serão metodologias importantes para o seqüenciamento genômico dos *Citrus*.

Uma abordagem atualmente em desenvolvimento no laboratório de Citogenética Vegetal do Departamento de Botânica da UFPE consiste na localização, por FISH, de seqüências de DNA genômico clonadas em cromossomos artificiais de bactérias (BACs). Essas seqüências foram obtidas de uma biblioteca genômica de *P. trifoliata* e estão sendo hibridizadas nos cromossomos dessa espécie por FISH. O objetivo é construir um mapa físico composto por várias seqüências de DNA de cópia simples ou repetidas em tandem. Até o momento 24 BACs foram mapeados, permitindo a identificação de sete pares cromossômicos (Moraes, 2007). Esses BACs serão posteriormente hibridizados em outras espécies cítricas, visando estabelecer um mapa de homeologia cromossômica entre os principais representantes desse grupo. Marcas físicas desse tipo poderão ser utilizadas para a reunião dos *contigs* no seqüenciamento genômico dos *Citrus*,

atualmente em andamento. Paralelamente, mapas genéticos progressivamente mais densos vem sendo obtidos para *Citrus* e *Poncirus* (ver Ruiz & Asíns, 2003).

O isolamento e mapeamento físico de seqüências satélite tem sido uma abordagem atualmente bastante utilizada para caracterização cromossômica das espécies vegetais e para estudos de citogenética evolutiva (ver Vershinin *et al.*, 1996; Stevenson *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2006). Uma das primeiras seqüências satélite isolada de *Citrus* possuía 181pb, com 63% de pares de bases do tipo GC (Beridze *et al.*, 1992). Posteriormente, Fann *et al.* (2001) demonstraram que esta seqüência faz parte de uma das maiores famílias de DNA satélite presentes em *Citrus* e *Poncirus*, com grau de similaridade entre as espécies de 93 a 70% e conteúdo de GC variando de 60 a 68%.

Felice *et al.* (2004, 2007) isolaram duas seqüências satélite de *C. limon*, uma com 600 pb e outra com 300 pb e conteúdo de AT de 56% e 58%, respectivamente. Através da análise por hibridização em membrana, eles conseguiram demonstrar que este satélite foi conservado em outras espécies de *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella*. Uma outra seqüência satélite, isolada de *P. trifoliata*, possui 400 pb e 47% de conteúdo de AT (Felice *et al.* 2006). Essa seqüência também hibridizou em membrana com o DNA genômico de espécies de *Citrus* e *Fortunella*. O maior desafio agora é mapear citologicamente essas seqüências e avaliar o papel delas na evolução cromossômica dos *Citrus* e gêneros afins.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, P. K. Cytogenetical investigations in *Rutaceae*. I. Meiotic studies in four *Citrus* species of hybrid origin. **Cytologia**, Tokyo, v. 52, p. 753-756, 1987a.

AGARWAL, P. K. Cytogenetical investigations in *Rutaceae*. II. Meiotic studies in three intergeneric hybrids of *Citrus*. **Cytologia**, Tokyo, v. 52, p. 757-760, 1987b.

AGARWAL, P. K. Karyotype of *Citrus tamurana* (Tan.). **Chromosome Information Service**, Tokyo, v. 42, p. 3-5, 1987c.

AGARWAL, P. K. Cytology of *Atalantia ceylanica* (Arn.). **Current Science**, Bangalore, v. 57, p. 207-208, 1988.

BACCHI, O.; KRUG, C. A. Triploid varieties of *Citrus*. **Journal of Heredity**, Washington, v. 34, p. 277-283, 1943.

BANERJI, I. Morphological and cytological studies on *Citrus grandis* Osbeck. **Phytomorphology**, New Delhi, v. 4, p. 390-396, 1954.

BANERJI, I.; PAL, S. A note on the cytology and pollen of *Aegle marmelos*. **Phyton**, v. 8, p. 75-78, 1957.

BERIDZE, T.; TSIREKIDZE, N.; ROYTBERG, M. A. On the tertiary structure of satellite DNA. **Biochimie**, v. 74, p. 187-194, 1992.

BARRETT, H. Colchicine-induced polyploidy in *Citrus*. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 135, p. 29-34, 1974.

BARRETT, H. C.; RHODES, A. M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. **Taxon**, Vienna, v. 1, p. 105-122, 1976.

BARRETT, H. C.; HUTCHISON, D. J. Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of *Citrus*. **Economic Botany**, New York, v. 32, p. 21-45, 1978.

BEFU, M.; KITAJIMA, A.; HASEGAWA, K. Classification of the citrus chromosomes with same types of chromomycin A banding patterns. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Chikusa, v. 71, p. 394-400, 2002.

BEFU, M.; KITAJIMA, A.; LING, Y. X.; HASEGAWA, K. 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. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Chikusa, v. 69, p. 22-28, 2000.

BEFU, M.; KITAJIMA, A.; LING, Y. X.; HASEGAWA, K. Chromosome composition of some citrus species and cultivars based on the chromomycin A₃ (CMA) banding patterns. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Chikusa, v. 70, p. 83-88, 2001.

BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GUERRA, M. Citogenética molecular em cereais. In: Atualização de técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal. BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J. (Org.). Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p. 277-298.

BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; DOS SANTOS-SEREJO, J. A.; SOARES FILHO, W. S.; GUERRA, M. A simple chromosomal marker can reliably distinguishes *Poncirus* from *Citrus* species. **Genética**, The Hague, 2007.

CAMERON, J. W.; SOOST, R. K. Characters of new populations of *Citrus* polyploids, and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny. In: CHAPMAN, H. D. (Ed.). **Proceedings of the International Citrus Symposium**, 1., Riverside: University of California, 1969. v. 1, p. 199-205, 1969.

CAMERON, J. W.; BURNETT, R. H. Use of sexual tetraploid seed parents for production of triploid *Citrus* hybrid. **HortScience**, Alexandria, v. 13, p. 167-169, 1978.

CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, Lund, v. 136, p. 159-168, 2002.

CARVALHO, R.; FILHO, SOARES FILHO, W. S.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GUERRA, M. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 109, p. 276-282, 2005.

CAVALCANTE, H. C.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DORNELLES, A. C. Meiotic behaviour and pollen fertility in an open-pollinated population of 'Lee' mandarin [*Citrus clementina* x (*C. paradisi* x *C. tangerina*)]. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 86, p. 103-114, 2000.

CHANG, S. B.; DE JONG, H. Production of alien chromosome additions and their utility in plant genetics. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 109, p. 335-343, 2005.

CORNÉLIO, M. T. M. **Variabilidade cromossômica em cultivares poliembriônicos e monoembriônicos de *Citrus***. 1994. 100 f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

CORNÉLIO, M. T. M. N.; FIGUEIRÔA, A. R. S.; SANTOS, K. G. B.; SOARES FILHO, W. S.; GUERRA, M. Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 240, p.149-161, 2003.

CRISTOFAMIL, M.; MACHADO, M. A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of
Citrus sunki Hort ex. Tan. And *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. **Euphytica**, Wageningen, v. 109, p. 25-32, 1999.

DA SILVA, M. F. G. F.; GOTTLIEB, O. R.; EHRENDORFER, F. Chemosystematics of the *Rutaceae*: suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 161, p. 97-134, 1988.

DE ARAUJO, E. F.; DE QUEIROZ, L. P.; MACHADO, M. A. What is Citrus? Taxonomic implications from a study of cp-DNA evolution in the tribe Citreae (Rutaceae subfamily Aurantioideae). **Organisms Diversity & Evolution**, Jena, v. 3, p. 55-62, 2003.

ENGLER, A. Rutaceae. In: ENGLER, A.; PRANTL, K., eds. Die natürlichen Pflanzenfamilien. 2. ed. Aufl. 19a Leipzig: Engelmann 1931. p. 187-359.

ESEN, A.; SOOST, R. K. Seed development in *Citrus* with special reference to 2X x 4X crosses. **American Journal of Botany**, New York, v. 60, p. 448-462, 1973.

ESEN, A.; SOOST, R. K. Unexpected triploids in *Citrus*. Their origin, identification, and possible use. **Journal of Heredity**, Washington, v. 62, p. 329-333, 1971.

ESEN, A.; SOOST, R. K.; GERACI, G. Genetic evidence for the origin of diploid megagametophytes in *Citrus*. **Journal of Heredity**, Washington, v. 70, p. 5-8, 1979.

FANN, J. Y.; KOVARIK, A.; HEMLEBEN, V.; TSIREKIDZE, N. I.; BERIDZE, T. G. Molecular and structural evolution of *Citrus* satellite DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 103, p. 1068-1073, 2001.

FLUMINHAN, A.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. de.; SANTOS, J. A. dos. Evidence for heterochromatin involvement in chromosome breakage in maize callus culture. **Annals of Botany**, Oxford, v. 78, p. 73-81, 1996.

FELICE, B.; WILSON, R. R.; CIARMIELLO, L.; CONICELLA, C. A. novel repetitive DNA sequence in lemon [*Citrus limon* (L.) Burm.] and related species. **Journal of Applied Genetics**. Poznań. V. 35, p. 315-320, 2004.

FELICE, B.; WILSON, R. R.; CIARMIELLO, L.; SCARANO, M. T.; FERRANTE, S. Characterization of a novel satellite DNA sequence from flying dragon (*Poncirus trifoliata*). **Genética**, The Hague, v. 127, p. 45-53, 2006.

FELICE, B.; CIARMIELLO, L.; WILSON, R. R.; CONICELLA, C. Molecular analysis of a novel tandemly organized repetitive DNA sequence in *Citrus limon* (L.). Burm. **Journal of Applied Genetics**. Poznań, V. 48, p. 233–239, 2007.

FROST, H. B. The chromosomes of *Citrus*. **Journal of the Washington Academy of Sciences**, Washington-DC, v. 15, p. 1-3, 1925a.

FROST, H. B. Tetraploidy in *Citrus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 11, p. 535-537, 1925b.

FU, C. H.; CHEN, C. L.; GUO, W. W.; DENG, X. X. GISH, AFLP and PCR-RFLP analysis of an intergeneric somatic hybrid combining Goutou sour orange and *Poncirus trifoliata*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, p. 391-396, 2004.

GHOSH, R. B. A. contribution to the karyotypic study in *Glycosmis pentaphylla* Corr. **Beitrag zur Biologie der Pflanzen**, Breslau, v. 42, p. 139-143, 1966.

GMITTER JUNIOR, F. G.; LING, X. B.; DENG, X. X. Induction of triploid *Citrus* plants from endosperm calli *in vitro*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 80, p. 785-790, 1990.

GUERRA, M. Cytogenetics of Rutaceae. II. Nuclear DNA content. **Caryologia**, Firenze, v. 37, p. 219-226, 1984.

GUERRA, M. Cytogenetics of *Rutaceae*. III. Heterochromatin patterns. **Caryologia**, Firenze, v. 38, p. 335-346, 1985.

GUERRA, M. Cytogenetics of *Rutaceae*. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. **Heredity**, Oxford, v. 71, p. 234-241, 1993.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, 2000.

GUERRA, M. Hibridização *in situ*: princípios básicos. In: GUERRA, M. (Org.) **FISH – Conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. p. 1-32.

GUERRA, M.; PEDROSA, A.; SILVA, A. E. B.; CORNÉLIO, M. T. M.; SANTOS, K.; SOARES FILHO, W. dos S. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germplasm bank. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, p. 489-496, 1997.

GUERRA, M.; SANTOS, K. G. B.; SILVA, A. E. B.; EHRENDORFER, F. Heterochromatin banding patterns in *Rutaceae-Aurantioideae* - A case of parallel chromosomal evolution. **American Journal of Botany**, New York, v. 5, p. 735-747, 2000.

GUPTA, P. K.; TSUCHIYA, T. **Chromosome engineering in plants: Genetics, Breeding, Evolution**, part A. Amsterdam: Elsevier, 1991. 639 p.

HAO, Y.-J.; DENG, X.-X. Single-cell-derived sibling lines are established as an experimental system to assess chromosome number variations in embryogenic callus cultures of sweet orange. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 73, p. 275-280, 2003.

HUANG, D.; WU, W.; LU, L. Microdissection and molecular manipulation of single chromosomes in woody fruit trees with small chromosomes using pomelo (*Citrus grandis*) as a model. II. Cloning of resistance gene analogs from single chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108, p. 1371-1377, 2004a.

HUANG, D.; WU, W.; ZHOU, Y.; HU, Z.; LU, L. Microdissection and molecular manipulation of single chromosomes in woody fruit trees with small chromosomes using pomelo (*Citrus grandis*) as a model. I. Construcion of single chromosomal DNA libraries. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 108, p. 1366-1370, 2004b.

ITO, Y.; OMURA, M.; NESUME, H. Improvement of chromosome observation methods for Citrus. In: HAYASHI, T., OMURA, M.; SCOTT, N. S. (Ed.). **Techniques on gene diagnosis and breeding**. Tsukuba: FTRS, 1993. p. 31-38.

IWAMASA, M.; NITO, N. Cytogenetics and the evolution of modern cultivated *Citrus*. **Proceedings of the International Citrus Congress**, 6, 1988, Weikersheim: Margraf Scientific Books, 1988. p. 265-275.

LEE, L. S. *Citrus* polyploid origin and potential for cultivar improvement. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 39, p. 735-747, 1988.

LIANG, G. Studies on the Giemsa C-banding patterns of some *Citrus* and its related genera. **Acta Genetica Sinica**, Peking, v. 15, p. 409-415, 1988.

LIM, K. Y.; KOVARIK, A.; MATYASEK, R.; CHASE, M. W.; KNAPP, S.; MCCARTHY, E.; CLARKSON, J. J.; LEITCH, A. R. Comparative genomics and repetitive sequence divergence in the species of diploid *Nicotiana* section *Alatae*. **The Plant Journal**, v. 48, p. 907-919, 2006.

LIU, J.; DENG, X. Productin of hybrid calluses va donor-recipient fusion between *Microcitrus papuana* and *Citrus sinensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 59, p. 81-87, 1999.

LONGLEY, A. E. Polycarpy, polyspory and polyploidy in *Citrus* and *Citrus* relatives. **Journal of the Washington Academy of Sciences**, Washington-DC, v. 15, p. 347-351, 1925.

MATSUYAMA, T.; AKIHAMA, T.; ITO, Y.; OMURA, M.; FUKUI, K. Characterization of heterochromatic regions in 'Trovita' orange (*Citrus sinensis* Osbeck) chromosomes by the fluorescent staining and FISH method. **Genome**, Ottawa, v. 39, p. 941-945, 1996.

MATSUYAMA, T.; AKIHAMA, T.; ITO, Y.; OMURA, M.; FUKUI, K. Distribution of TGG repeat-related sequences in 'Trovita' orange (*Citrus sinensis* Osbeck) chromosomes. **Genome**, Ottawa, v. 42, p. 1251-1254, 1999.

MEDINA-FILHO, H. P.; BORDIGNON, R.; BALLVÉ, R. M. L. Sunkifollias and Buxisunkis: Sexually obtained reciprocal hybrids of *Citrus sunki* x *Severinia buxifolia*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, p. 129-133, 1998.

MELO, N. F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, Oxford, v. 92, p. 309-316, 2003.

MIRANDA, M.; IKEDA, F.; ENDO, T.; MORIGUCHI, T.; OMURA, M. Comparative analysis on the distribution of heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* chromosomes. **Chromosome Research**, Leicester, v. 5, p. 86-92, 1997a.

MIRANDA, M.; IKEDA, F.; ENDO, T.; MORIGUCHI, T.; OMURA, M. Chromosome markers and alterations in mitotic cells from interspecific *Citrus* somatic hybrids analysed by fluorochrome staining. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 807-812, 1997b.

MIRANDA, M.; IKEDA, F.; ENDO, T.; MORIGUCHI, T.; OMURA, M. rDNA sites and heterochromatin in meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia* Swing.) chromosomes

revealed by FISH and CMA/DAPI staining. **Caryologia**, Firenze, v. 50, p. 333-340, 1997c.

MOORE, G. A. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 17, p. 536-540, 2001.

MORAES, A. P. **Utilização de marcadores cito-moleculares na identificação de cromossomos mitóticos em *Citrus* e *Poncirus***. 2007. 143 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MORAES, A. P.; SOARES-FILHO, W. S; GUERRA M. Karyotype diversity and the origin of grapefruit. **Chromosome Research**, Leicester, v. 15, p.115-121,2007.

MOSCOSO, C. G.; SHAMBULINGAPPA, K. G. Cytological studies on chironja. **Journal of Agriculture**, Melbourne, v. 56, p. 426-431, 1972.

NAITHANI, S. P.; RAGHUVANSHI, S. S. A preliminary meiotic study in *Citrus assamensis* - a structural hybrid. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 45, p. 95, 1958a.

NAITHANI, S. P.; RAGHUVANSHI, S. S. Cytogenetical studies in the genus *Citrus*. **Nature**, London, v. 181, p. 1406-1407, 1958b.

NAITHANI, S. P.; RAGHUVANSHI, S. S. Cytogenetical studies in *Citrus*. Parte I. **Genetica**, The Hague, v. 33, p. 301-312, 1963.

OHRI, D.; KUMAR, A. Nuclear DNA amounts in some tropical hardwoods. **Caryologia**, Firenze, v. 39, p. 303-307, 1986.

OIYAMA, I.; OKUDAI, N.; TAJAHARA, T. Ploidy levels of seedlings obtained from 2X x 4X crosses in *Citrus*. In: MATSUMOTO, K. (Ed.). **Proceedings of the International Society of Citriculture**. Tsukuba: FTRS, 1981. v. I, p. 32-34.

OLLITRAULT, P.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Application of flow cytometry for *Citrus* genetics and breeding. **Proceedings of the International Society of Citriculture** Catania: MSC Congress, 1994. p. 93-198.

OPPENHEIM, J. D.; FRANKEL, O. H. Investigations into the fertilization of the "Jaffa-Orange". **Genetica**, The Hague, v. 11, p. 369-374, 1929.

PEDROSA, A.; GUERRA, M.; SOARES FILHO, W. dos S. An hierarchy of activation of nucleolar organizer regions in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Cytobios**, Cambridge, v. 92, p. 43-51, 1997.

PEDROSA, A.; VALLEJOS, C. E.; BACHMAIR, A.; SCHWEIZER, D. Integration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) linkage and chromosomal maps. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, p. 205-212, 2003.

PEDROSA, A.; SCHWEIZER, D.; GUERRA, M. Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, p. 361-367. 2000.

PEDROSA-HARAND, A., ALMEIDA, C. C. S.; MOSIOLECK, M.; BLAIR, M. W.; SCHWEIZER, D.; GUERRA, M. Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris*) evolution. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 2006.

PUERTAS, M. J.; NARANJO, T. (Ed) **Plant cytogenetics**. Basel: Karger, 2005. 408p.

RAGHUVANSHI, S. S. Cytogenetical studies in genus *Citrus*. IV. Evolution in genus *Citrus*. **Cytologia**, Tokyo, v. 27, p. 172-188, 1962b.

RAGHUVANSHI, S. S. Cytogenetical studies in genus *Citrus*: *Citrus assamensis*. **Caryologia**, Firenze, v. 15, p. 143-149, 1962a.

ROOSE, M. L.; SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J. S. 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. **Journal of Heredity**, Washington, D.C., v. 89, p. 83-86, 1998.

RUIZ, C.; ASINS, M. J. Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, p. 826-836, 2003.

SAMUEL, R.; EHRENDORFER, F.; CHASE, M. W.; GREGER, H. Phylogenetic analysis of Aurantioideae (Rutaceae) based on non-coding plastid DNA sequences and phytochemical features. **Plant Biology**, New York, v. 3, p.77-87, 2001.

SELLITO-BOAVENTURA, Y. M.; PIO, R. M. Análise citogenética em três cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 12, p. 117-126, 1989.

SHARMA, A. K.; BAL, A. K. Chromosome studies in *Citrus*. I. **Agronomia Lusitana**, Oeiras, v. 19, p. 101-126, 1957.

SOOST, R. K.; CAMERON, J. W. 'Oroblanco', a triploid pummelo-grapefruit hybrid. **HortScience**, Alexandria, v. 15, p. 667-669, 1980.

SOOST, R. K.; CAMERON, J. W. 'Melogold', a triploid pummelo-grapefruit hybrid. **HortScience**, Alexandria, v. 20, p. 1134-1135, 1985.

STACE, H. M.; ARMSTRONG, J. A.; JAMES, S. H. Cytoevolutionary patterns in Rutaceae. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 187, p. 1-28, 1993.

STARRANTINO, A.; RECUPERO, G. F. *Citrus* hybrids obtained in vitro from 2x females X 4x males. **Proceedings of the Nternational Society Of Citriculture Congress**, 1, 1981, Tsukuba: FTRS, 1981, p. 31-32.

STEVENSON, M., ARMSTRONG, S. J.; JONES, G. H.; FORD-LLOYD, V. Distribution of a 375 bp repeat sequence in *Allium* (*Alliaceae*) as revealed by FISH. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 217, p. 31-42, 1999.

SWINGLE, W. T.; Reece P. C. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). The citrus industry. Berkeley: University of California, 1967. v. 1, cap. 3, p. 190-430.

SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. 469 p.

TSUCHIYA, T.; GUPTA, P. K. **Chromosome engineering in plants: Genetics, breeding, evolution**, part B. Amsterdam: Elsevier, 1991. 639 p.

VAIO, M.; SPERANZA, P.; VALLS, J. F.; GUERRA, M.; MAZZELLA, C. Localization of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of the Quadrifaria group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, p. 191-200, 2005.

VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P. Gene-controlled meiosis in *Citrus reticulata*. **Proceedings of the International Society Of Citriculture Congress**, Tsukuba: FTRS, 1981, p. 26-27.

VERSHININ, A. V.; ALKHIMOVA E. G.; HESLOP-HARRISON. Molecular diversification of tandemly organized DNA sequences and heterochromatic chromosome regions in some Triticeae species. **Chromosome Research**, Leicester, v. 4, p 517-525, 1996

WAKANA, A.; IWAMASA, M.; UEMOTO, S. Seed development in relation to ploidy of zygotic embryo and endosperm in polyembryonic *Citrus*. **Proceedings of the International Society of Citriculture Congress**, 1., 1981, Tsukuba: FTRS, 1981, p. 35-39.

WEI, W.; CHENG, Y.; DUAN, Y. Studies on the evolution of *Citrus* based on karyotype and C-banding patterns. **Acta Horticulturae Sinica**, Beijing, v. 15, p. 223-228, 1988.

WU, J.; FERGUSON, A. R.; MOONEY, P. A. Allotetraploid hybrids produced by protoplast fusion for seedless triploid *Citrus* breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 141, p. 229-235, 2005.

YAMAMOTO, M.; TOMINAGA, S. High chromosomal variability of mandarins (*Citrus* ssp.) revealed by CMA banding. **Euphytica**, Wageningen, v. 129, p. 267-274, 2003.

YAMAMOTO, M.; TOMINAGA, S. Chromosome identification in haploid clementine (*Citrus clementina* Hort. ex Tanaka) by fluorescent staining. **Science Horticulturae**, Amsterdam, v. 101, p. 201-206, 2004a.

YAMAMOTO, M.; TOMINAGA, S. CMA banding pattern of chromosomes is useful for the identification of chromosome doubling in haploid citrus. **Breeding Science**, Tsukuba, v. 54, p. 351-354, 2004b.

YAMAMOTO, M.; ABKENAR, A. A.; MATSUMOTO, M.; NESUMI, H.; YOSHIDA, T.; KUNIGA, T.; KUBO, T.; TOMINAGA, S. CMA banding patterns of chromosomes in major citrus species. . **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Chikusa, v. 76, p. 36-40, 2007.

YANG, X.; KITAJIMA, A.; HASEGAWA, K. Chromosome pairing set and the presence of unreduced gametes explain the possible origin of polyploid progenies from the diploids 'Tosa-Buntan' x 'Suisho-Buntan' pummelo. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Chikusa. v. 71, p. 538-543, 2002.

FIGURAS

FIGURA 1. Cromossomos de *Citrus* e gêneros próximos: a) metáfase de *Citrus depressa* Hay. mostrando a pequena variação de tamanho e morfologia cromossômica; b) prófase de *C. sunki* hort. ex Tan. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., destacando-se a presença de diversos blocos heteropicnóticos; c) e d) metáfase de um acesso heterozigoto de *C. grandis* (L.) Osb. corada com DAPI (c) e com CMA (d). Observe que as regiões mais brilhantes com o CMA aparecem negativas com o DAPI. Os triângulos vazios apontam o maior bloco de heterocromatina telomérica do par cromossômico I, visto com DAPI (c) e com CMA (d); e) metáfase de *Clausena lansium* (Lour.) Skeels; f) metáfase de *Murraya paniculata* (L.) Jack; (a) e (b) coradas convencionalmente com Giemsa; (e) e (f) coradas com CMA. Fotos: a, b, originais; c, d, reproduzidas de Guerra (1993); e, f, reproduzidas de Guerra *et al.* (2000).

FIGURA 2. Tipos cromossômicos encontrados nos cariótipos de espécies cítricas após coloração com o fluorocromo CMA (de acordo com Carvalho *et al.*, 2005).

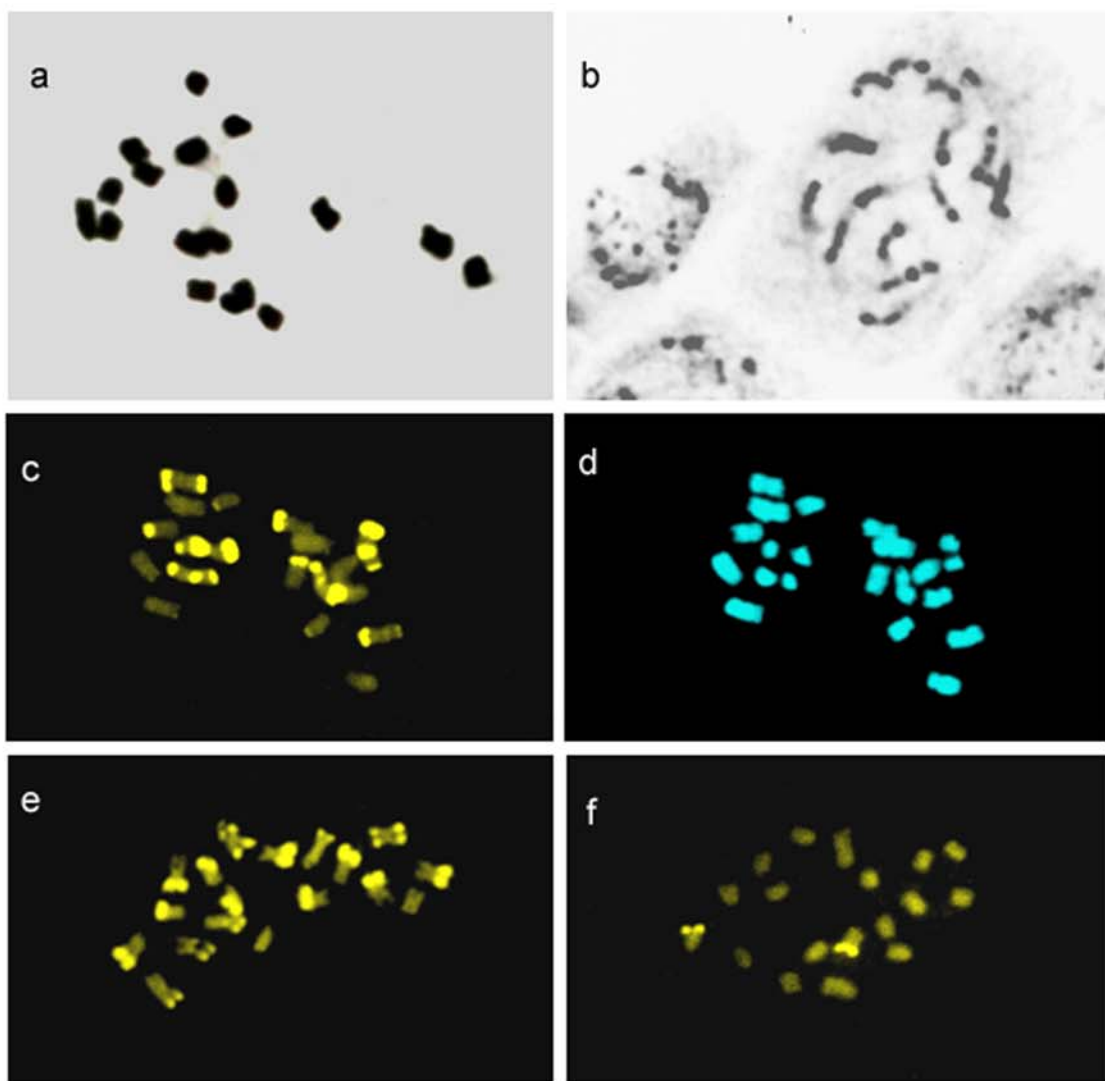


FIGURA 1

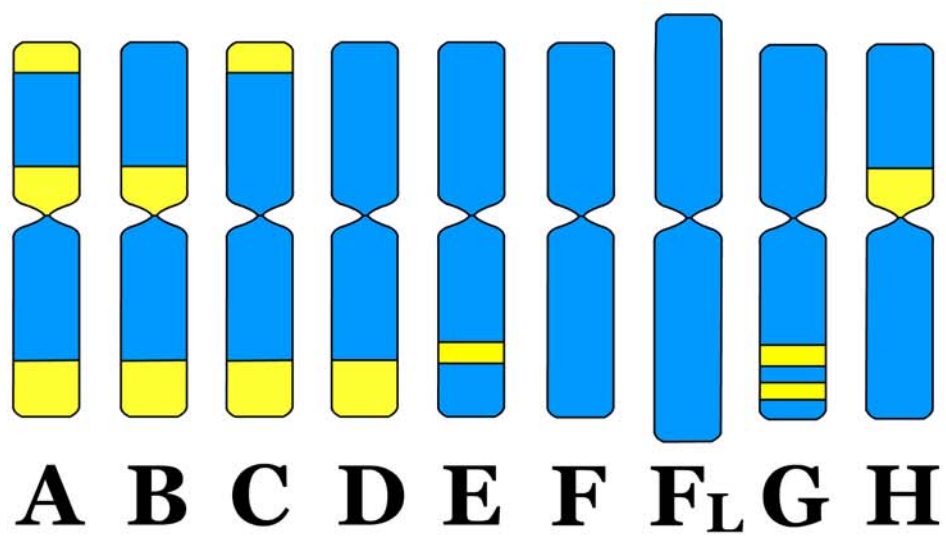


FIGURA 2

Capítulo II

Citogenética molecular: uma abordagem alternativa para a taxonomia dos *Citrus*
L. (Rutaceae)

Capítulo de livro a ser publicado pela Sociedade Botânica do Brasil

CITOGENÉTICA MOLECULAR: UMA ABORDAGEM ALTERNATIVA PARA A TAXONOMIA DOS *CITRUS* L. (RUTACEAE)

ANA EMILIA BARROS E SILVA¹, ANA PAULA MORAES¹ E MARCELO GUERRA¹

O problema taxonômico

O gênero *Citrus* L. (Rutaceae) é um exemplo clássico da dificuldade muitas vezes encontrada em estabelecer o número de espécies de um táxon. As duas principais revisões taxonômicas para o gênero divergem amplamente quanto ao número de espécies. Walter T. Swingle dividiu o gênero nos subgêneros *Citrus*, com 10 espécies, e *Papeda* com seis, enquanto o taxonomista T. Tanaka, discípulo de Swingle, propôs os subgêneros *Archicitrus*, com 109 espécies, e *Metacitrus*, com 48 espécies (revisado por Swingle & Reece 1967). A maioria dos taxonomistas aceita a divisão de Swingle, enquanto os melhoristas, que são os principais “usuários” desse grupo, utilizam essencialmente o sistema de Tanaka, por separar melhor os tipos morfológicos. Com base na anatomia das pétalas e sépalas, é muito clara a relação entre as espécies de *Papeda* e os gêneros mais próximos, como *Fortunella* e *Poncirus*, enquanto o subgênero *Citrus* aparece como um grupo com características derivadas. Dados isoenzimáticos, bioquímicos e moleculares têm sugerido que apenas três espécies seriam verdadeiras: *C. medica* L. (cidra), *C. maxima* (Burm.) Merr. (toranja) e *C. reticulata* Blanco (tangerina). Entretanto, as diversas árvores filogenéticas geradas por essas análises, com base principalmente em diferentes marcadores moleculares, não são muito congruentes (ver, por exemplo, Nicolosi *et al.* 2000; Araújo *et al.* 2003).

A origem deste problema se deve principalmente ao fato de que praticamente todas as espécies de *Citrus* são capazes de se cruzarem entre si e com espécies de alguns gêneros próximos e de produzirem descendência fértil. Por outro lado, a maioria dessas espécies apresenta embrionia nucelar, gerando clones que se propagam por sementes, contribuindo para formar as morfoespécies de Tanaka. Além disso, a longa história de cultivo dos citros (mais de 4.000 anos) levou ao cruzamento e seleção de alguns tipos cuja origem foi perdida do registro histórico. A manutenção até hoje desses diferentes sistemas serviu também para aumentar a confusão na literatura, uma vez que nem sempre é evidente se uma análise feita com *C. reticulata*, por exemplo, está se referindo à espécie conceituada por Tanaka, ou àquela conceituada por Swingle, que engloba 36 espécies de Tanaka.

A análise citogenética com CMA/DAPI

A citotaxonomia dos citros parecia de início pouco promissora porque quase todas as espécies de *Citrus* e dos demais gêneros da subfamília Aurantioideae (Rutaceae) possuem $2n=18$, com cromossomos pequenos e similares (Guerra *et al.* 2000). Entretanto, com o uso dos fluorocromos cromomicina A₃ (CMA), que cora preferencialmente as regiões ricas em GC, e o 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que se liga diferencialmente ao DNA rico em AT, tem sido possível diferenciar o cariótipo de quase todos os mais de 100 acessos analisados até o momento, incluindo 14 gêneros relacionados a *Citrus* (ver Guerra *et al.* 2000, Moraes *et al.* 2007, Yamamoto *et al.* 2007). Os cromossomos dos citros possuem seqüências de DNA satélite ricas em GC, as quais, quando coradas simultaneamente com CMA e DAPI, formam blocos de heterocromatina brilhantes com CMA e apagadas com DAPI, denominadas bandas CMA⁺. Dependendo da distribuição desses blocos, os cromossomos podem ser reconhecidos como tipos diferentes. Por exemplo, a tangerina *C. deliciosa* possui um par de cromossomos do tipo C, caracterizado por ter uma banda em cada região terminal, cinco pares do tipo D, com uma só banda terminal, e três pares do tipo F, sem bandas. Outros acessos apresentaram combinações diferentes de tipos cromossômicos (FIG. 1).

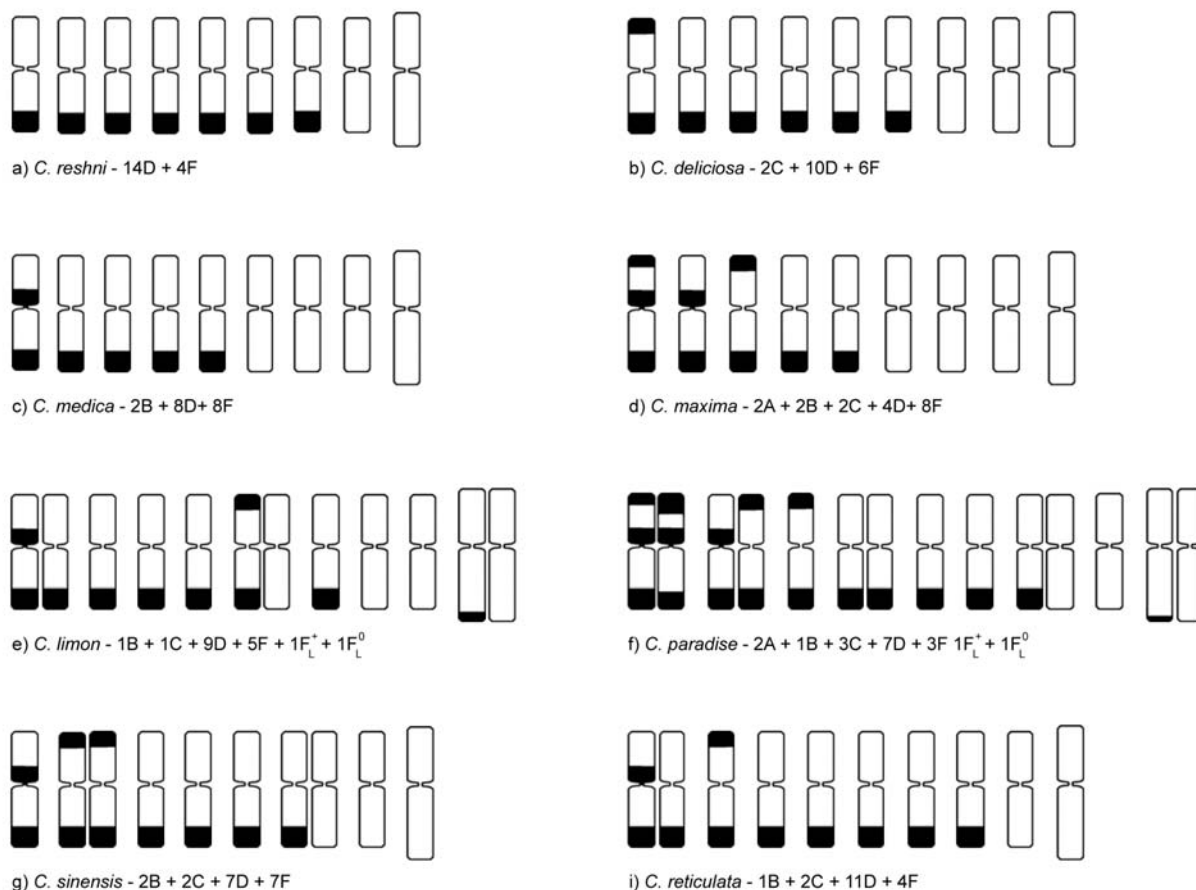


Figura 1. Fórmula cariotípica de algumas espécies de *Citrus* mostrando cariótipos homomórficos (a-d) e heteromórficos (e-h). Nesses idiogramas é mostrada apenas a distribuição das bandas nos cromossomos, não respeitando a variação de tamanho cromossômico e a posição do centrômero. Blocos em negrito representam a heterocromatina CMA⁺.

A análise de espécies silvestres de outros gêneros da subfamília revelou a presença de pares cromossômicos homomórficos (do mesmo tipo ou muito semelhantes) enquanto a maioria das espécies de *Citrus* apresentou pares heteromórficos, sugerindo que esse heteromorfismo se deve à natureza híbrida dessas espécies. Das três espécies de *Citrus* admitidas por vários autores como verdadeiras, apenas *C. maxima* e *C. medica* mostraram-se inteiramente homozigotas, corroborando a hipótese de que essas sejam espécies puras (Carvalho *et al.* 2005, Moraes *et al.* 2007). A terceira espécie admitida como pura, *C. reticulata*, compreende um grande número de acessos distintos, interpretados por Tanaka como espécies diferentes. A análise de várias espécies de Tanaka incluídas em *C. reticulata* por Swingle, mostrou que ao menos três dessas (*C. deliciosa* Tem., *C. reshni* Hort. ex Tan. e *C. sunki* Hort. ex Tan.) são também homozigotas (Cornélio *et al.* 2003), enquanto todos os demais acessos

investigados foram heteromórficos e supostamente híbridos. A FIG. 1 mostra o idiograma de algumas espécies homozigotas e outras heterozigotas. A suposição de que os cariótipos heterozigotos são de origem híbrida está também baseada no fato de que todos os híbridos sintéticos investigados foram heterozigóticos. Admitindo-se que essa hipótese seja verdadeira, devem existir pelo menos cinco espécies puras, apenas no subgênero *Citrus*, enquanto a grande maioria dos acessos de *Citrus* seria de origem híbrida, incluindo algumas das “espécies” mais conhecidas, como *C. sinensis* Osbeck (laranja-doce), *C. limon* L. (Burm.) f. (limão) e *C. aurantium* L. (laranja-azeda).

A distribuição dos genes ribossomais 5S e 45S

Uma outra maneira de comparar os cromossomos dos diversos acessos de *Citrus* é por hibridização fluorescente *in situ* (FISH), utilizando sondas de DNAr 5S e 45S que permitem localizar a posição desses genes em diferentes espécies. Embora o número de marcas no cariótipo das espécies de *Citrus* seja pequeno, ele é suficiente para confirmar a mesma conclusão obtida com a coloração CMA/DAPI: apenas os cinco acessos homozigotos para as bandas CMA⁺ são homozigotos para a posição dos sítios de DNAr 5S e 45S (Carvalho *et al.* 2005, Moraes *et al.* 2007, no prelo). Como as seqüências de DNA das bandas CMA⁺ têm evolução independente das seqüências dos genes ribossomais é muito significativo o fato de que ambas as seqüências repetitivas levem à mesma conclusão. Curiosamente, a distribuição dos sítios de DNAr é a mesma nas três espécies homozigotas de tangerinas (*C. deliciosa*, *C. reshni* e *C. sunki*), sugerindo uma maior similaridade entre essas espécies, indicada também por características do fruto e distribuição geográfica.

Um aspecto curioso na distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S é que, em algumas espécies de *Citrus*, esses dois tipos de genes ribossomais foram encontrados no mesmo cromossomo, bem próximos um do outro, e em outras espécies foram encontrados separados, em cromossomos diferentes. Entretanto, quando esses sítios foram analisados em *Poncirus trifoliata*, foi observado que eles ocorrem em três pares cromossômicos, sempre com o loco do RNAr 5S adjacente ao loco do RNAr 45S (Brasileiro-Vidal *et al.* 2007). Uma análise desses sítios em 10 representantes de outros gêneros da subfamília mostrou que a condição “locos adjacentes” é uma sinapomorfia da subfamília. Em apenas três destas espécies essa sinapomorfia foi parcialmente desfeita, conservando um par de sítios adjacentes e um ou dois sítios isolados, provavelmente surgidos por deleção do loco adjacente (Barros e Silva, 2007). Entretanto, em *C. maxima* e *C. medica* esses dois locos se encontram completamente separados, sugerindo mais uma vez a condição derivada das espécies do subgênero *Citrus*.

Novas marcas citomoleculares

Duas novas abordagens estão sendo atualmente conduzidas para complementar o estudo da citotaxonomia e evolução cromossômica nos *Citrus* e gêneros relacionados. Uma primeira abordagem consiste na localização de seqüências de DNA de cópia única em cada um dos cromossomos de uma espécie, um tipo de etiquetagem molecular de cada cromossomo. Uma vez obtidas, é possível hibridizá-las *in situ* em outras espécies de *Citrus* e de outros gêneros e, com isso, estabelecer a homeologia molecular dos cromossomos, localizando com precisão possíveis rearranjos, como inversões e translocações. O problema inicial é a seleção de seqüências de cópia única que permitam localizar um único par de sítios no complemento cromossômico. Isso foi feito utilizando uma biblioteca de BACs construída a partir do DNA genômico de *P. trifoliata* (Moraes 2007). Essas seqüências de cópia única têm em geral uma chance maior de serem conservadas entre espécies e entre gêneros que as seqüências repetitivas não-codificantes. Os resultados iniciais mostraram que várias seqüências hibridizadas em *Poncirus* hibridizam também em *C. medica*, revelando os grupos de homeologia em *Citrus-Poncirus*.

Uma segunda abordagem utiliza seqüências de DNA satélite conhecidas em *Citrus*. Embora as espécies de *Citrus* possuam um genoma pequeno, mais de 20% do seu genoma é formado por DNA satélite (Fann *et al.* 2001). A hibridização de uma única seqüência satélite de *Citrus*, extraída por PCR de *C. sinensis*, revelou que todos os blocos CMA⁺ dessa e de duas outras espécies analisadas, exceto aqueles formados pelo DNAr 45S, são formados pela mesma seqüência satélite ou por uma seqüência muito parecida. A mesma seqüência satélite hibridizou também nas bandas CMA⁺ dos cromossomos de *Poncirus*, confirmando a proximidade filogenética entre esses gêneros. Por outro lado, essa seqüência hibridizou em quase todas as bandas de *Fortunella*, um gênero muito próximo de *Citrus*, e não hibridizou com nenhuma de *Murraya*, um gênero incluído por Swingle e Reece (1967) na tribo Clauseneae. A observação de que *Murraya paniculata* tem um padrão de bandas muito semelhante ao das plantas cítricas, parece confirmar a hipótese de que diferentes linhagens evolutivas da subfamília Aurantioideae desenvolveram paralelamente padrões de bandas CMA⁺ muito semelhantes (Guerra *et al.* 2000). Esses dados chamam a atenção para o fato de que padrões de bandas heterocromáticas similares podem ser indicativos da homeologia cromossômica apenas entre espécies muito próximas, como entre as espécies de *Citrus*. Em grupos mais distantes, como *Citrus* e *Murraya*, mesmo quando ocorrem padrões de bandas semelhantes, a unidade de repetição do DNA satélite pode ser diferente e a homeologia entre essas bandas teria que ser demonstrada. A análise do mapeamento de um maior número de seqüências de cópia única e DNA satélite deverão contribuir para um maior entendimento da filogenia do grupo e constituir um modelo interessante de evolução cariotípica em plantas tropicais.

Referências bibliográficas

- ARAUJO EF. DE, QUEIROZ LP DE, MACHADO MA (2003) What is *Citrus*? Taxonomic implications from a study of cp-DNA evolution in the tribe Citreae (Rutaceae subfamily Aurantioideae). **Organisms Diversity & Evolution**, 3: 55-62.
- BARROS E SILVA AE (2007) Evolução do DNA satélite na subfamília Aurantioideae (Rutaceae). Tese de doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- BRASILEIRO-VIDAL AC, DOS SANTOS-SEREJO JA, SOARES FILHO WS, GUERRA M (2007) A simple chromosomal marker can reliably distinguishes *Poncirus* from *Citrus* species. **Genética**, 129: 273-279.
- CARVALHO R, SOARES FILHO WS, BRASILEIRO-VIDAL AC, GUERRA M (2005) The relationship among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. **Cytogenetic and Genome Research**, 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 Systematics and Evolution**, 240: 149-161.
- GUERRA M, SANTOS KG, BARROS E SILVA, AE, EHRENDORFER F (2000) Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae - A case of parallel chromosomal evolution. **American Journal of Botany**, 87: 735-747.
- FANN JY, KOVARIK A, HEMLEBEN V, TSIREKIDZE NI, BERIDZE, TG (2001) Molecular and structural evolution of *Citrus* satellite DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, 103: 1068-1073.
- MORAES AP. **Utilização de marcadores cito-moleculares na identificação de cromossomos mitóticos em *Citrus* e *Poncirus***. 2007. 143 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- MORAES AP, LEMOS RR, BRASILEIRO-VIDAL AC, SOARES FILHO WS, GUERRA M (no prelo) Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrids accessions of mandarin. **Cytogenetic and Genome Research**.
- MORAES AP, SOARES FILHO WS, GUERRA M (2007) Karyotype diversity and the origin of grapefruit. **Chromosome Research**, 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. **Theoretical and Applied Genetics**, 100: 1155-1166.
- 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.
- YAMAMOTO M, ABKENAR AA, MATSUMOTO R (2007) CMA banding patterns of chromosomes in major *Citrus* species. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, 76: 36-40.

Capítulo III

Conservação da ligação dos sítios de DNAr 5S e 45S em representantes da
subfamília Aurantioideae (Rutaceae)

Artigo a ser submetido à revista *Chromosome Research*

Conservação da ligação dos sítios de DNAr 5S e 45S em representantes da subfamília Aurantioideae (Rutaceae)

Ana Emília Barros e Silva¹, Walter dos Santos Soares Filho² & Marcelo Guerra^{1*}

¹*Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-420 Recife, PE, Brasil; Tel.: +55-81-21268846; Fax: +55-81-21268348; E-mail: msfguerra@hotmail.com; EMBRAPA Mandioca e Frutas Tropicais, Cruz das Almas, Brasil.*

^{*}*Correspondência*

Título corrido: Conservação do padrão de ligação dos sítios de DNAr 5S e 45S na representantes subfamília Aurantioideae (Rutaceae)

Resumo

Em várias espécies de *Citrus* (Aurantioideae, Rutaceae), os sítios de DNAr 5S e 45S ocorrem separadamente, em cromossomos distintos. Por outro lado em *Poncirus trifolia*, um gênero proximamente relacionado à *Citrus*, esses sítios ocorrem intimamente associados. No presente trabalho, foi realizada uma análise do padrão de distribuição cromossômica dos sítios de DNAr 5S e 45S, através da hibridização fluorescente *in situ* (FISH), em representantes das duas tribos de Aurantioideae, visando compreender a evolução desses sítios dentro da subfamília. Foram analisadas três espécies de Clauseneae (*Bergera koenigii*, *Clausena excavata*, e *Glycosmis pentaphylla*), e sete de Citreae (*Atalantia monophylla*, *Citrus hystrix*, *Fortunella obovata*, *Merrillia caloxylon*, *Murraya paniculata*, *Severinia buxifolia*, e *Swinglea glutinosa*). Um total de 67 sítios de DNAr foram observados nas 10 espécies analisadas. Dessas, 54 formavam pares de DNAr 5S-45S intimamente ligados, estando sempre o sítio DNAr 5S numa posição mais proximal em relação ao sítio de DNAr 45S, independente da região cromossômica que eles ocorriam. Esses resultados sugerem que a ligação dos sítios de DNAr dentro de Aurantioideae seja uma condição ancestral que se manteve conservada durante a evolução do grupo, possivelmente por rearranjos cromossômicos ou transposição das seqüências de DNAr, associados à pressão seletiva favorecendo a ligação das mesmas.

Palavras chaves: *Citrus*, cromossomos, bandas CMA, *Fortunella*, sítios de DNAr

Introdução

Os sítios do gene ribossomal 45S é uma das regiões cromossômicas mais bem estudadas. A unidade do DNAr 45S em vegetais é composta de três subunidades bastante conservadas (5,8S, 18S e 25/26S) e dois espaçadores internos transcritos, o ITS1 e o ITS2. A sequência do DNAr 45S está organizada em centenas a milhares de unidades repetidas, dispostas em *tandem*, localizadas em uma ou mais regiões cromossômicas. Inicialmente, essas regiões foram identificadas como constrições secundárias ou sítios de AgNOR, e mais tarde, com o advento da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), como sítios de DNAr 45S. Lima de Farias (1976) observou que na maioria das angiospermas (86,6%) a constrição secundária está localizada na região subterminal de um ou mais cromossomos, usualmente formando um satélite. Nesse estudo, esse autor compilou dados de 506 espécies, num total de 717 cromossomos com constrição secundária. Análises com FISH confirmam esta forte tendência (Melo & Guerra 2003, Pedrosa *et al.* 2006, Hasterok *et al.* 2006), mas a razão dessa localização preferencial permanece desconhecida.

Os ribossomos são formados por dezenas de diferentes proteínas, pelas três subunidades do RNAr 45S e pelo RNAr 5S. Este último contribui para a formação dos ribossomos na mesma razão do RNAr 45S, sendo igualmente bem conservado e fundamental para a vida da célula (Martins & Wasko 2004). Diferentemente dos sítios de DNAr 45S, os sítios de DNAr 5S somente podem ser localizados através da FISH tanto em cromossomos como em núcleos interfásicos, e por isso somente após o estabelecimento desta técnica é que nos últimos 15 anos, a posição dos sítios de DNAr 5S tornou-se amplamente conhecida.

Atualmente, a localização dos sítios de DNAr 5S é conhecida em muitas espécies vegetais e não se conhece nenhuma tendência clara desses sítios em ocuparem uma posição preferencial nos cromossomos. Em vários gêneros, como *Trifolium* (Ansari *et al.* 1999), *Vicia* (Raina *et al.* 2001), e *Brassica* (Hasterok *et al.* 2006), os dois loci podem estar proximamente

ligados em um mesmo par cromossômico ou localizados em diferentes pares cromossômicos e em diferentes posições. Igualmente em *Citrus*, a maioria dos acessos investigados revelaram diferentes combinações de loci isolados e loci ligados (Pedrosa *et al.* 2000, Carvalho *et al.* 2005, Moraes *et al.* 2007, *in press*), enquanto em *Poncirus trifoliata*, uma espécie proximamente relacionada a *Citrus*, os sítios de DNAr 5S e 45S foram localizados adjacentes uma ao outro na região proximal de dois pares cromossômicos e na região terminal de um terceiro par (Brasileiro-Vidal *et al.* 2007). A mudança de padrão de distribuição dos sítios de DNAr nesses dois gêneros chama a atenção pelo fato de envolverem espécies que se inter cruzam livremente e, principalmente, pela ocorrência singular de três pares de sítios de DNAr adjacentes no cariótipo de *P. trifoliata*. Para entender a origem da localização adjacente desses sítios em *P. trifoliata*, foram analisados, neste trabalho, representantes de nove outros gêneros, incluindo espécies de ambas as tribos (Clauseneae e Citreae) da subfamília, e uma espécie do subgênero *Papeda*, que de acordo com Swingle & Reece (1967), engloba os membros mais basais do gênero *Citrus*.

Nos últimos 15 anos, os cromossomos das espécies de *Citrus* têm sido intensamente analisados, tendo sido demonstrado que a coloração simultânea com os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA) e 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) permite a diferenciação da maioria dos cromossomos através dos seus distintos padrões de bandas CMA⁺ (Guerra 1993). Um padrão similar de bandas CMA⁺ foi também reportado para vários outros gêneros de ambas as tribos de Aurantioideae (Guerra *et al.* 2000). Uma maior diferenciação dos cromossomos das espécies de *Citrus* foi obtida com a coloração CMA/DAPI seguida da hibridização *in situ* com sondas de DNAr 5S e 45S. De acordo com a distribuição das bandas CMA⁺, os cromossomos foram classificados em diferentes tipos (A a G), enquanto aqueles que portavam sítios de DNAr foram classificados em subtipos, como por exemplo, A/45S ou D/5S-45S.

Até o momento, mais de 100 acessos pertencentes a 41 espécies de *Citrus* foram analisados com CMA/DAPI. Além disso, 37 acessos, compreendendo 24 espécies, tiveram o número e a posição dos sítios de DNAr 5S e 45S identificados (Pedrosa *et al.* 2000, Carvalho *et al.* 2005, Moraes *et al.* 2007, *in press*). Entre as Aurantioideae, além do gênero *Citrus*, somente *P. trifoliata* foi investigado com relação à distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S (Brasileiro-Vidal *et al.* 2007). O presente trabalho, estende essa análise para sete gêneros da tribo Citreae e três gêneros da tribo Clauseneae.

Material e Métodos

Materiais

Foram analisadas um total de 10 espécies, sendo três (*Glycosmis pentaphylla*, *Clausena excavata*, e *Bergera koenigii*) da tribo Clauseneae, um grupo menor e mais basal, e sete (*Merrillia caloxylon*, *Murraya paniculata*, *Citrus hystrix*, *Fortunella obovata*, *Severinia buxifolia*, *Swinglea glutinosa* e *Atalantia monophylla*) da tribo Citreae, a qual inclui vários gêneros proximamente relacionados a *Citrus*. Todos os acessos investigados foram provenientes da coleção do banco de germoplasma da estação experimental da EMBRAPA Mandioca e Frutas Tropicais, Cruz das Almas, Brasil.

Preparação cromossômica

Para as análises mitóticas, pontas de raízes obtidas a partir de sementes germinadas em placas de Petri ou de plantas adultas cultivadas em jarros foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (0,002 M) por 5 h a 18°C, fixadas em 3:1 etanol-ácido acético (v/v) por 2-24 h à temperatura ambiente e estocadas em *freezer* a -20°C. O material foi lavado em água destilada e digerido com uma solução enzimática contendo 2% celulase (Onozuka) e 20% pectinase (Sigma) (w/v)

por 2 h a 37°C. Em seguida, as lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento, em uma gota de ácido acético 45%, e as laminulas retiradas em nitrogênio líquido. As lâminas foram coradas com uma solução de DAPI (2 µg/ml):glicerol (1:1, v/v) para permitir a seleção das melhores preparações. Subsequentemente, elas foram descoradas em etanol-ácido acético (3:1) por 30 min à temperatura ambiente e mantidas em etanol absoluto a 10°C até o dia seguinte. As lâminas foram secas ao ar e envelhecidas por três dias à temperatura ambiente.

Coloração CMA/DAPI

Após o envelhecimento, as lâminas foram coradas com CMA e DAPI como descrito anteriormente por Carvalho *et al.* (2005). As melhores metáfases foram capturadas com uma câmera de vídeo Cohu, usando programa QFISH da Leica. As lâminas foram descoradas e estocadas a -20°C para posterior hibridização *in situ* com sondas de DNAr 5S e 45S.

Hibridização Fluorescente in situ (FISH)

Os sítios de DNAr 5S foram localizados usando a sonda D2 de *Lotus japonicus*, um fragmento de 500 pb da sequência repetitiva do locus de DNAr 5S. Os sítios de DNAr 45S foram localizados usando a sonda R2, um fragmento de 6.5 kb da unidade repetitiva do DNAr 18S-5,8S-25S de *Arabidopsis thaliana*. As sondas foram marcadas por *nick translation* (Invitrogen) com biotina-16-dUTP (Roche) ou Cy3-dUTP (Amersham), para o DNAr 5S, e com digoxigenina-11-dUTP (Roche), para o DNAr 45S. O procedimento de FISH utilizado foi baseado em Jiang *et al.* (1995) com pequenas modificações. A mistura de hibridização foi constituída por 60% de formamida (v/v), 5% de dextran sulfato (w/v), 2× SSC e 2–5 ng/µl de cada sonda. A sonda de DNAr 5S marcada com biotina foi detectada com antibiotina produzida em camundongo (Roche) e o sinal foi amplificado com anticorpo contra anticorpos de camundongo, produzido em coelho, conjugado com TRITC (Dako). A sonda de DNAr foi

detectada com anti-digoxigenina conjugada com FITC produzida em ovelha (Roche), e o sinal amplificado com anticorpo contra anticorpos de ovelha, produzido em coelho, conjugado com FITC (Dako). Todas as preparações foram contra-coradas e montadas com 2µg/ml de DAPI em Vectashield (Vector). As imagens das células foram adquiridas como descrito acima.

Resultados

O padrão de bandas CMA observado em cada espécie coincidiu com os descritos anteriormente por Guerra *et al.* (2000) e Yamamoto *et al.* (2007), com pequenas variações. As espécies apresentaram apenas bandas CMA⁺/DAPI⁻, embora as bandas CMA⁺ localizadas nas constrições secundárias fossem às vezes neutras para CMA e negativas para o DAPI. Em cada cariótipo, os cromossomos foram classificados nos tipos A a G, de acordo com a nomenclatura proposta por Carvalho *et al.* (2005): A, uma banda proximal e duas terminais; B, uma banda proximal e uma terminal; C, uma banda em cada uma das extremidades do cromossomo; D, uma única banda terminal; F, sem bandas; G, duas bandas próximas na região terminal do braço longo. O cromossomo do tipo E (com apenas uma banda intersticial) não foi observado em nenhuma das espécies analisadas. A Tabela 1 mostra a fórmula cariotípica para cada espécie analisada e a distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S.

Entre as espécies diplóides o número total de sítios de DNAr 5S e 45S variou de quatro a dez por célula, enquanto cada uma das duas espécies poliplóides apresentou 12 sítios. No total das amostras investigadas, 67 sítios de DNAr foram detectados e, surpreendentemente, 54 deles (80%) formavam pares de DNAr 5S-45S intimamente associados. O mais impressionante é que quase todos os sítios de DNAr 5S (27) estavam associados com os sítios de DNAr 45S, exceto dois sítios de *C. excavata*. Por outro lado, 11

dos 38 sítios de DNAr 45S não estavam ligados ao DNAr 5S, simplesmente porque o número de sítios de DNAr é maior que o de DNAr 5S.

Todos os sítios de DNAr 45S foram co-localizados com as bandas CMA⁺, exceto os menores de *C. excavata* e *B. koenigii*, enquanto os sítios de DNAr 5S pareceram adjacentes às bandas CMA. Frequentemente, o sinal de ambas as sondas pareciam co-localizados um com o outro e com as bandas CMA⁺, como se, por problemas técnicos, o sinal de uma das sondas estivesse sendo percebido de forma inespecífica com os dois filtros durante a captura de imagens. Entretanto, quando apenas uma sonda era hibridizada de cada vez tornava-se claro que o sítio de DNAr 5S estava na borda da banda CMA, sempre em uma posição mais proximal, enquanto o DNAr 45S estava justaposto à banda CMA. Desta forma, o sinal expandido de um dos sítios parecia sobreposto ao outro devido à ligação entre os dois tipos de seqüências de DNAr.

Glycosmis pentaphylla, uma das duas espécies hexaplóides da subfamília, com $2n=54$, apresentou a fórmula cariotípica com $6D + 48F$ (Figura 1a). A análise com FISH mostrou a presença de seis sítios de DNAr 5S associados com seis sítios de DNAr 45S (Figura 1b), co-localizados com as bandas CMA⁺ dos cromossomos D (D/5S-45S).

Clausena excavata, uma das poucas espécies tetraplóides da subfamília, apresentou $2n=36$ e fórmula cariotípica $4C + 10D + 22F$. Vários cromossomos mostraram bandas CMA pequenas e pouco contrastadas (Figura 1c). A análise com FISH revelou a presença de quatro sítios de DNAr 5S e oito de 45S. Dois loci de DNAr 5S estavam localizados em cromossomos do tipo F (F/5S) e os outros dois estavam associados com o DNAr 45S em cromossomos do tipo C (C/5S-45S). Em relação aos seis loci de DNAr 45S restantes, , quatro foram localizados em cromossomos do tipo D (D/45S), e dois sítios foram situados na região terminal de um par de cromossomos aparentemente sem banda ou com uma banda muito pequena e neutra para CMA (Figuras 1d-e). Esses cromossomos foram considerados do tipo

D, considerando que a ocorrência de um sítio de DNAr 45S corresponde a uma banda CMA, freqüentemente identificada como neutra.

O cariótipo de *B. koenigii* apresentou a fórmula $5D + 13F$, com dois sítios de DNAr 5S e cinco de 45S distribuídos em dois cromossomos do tipo D/5S-45S e três do tipo D/45S. As bandas CMA dos cromossomos D/5S-45S foram fracas ou neutras (Figuras 1f-h). A fórmula cariotípica de *M. paniculata* foi $2C + 14D + 2F$, com um único par de sítios de DNAr 5S-45S em um dos maiores cromossomos D (Figura 1i-j).

Em *Merrillia caloxylon* a fórmula cariotípica observada foi $2B + 1C + 9D + 6F$ (Figura 1k). Os cromossomos dessa espécie exibiram um único par de sítios de DNAr 5S e 45S na banda proximal do cromossomo B (B/5S-45S). Este sítio foi geralmente observado como uma constrição secundária proximal distendida, resultando na aparente separação de dois segmentos cromossômicos, como se fossem dois cromossomos pequenos (Figuras 1l-m).

Entre os representantes da tribo Citreae analisados, *C. hystrix* e *Fortunella obovata* apresentaram a maior quantidade de bandas CMA⁺ e de sítios de DNAr, enquanto as espécies de *Atalantia*, *Severinia* e *Swinglea* possuíam a menor quantidade de blocos de heterocromatina e sítios de DNAr. *Citrus hystrix*, uma das espécies mais primitivas do gênero *Citrus*, apresentou a fórmula cariotípica $3B + 11D + 2F + 2G$, com três cromossomos B/5S-45S e dois D/5S-45S (Figuras 2a-c). Nesta, o par cromossômico D/5S-45S foi um dos menores do complemento e os sítios de DNAr foram localizados nos braços curtos. *Fortunella obovata* apresentou a fórmula cariotípica $1A + 1B + 2C + 14D$, com dois sítios de DNAr 5S e quatro de DNAr 45S (Figuras 2d-e). Os sítios de DNAr ligados foram associados à uma banda terminal de dois cromossomos C (C5/45S)), enquanto um sítio isolado de DNAr 45S foi observado banda proximal dos cromossomos A (A/45S) e (B/45S). Ambos os homólogos C possuíam bandas terminais muito pequenas, podendo serem confundidos com tipos D ou F. A fórmula cariotípica dessa espécie foi reportada aqui pela primeira vez.

As outras três espécies apresentaram poucos blocos heterocromáticos e um único par de sítios de DNAr 5S e 45S. *Swinglea glutinosa* apresentou somente uma banda CMA⁺ em um par de cromossomos D/5S-45S (Figuras 2f-g). Em *S. buxifolia* foi observado 2C + 4D + 12F, estando os sítios de DNAr 5S-45S co-localizados com a banda CMA fracamente positiva ou neutra, do braço curto dos cromossomos do tipo C (Figuras h-i). *Atalantia monophylla* apresentou 8D + 10F, com os sítios de DNAr no par de cromossomos do tipo D com a banda CMA⁺ mais proeminente (Figuras k-l).

A figura 3 sintetiza todos os dados obtidos relacionados ao número e distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S e aos padrões de bandas CMA. A relação entre esses gêneros é evidenciada pelo cladograma sugerido por Samuel *et al.* (2001), baseados em dados bioquímicos e moleculares.

Discussão

Para todas as espécies analisadas, exceto *F. obovata*, o padrão de bandas CMA foi descrito anteriormente de forma detalhada (ver Guerra *et al.* 2000, Yamamoto *et al.*, 2007). *Merrillia caloxylon* apresentou fórmula cariotípica diferente da reportada por Guerra *et al.* (2000), que encontraram 2B + 2C + 8D + 6F. A divergência no número de cromossomos C e D entre as duas amostras deve ser devido a um polimorfismo de tamanho das bandas do cromossomo C. Se uma das bandas sofrer uma forte redução de tamanho o cromossomo pode ser visualizado como um D, ou vice-versa (ver também Moraes *et al.* 2007).

Análises prévias da distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S foram restritas a *P. trifoliata* e espécies de *Citrus* do subgênero *Citrus* (ver Carvalho *et al.* 2005, Brasileiro-Vidal *et al.* 2007, Moraes *et al.* 2007). Miranda *et al.* (1997) reportaram a ocorrência de sítios DNAr 45S nos cromossomos A e C de *Fortunella crassifolia*, com resultados semelhantes aos observados aqui em *F. obovata*. O número e a distribuição de sítios de DNAr entre as

espécies de *Citrus* é muito variável, principalmente devido ao fato de muitas espécies serem híbridos apomíticos, com dois ou mais pares cromossômicos heteromórficos. Cariótipos homozigotos para todas as bandas e sítios, assumidos como indicadores de espécies verdadeiras em *Citrus*, foram encontrados somente em *C. medica*, com 2B/45S e 2D/5S (Carvalho *et al.* 2005), *C. grandis*, com 4A/45S e 2F/5S (Moraes *et al.* 2007), e em três espécies de tangerinas, *C. deliciosa*, *C. sunki* e *C. reshni*, todas elas com 2D/5S-45S (Moraes *et al. in press*). O restante das espécies ou cultivares analisadas exibiu heteromorfismo para um ou mais tipos cromossômicos, como por exemplo, no pomelo *C. paradisi* cv. Marsh, com 2A/45S + 1B/45S + 1D/45S + 1D/5S-45S + 1F/5S (Moraes *et al.* 2007). Portanto, no subgênero *Citrus*, a ligação dessas duas famílias gênicas de DNAr parece estar restrita ao cromossomo do tipo D/5S-45S.

Na amostra analisada, o arranjo 5S-45S DNAr foi mais freqüentemente encontrado nos cromossomos D, embora isso não implique que esses cromossomos sejam homeólogos, visto que muitos cariótipos possuem vários cromossomos do tipo D. Além disso, alguns cromossomos D apresentaram a banda CMA⁺ no braço longo, como em *B. koenigii*, enquanto em outros a banda CMA⁺ está no braço curto, como em *S. buxifolia*, sugerindo que alguns desses D podem não ser homeólogos. De forma semelhante, é possível que outros D/5S-45S cromossômicos encontrados na subfamília também não sejam homeólogos, independente em que braços os sítios 5S-45S estejam localizados. Dobigny *et al.* (2004) chamaram a atenção para o fato de que padrões de bandas similares podem ser recorrentes dentro de um grupo de organismos, constituindo muitas vezes homeoplasias e não homologias. Da mesma maneira, na subfamília Aurantioideae a fórmula cariotípica pode ser útil para comparar espécies proximamente relacionadas, mas provavelmente não tem valor para comparar espécies distantes como *M. paniculata* e *F. obovata*, por exemplo. Se alguns dos cromossomos portadores de sítios ligados de DNAr 5S-45S não são homeólogos, como explicar que essas

duas famílias de genes repetidos em tandem tenham permanecido adjacentes apesar de terem mudado de posição dentro do cariótipo? A mesma questão pode ser levantada para o aparecimento desses dois sítios na região cromossômica proximal de algumas espécies.

A explicação mais simples é que essas mudanças tenham sido causadas por translocações ou inversões cromossômicas. Dados da literatura têm sugerido que inversões e translocações tenham tido um papel importante na evolução dos *Citrus* (Sharma & Bal 1957, Raghuvanshi 1962, Naithani & Raghuvanshi 1963), baseados principalmente nas alterações observadas durante a meiose. Contudo, uma cuidadosa investigação meiótica em algumas espécies de *Citrus* e em híbridos de *Citrus* × *Poncirus*, realizada por Agarwal (1987a,b), revelou um pareamento normal dos cromossomos, com baixo índice de irregularidades em anáfase. Análises com bandeamento CMA em cromossomos meióticos mostraram um pareamento regular normal, inclusive para os pares heteromórficos (M. Guerra, dados não publicados), sugerindo que nem sempre essas alterações cromossômicas afetam significativamente o comportamento meiótico. No caso de mudança dos sítios da posição terminal para a proximal, o mecanismo mais provável seria inversão paracêntrica. Contudo, se essa mudança tivesse sido promovida por inversão paracêntrica o arranjo da orientação do bloco de DNAr 5S-45S deveria ter sido invertido, o que não foi observado em nenhuma das espécies analisadas.

Uma outra possibilidade é que tenha ocorrido dispersão do DNAr 45S em tandem da região terminal de um cromossomo para outro por recombinação ectópica, como sugerido para mudanças similares em algodão (Hanson *et al.* 1996) e feijão comum (Pedrosa-Harand *et al.* 2006). Isso poderia explicar o aumento do número de cromossomos com sítios de DNAr 5S e 45S. Contudo a mudança da posição terminal para proximal exigiria novamente uma inversão paracêntrica, com mudança na ordem dos sítios de DNAr.

Uma terceira hipótese admite que seqüências repetidas em *tandem* podem “saltar” de uma posição do cromossomo a outra (Schubert & Wobus 1985). O evento inicial de transposição seria seguido por posterior amplificação dessas seqüências, resultando em um novo sítio de DNAr detectável por FISH (Dubcovsky & Dvořák 1995) e poderia ser mediado por elementos de transposição (Raskina *et al.* 2004, Altinkut *et al.* 2006, Gernand *et al.* 2007). Esse modelo parece explicar melhor os resultados observados em Aurantioideae. Se o arranjo do DNAr 5S e 45S ligados for uma condição plesiomórfica em Aurantioideae, arranjos formados apenas por DNAr 5S ou 45S, como observado por exemplo em *Clausena excavata* ou em *Citrus medica* (Carvalho *et al.* 2005), podem representar diferentes eventos de transposição de uma dessas seqüências, como assumido pelo modelo proposto por Dubcovsky & Dvořák (1995). Para esses autores, uma consequência desses eventos seria o surgimento de sítios menores em adição aos arranjos principais. Na presente análise, sítios menores foram encontrados somente em *Bergera koenigii*, talvez devido ao fato de que apenas um indivíduo de cada espécie tenha sido analisado. Contudo, pequenos sítios extras de DNAr 5S e 45S também foram encontrados em algumas cultivares de *P. trifoliata* (Brasileiro–Vidal *et al.* 2007), em *C. jambhiri* e em *C. volkameriana* (Carvalho *et al.* 2005), corroborando a idéia de que unidades de DNAr 5S ou 45S poderiam ter se deslocado da posição original várias vezes durante a evolução das espécies de Aurantioideae.

Uma implicação adicional desse modelo é que o estabelecimento de novos sítios de DNAr geram um excesso de cópias de genes de RNAr, permitindo uma posterior deleção de outros arranjos parálogos de DNAr (Dubcovsky & Dvořák 1995). No presente caso, a criação de um novo sítio de DNAr 45S, por exemplo, poderia ter precedido a conversão de um arranjo de DNAr 5S-45S em um sítio de DNAr 5S. Isso explicaria, mais parsimoniamente, a completa separação dos DNAr 5S-45S ligados, encontrados em *C. medica* e *C. grandis* (Carvalho *et al.* 2005, Moraes *et al.* 2007). A deleção de somente uma das famílias do arranjo

de DNAr 5S-45S tem sido observada inclusive dentro de uma mesma espécie. No decaplóide *Thinopyrum ponticum* ($2n=70$), por exemplo, existem 20 sítios de DNAr 5S e 45S ligados, todos eles na mesma posição cromossômica (Li & Zhang 2002). Contudo, um clone investigado por Brasileiro-Vidal *et al.* (2003) possuía apenas 17 sítios de DNAr 5S e 45S ligados e três sítios de DNAr 5S isolados, sugerindo uma eliminação seletiva de três sítios de DNAr 45S, sem afetar a manutenção dos sítios de DNAr 5S adjacentes. Cariótipos com um padrão similar de sítios de DNAr ligados e não ligados tem sido reportados em vários outros gêneros (Ansari *et al.* 1999, Hasterok *et al.* 2006, Datson & Murray 2006), mas nesses casos não existe indicação de que a condição “sítios ligados” seja basal.

Se a hipótese dos “saltos” de seqüências repetitivas for correta, a duplicação de sítios adjacentes de DNAr 5S e 45S poderia ser explicada de duas maneiras. A mais simples é que segmentos contendo DNAr 5S ou 45S tenha saltado várias vezes, independentemente, e a seleção natural tenha favorecido aquelas seqüências que coincidiram em posições adjacentes. Isso poderia explicar a ocorrência desses sítios ligados em diferentes tipos cromossômicos (A, B, C e D) e em diferentes posições do cromossomo, ou ainda o aumento no número de sítios adjacentes em um cariótipo, como em *P. trifoliata*. Igualmente, isso explicaria a elevada freqüência de sítios ligados em angiospermas em geral, independentemente de ser essa condição basal ou não, como observado em diversos gêneros de Brassicaceae (Hasterok *et al.* 2006), em *Trifolium* (Ansari *et al.* 1999), *Hordeum* (De Bustos *et al.* 1996), etc. A reunião *de novo* de sítios de DNAr deve ser um evento raro, mas há indícios de que possa ocorrer inclusive dentro de uma mesma espécie. Thomas *et al.* (1996) observaram um sítio de DNAr 5S localizado próximo ao sítio de DNAr 45S do cromossomo 2, em um determinado genótipo de *Lolium rigidum* var. *rigidum*, enquanto em um outro genótipo o sítio de DNAr 5S estava localizado no cromossomo 3, em uma posição um pouco mais distante de um outro sítio de DNAr 45S. Nas espécies de Aurantioideae, os dois sítios foram sempre observados muito

próximos um do outro e com a mesma orientação. Nesse caso, para que eventualmente se posicionassem tão proximamente localizados os eventos de “salto” seguidos de seleção teriam que ser muito freqüentes, o que poderia comprometer a integridade do genoma, tornando essa hipótese improvável.

Uma segunda possibilidade é que a sequência de DNA transponível fosse heterogênea, compreendendo segmentos adjacentes da parte interna do arranjo contendo ao menos uma unidade de DNAr 5S e uma unidade do DNAr 45S. Após a transposição, ambos os genes de RNAr poderiam ter sido amplificados independentemente, gerando eventualmente dois novos sítios muito próximos. A amplificação de seqüências repetidas pode ocorrer de forma muito rápida e tem sido inferida em alguns organismos (Raskina *et al.* 2004, Eickbush & Eickbush 2007). Contudo, não existem evidências claras que essa transposição envolvendo simultaneamente ambos os tipos de sítios de DNAr tenha de fato ocorrido em nenhum outro organismo.

O significado da conservação da ligação dos locos de DNAr com a mesma orientação é uma problema ainda menos entendido. Se os sítios de DNAr 45S são localizados preferencialmente na região terminal, como proposto por Lima de Faria (1976), e há alguma pressão de seleção para manter os dois locos ligados, a orientação do sítio de DNAr 5S na posição proximal é quase inevitável. A idéia de que a seleção favorece a distribuição de determinados genes em posições preferenciais nos cromossomos tem sido fortemente corroborada por diversos estudos de mapeamento gênico comparado em diferentes organismos (Hurst 1999). Em muitos gêneros de plantas, como *Trifolium* (Ansari *et al.* 1999) e diversos membros de Brassicaceae (Hasterok *et al.* 2006), a orientação desses sítios ligados parece ter sido preferencialmente mantida, enquanto em outros como em *Hordeum* (De Bustos *et al.* 1996) e vários outros membros da tribo Triticeae os dois sítios são mantidos ligados porém com orientações diferentes (Castilho & Heslop-Harrison 1995). No gênero

Pinus, a orientação foi conservada dentro do subgênero *Strobus*, mas foi invertida no subgênero *Pinus* (Cai *et al.* 2006).

Os motivos de tais “preferências” permanecem desconhecidos, mas podem estar relacionados com a dinâmica funcional dos núcleos interfásicos. Análises de núcleos interfásicos através da microscopia confocal indicam que ambos os sítios de DNAr tendem a estar próximos ao nucléolo, tanto nas espécies em que o DNAr 5S e 45S estão ligados quanto naquelas em que essas duas famílias gênicas estão separadas (Highett *et al.* 1993, Montijn *et al.* 1999). Nas Aurantioideae, a ligação dos sítios de DNAr 5S e 45S e a conservação da orientação centrômero-telômero não parece ser um processo estocástico, mas sim uma consequência de restrições funcionais a arranjos aleatórios que atuam mas fortemente aqui que na maioria dos táxons investigados.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), órgãos financiadores dessa e a Luiz Gustavo Rodrigues de Souza pelo auxílio na confecção das pranchas.

Referências Bibliográficas

- Agarwal PK (1987a) Cytogenetical investigations in Rutaceae. I. Meiotic studies in four *Citrus* species of hybrid origin. *Cytologia* **52**: 753-756.
- Agarwal P K (1987b) Cytogenetical investigations in Rutaceae. II. Meiotic studies in three intergeneric hybrids of *Citrus*. *Cytologia* **52**: 757-760.
- Altinkut A, Kotseruba V, Kirzhner M, Nevo E, Raskina O, Belyayev A (2006) Ac-like transposons in populations of wild diploid Triticeae species: comparative analysis of chromosomal distribution. *Chromosome Res* **14**: 307-317.

- Ansari HA, Ellison NW, Reader SM *et al.* (1999) Molecular cytogenetic organization of 5S and 18S-26S rDNA loci in white clover (*Trifolium repens* L.) and related species. *Ann Bot* **83**: 199-206.
- Brasileiro-Vidal AC, Cuadrado A, Brammer SP *et al.* (2003) Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum* (Triticeae, Poaceae) using *in situ* hybridization with different DNA sequences. *Genet Mol Biol* **26**: 505-510.
- 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.
- Cai Q, Zhang D, Liu ZL, Wang XR (2006) Chromosomal localization of 5S and 18S rDNA in five species of subgenus *Strobus* and their implications for genome evolution of *Pinus*. *Ann Bot* **97**: 715-22.
- Castilho A, Heslop-Harrison JC (1995) Physical mapping of 5S and 18S-25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata*. *Genome* **38**: 91-96.
- 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.
- Datson PM, Murray BG (2006) Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? *Chromosome Res* **14**: 845-847.
- De Bustos A, Cuadrado A, Soler C, Jouve N (1996) Physical mapping of repetitive DNA sequences and 5S and 18S-26S rDNA in five wild species of the genus *Hordeum*. *Chromosome Res* **4**: 491-499.
- Dobigny G, Ducroz J, Robinson T J, Volobouevv(2004) Cytogenetics and Cladistics. *Syst. Biol.* **53**:470–484.

- Dubcovsky J, Dvořák J (1995) Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the Triticeae genomes. *Genetics* **140**: 1367-1377.
- Eickbush TH, Eickbush DG (2007) Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* **175**: 477-485.
- Gernand D, Golczyk H, Rutten T, Ilnicki T, Houben A, Joachimiak AJ (2007) Tissue culture triggers chromosome alterations, amplification, and transposition of repeat sequences in *Allium fistulosum*. *Genome* **50**: 435-432.
- Guerra M (1993) Cytogenetics of Rutaceae V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity* **71**: 234-241.
- Guerra M, Santos KGB, Silva AEB, Ehrendorfer F (2000) Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae - A case of parallel chromosomal evolution. *Amer J Bot* **87**: 735-747.
- Hanson RE, Islam-Faridi MN, Percival EA *et al.* (1996) Distribution of 5S and 18S-28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma* **105**: 55-61.
- Hasterok R, Wolny E, Hosiawa M *et al.* (2006) Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae. *Ann Bot* **97**: 205-16.
- Highett MI, Beven AF, Shaw PJ (1993) Localization of 5S genes and transcripts in *Pisum sativum* nuclei. *J Cell Sci* **105**: 1151-1158.
- Hurst LD (1999) The evolution of genomic anatomy. *TREE* **14**: 108-112
- Jiang J, Gill BS, Wangt G, Ronald PC, Wardt DC (1995) Metaphase and interphase fluorescence in situ hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 4487-4491.

-
- Li D, Zhang X (2002) Physical localization of the 18S-5.8S-26S rDNA and sequence analysis of ITS regions in *Thinopyrum ponticum* (Poaceae: Triticeae): implications for concerted evolution. *Ann Bot* **90**: 445-452.
- Lima-de-Farias A (1976) The chromosome field I. Prediction of the location of ribosomal cistrons. *Hereditas* **83**: 1-22.
- Martins C, Wasko AP (2004) Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the FISH genome. In: Williams CR, ed. *Focus on Genome Research*, New York: Nova Science Publishers, pp. 298-318.
- 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.
- Miranda M, Ikeda F, Endo T *et al.* (1997) rDNA sites and heterochromatin in Meiwa kumquat (*Fortunella crassifolia* Swing.) chromosomes revealed by FISH and CMA/DAPI staining. *Caryologia* **50**: 333-340.
- Montijn MB, Houtsmuller AB, ten Hoopen R *et al.* (1999) The 5S rRNA gene clusters have a defined orientation toward the nucleolus in *Petunia hybrida* and *Crepis capillaris*. *Chromosome Res* **7**: 387-99.
- Moraes AP, Lemos RR, Brasileiro-Vidal AC, Soares Filho WS, Guerra M (*in press*) Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrids accessions of mandarin. *Cytogenet Genome Res*.
- Moraes AP, Soares Filho WS, Guerra M (2007) Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Res* **15**:115-121.
- Naithani SP, Raghuvanshi SS (1963) Cytogenetical studies in *Citrus*. Parte I. *Genetica* **33**: 301-312.

- Pedrosa-Harand A, Almeida, CCS, Mosiolek, M, Blair MW, Schweizer D and Guerra M (2006) Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theor Appl Genet* **112**: 924-933.
- 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.
- Raghuvanshi SS (1962) Cytogenetical evolution in genus *Citrus*. *Cytologia* 27:172-187.
- Raina SN, Mukai Y, Kawaguchi K *et al.* (2001) Physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S ribosomal RNA gene families in three important vetches (*Vicia* species) and their allied taxa constituting three species complexes. *Theor Appl Genet* **103**: 839-845.
- Raskina O, Belyayev A, Nevo E (2004) Quantum speciation in *Aegilops*: molecular cytogenetic evidence from rDNA cluster variability in natural population. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 14818-14823.
- Samuel R, Ehrendorfer F, Chase MW, Greger H (2001) Phylogenetic analyses of Aurantioidea (Rutaceae) based on Non – Coding plastid DNA sequences and phytochemical features. *Plant Biol* **3**: 77-87.
- Schubert I, Wobus U (1985) In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* **92**: 143-148.
- Sharma AK, Bal AK (1957) Chromosome studies in *Citrus*. I. *Agron Lusitana* **19**: 101-126.
- 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, pp 190-430.
- Thomas HM, Harper JA, Meredith MR *et al.* (1996) Comparison of ribosomal DNA sites in *Lolium* species by fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res* **4**: 486-90.
- Yamamoto M, Abkenar AA, Matsumoto R *et al.* (2007) CMA banding patterns of chromosomes in major *Citrus* species. *J Japan Soc Hort Sci* **76**: 36-40.

Tabela 1. Fórmula cariotípica baseada no padrão de bandas CMA, número e distribuição dos sítios de DNAr nos representantes da subfamília Aurantioideae analisados.

Espécie	Fórmula cariotípica	Número de sítios de DNAr	Distribuição dos sítios de DNAr		
			5S	45S	5S-45S
Tribo Clauseneae					
<i>Glycosmis pentaphylla</i> (Retz.) Corr. Agg	6D + 48F	12			6D
<i>Clausena excavata</i> Burm. f.	4C + 10D + 22F	12	2F	6D	2C
<i>Bergera koenigii</i> (L.) Roxb	5D + 13F	7		3D	2D
Tribe Citreae					
<i>Murraya paniculata</i> (L) Jack.	2C + 14D + 2F	4			2D
<i>Merrillia caloxylon</i> (Ridley) Swing.	2B + 1C + 9D + 6 F	4			2B
<i>Citrus hystrix</i> DC	3B + 11D + 2F + 2G	10			3B + 2D
<i>Fortunella obovata</i>	1A + 1B + 2C + 14D	6		2C	1A + 1B
<i>Swinglea glutinosa</i> (Blanco) Merr.	2D + 16F	4			2D
<i>Severinia buxifolia</i> (Poir.) Ten.	2C + 4D + 12F	4			2C
<i>Atalantia monophylla</i> (Roxb.) DC.	8D + 10F	4			2D

Legendas

Figura 1. Hibridização *in situ* com sondas de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) em células coradas com CMA de *Glycosmis pentaphylla* (a-b), *Clausena excavata* (c-e), *Bergera koenigii* (f-h), *Murraya paniculata* (i-j), *M'errillia caloxylon* (k-m). Barra corresponde a 5 μ m.

Figura 2. Hibridização *in situ* com sondas de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) em células coradas com CMA de *Citrus hystrix* (a-c), *Fortunella obovata* (d-e), *Swinglea glutinosa* (f-g), *Severinia buxifolia* (h-i) *Atalantia monophylla* (j-l). Barra corresponde a 5 μ m.

Figura 3. Cladograma baseado em Samuel *et al.* (2001) mostrando o número e a distribuição dos sítios de DNAr 45S e 5S nas espécies analisadas em *Citrus medica* (Carvalho *et al.* 2005), *C. sinensis* (Pedrosa *et al.* 2000), *C. grandis* (Moraes *et al.* 2007) e *Poncirus trifoliata* (Brasileiro-Vidal *et al.* 2007). Blocos de heterocromatina CMA⁺ em amarelo, sítios de DNAr 5S em vermelho e sítios de DNAr 45S em verde.

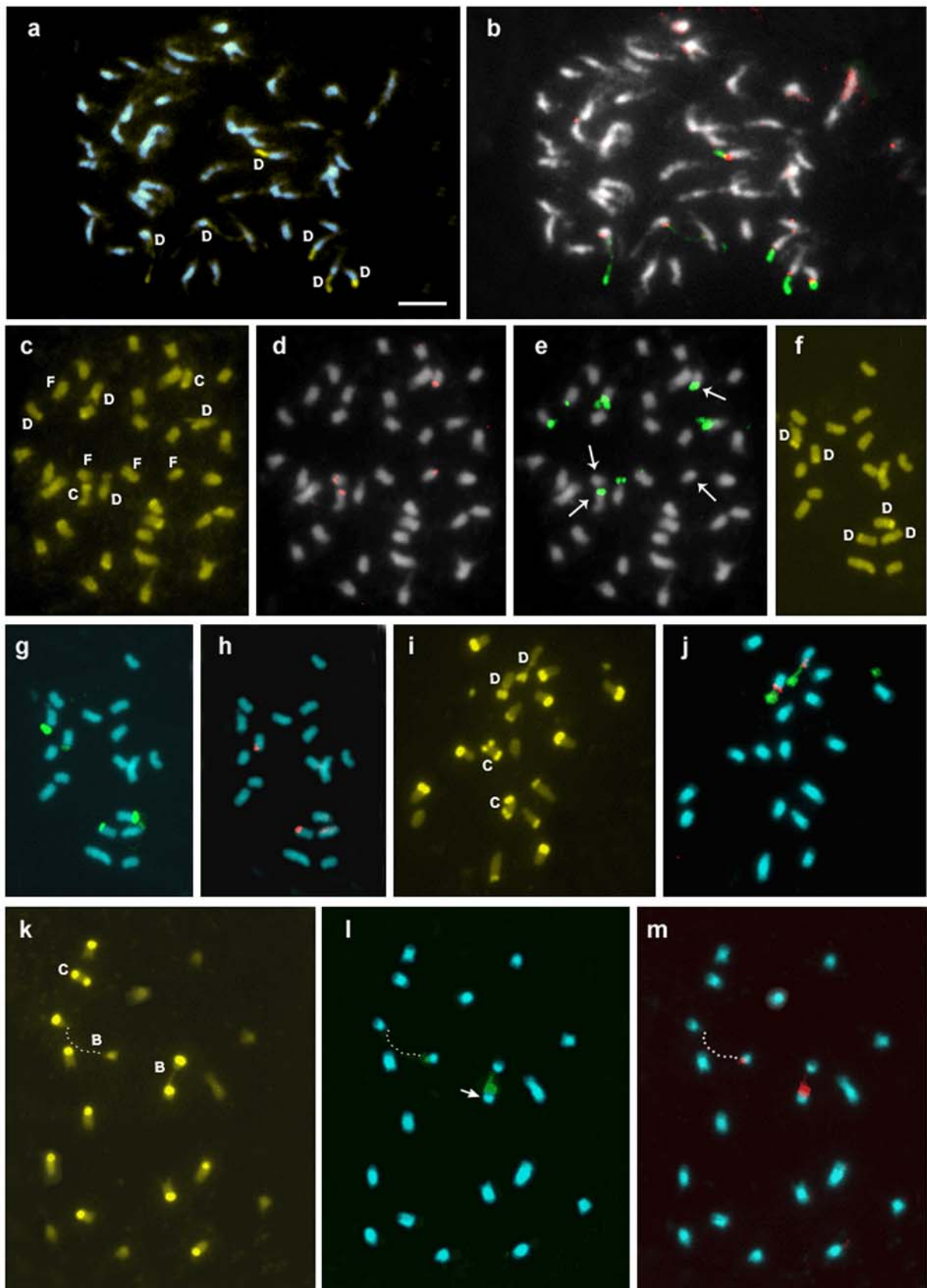


Figura 1

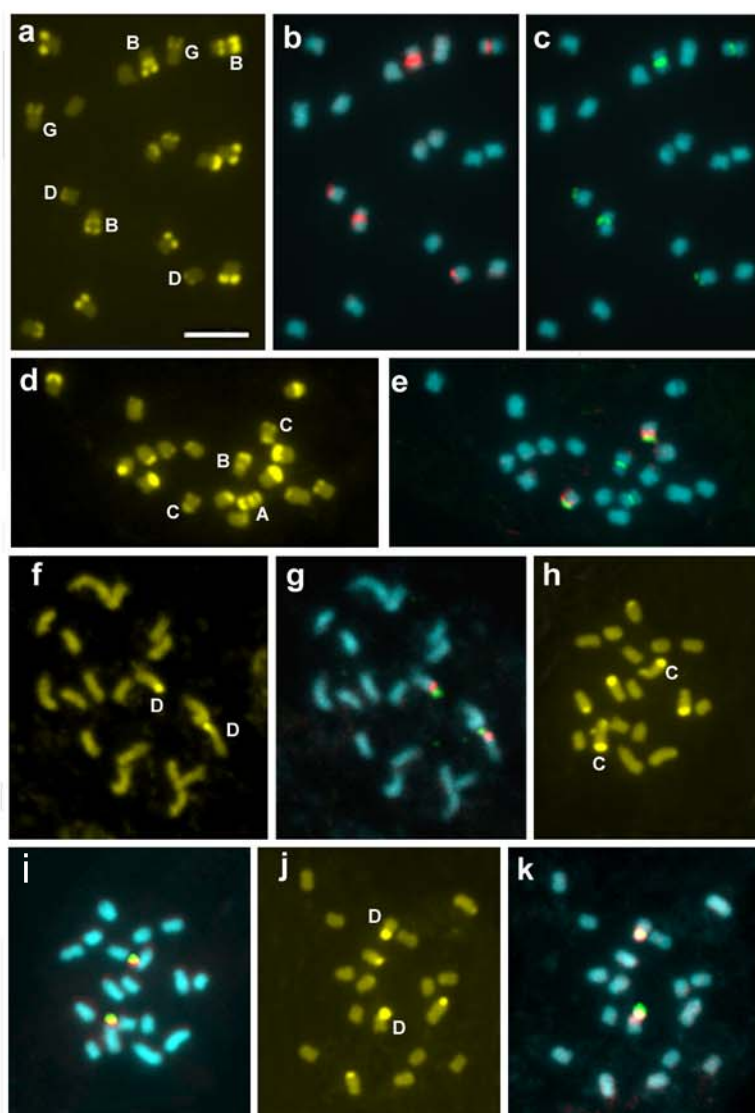


Figura 2

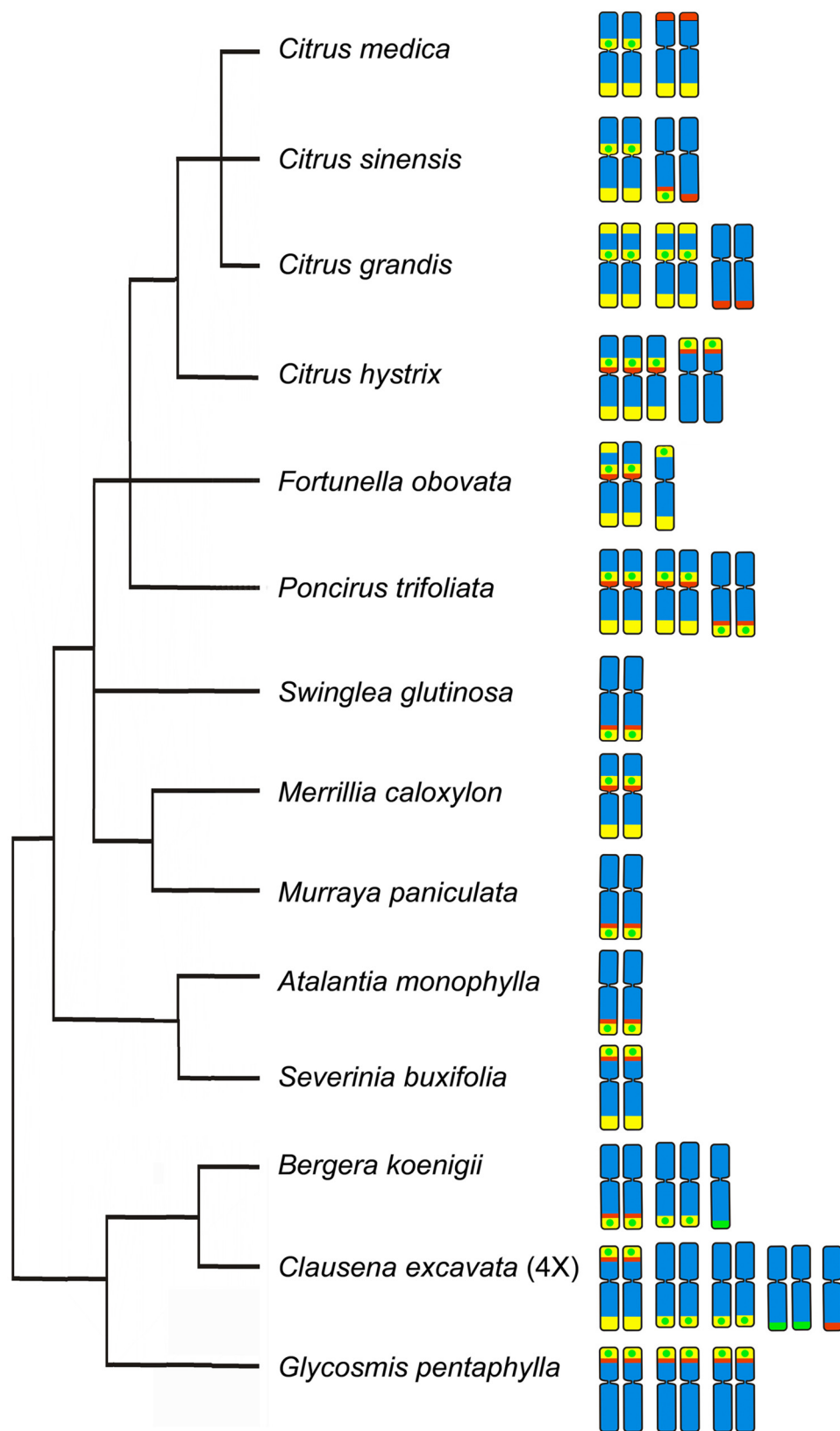


Figura 3

Capítulo IV

Localização cromossômica de uma seqüência de DNA satélite em espécies de

Citrus e alguns gêneros relacionados

Artigo a ser submetido à revista *Annals of Botany*

Localização cromossômica de uma sequência de DNA satélite em espécies de *Citrus* e alguns gêneros relacionados

Ana Emília Barros e Silva e Marcelo Guerra*

Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-420 Recife, PE, Brasil; Tel.: +55-81-21268846; Fax: +55-81-21268348; E-mail: msfguerra@hotmail.com

RESUMO:

A maioria das espécies da subfamília Aurantioideae (Rutaceae) apresenta número cromossômico $2n = 18$ e padrão de heterocromatina variável. As seqüências satélites que formam a heterocromatina nesse grupo são ricas em GC e chegam a representar cerca de 30% do genoma total em algumas espécies. Neste trabalho, foi feita uma análise do padrão de distribuição cromossômica de uma seqüência satélite de 181 pb (CsSat181), isolada de *Citrus sinensis*, através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), em três espécies de *Citrus* (*C. sinensis*, *C. aurantium* e *C. medica*), duas espécies proximamente relacionadas a *Citrus* (*Fortunella crassifolia* e *Poncirus trifoliata*) e uma espécie mais afastada (*Murraya paniculata*). Foi possível observar que a seqüência satélite CsSat181 estava presente na heterocromatina de todas as espécies analisadas, exceto em *M. paniculata*. Nenhum sinal de hibridização foi observado nos blocos de HC relacionados com o DNAr. A comparação da distribuição dessa seqüência com blocos CMA⁺ mostrou que essa seqüência é um dos principais componentes da heterocromatina de *Citrus* e dos gêneros mais proximamente relacionados. Por outro lado, os blocos CMA⁺ de *M. paniculata* parecem ser formados por uma seqüência satélite distinta da isolada de *C. sinensis*, sugerindo que dentro da subfamília Aurantioideae diferentes seqüências satélites foram amplificadas e evoluíram independentemente em diversos taxa

Palavras Chave: *Citrus*, DNA satélite, *Fortunella*, heterocromatina, *Poncirus*, *Murraya*

INTRODUÇÃO

Uma considerável parte do genoma de plantas é constituída por DNA repetitivo, que pode representar até 90% do DNA total em espécies com genomas grandes (Kamm *et al.*, 1994). As seqüências repetitivas podem estar dispersas pelo genoma ou podem estar organizadas em tandem, repetidas centenas ou milhares de vezes, constituindo os DNAs satélites (Sharma e Raina, 2005). Algumas seqüências repetidas em tandem são codificantes, como as que formam os genes ribossomais, contudo a grande maioria dessas seqüências não são codificantes e são geralmente reconhecidas nos cromossomos como blocos de heterocromatina constitutiva (Walsh, 1987; Charlesworth *et al.*, 1994).

As seqüências de DNA satélite que compõe a heterocromatina constitutiva (HC) podem ser cromossomo específica, como ocorre com a seqüência JNK localizada na HC intersticial do cromossomo 2R de centeio (Nagaki *et al.*, 1999a), genoma específica, como a seqüência TrsA presente no genoma A de *Oriza* (Uozu *et al.*, 1997), ou podem ser grupo específico, como os DNAs satélite CON1 e pAs1 que ocorrem em vários representantes da família Poaceae (Nagaki *et al.*, 1999b; Winterfeld e Roser, 2007). Além disso, um bloco de HC pode ser formado por mais de uma seqüência satélite, como observado nas espécies da sessão *Alatae* do gênero *Nicotiana* (Lim *et al.*, 2006).

A maioria dos DNAs satélite de plantas possui uma unidade monomérica em torno de 130-190 ou 310-390 pares de bases e motivos do pentanucleotídeo CAAAA. Supostamente este pentanucleotídeo é um sítio preferencial de quebra e reunião do DNAs satélite, envolvido nos mecanismos de amplificação e rearranjos dos mesmos (Macas *et al.*, 2002). O número de cópias de um determinado DNA satélite pode variar entre as espécies ou entre os indivíduos onde ele ocorre. Vários mecanismos podem afetar o número de repetições da unidade

monomérica, entre eles destacam-se os processos de *slippage*, conversão gênica e *crossing over* desigual (Charlesworth *et al.*, 1994; Sumner, 2003).

Inicialmente as seqüências satélites que formam a HC eram consideradas como “DNA lixo”, ou seja, que não tinham nenhuma função ou importância dentro do genoma das espécies. À medida que os estudos sobre essas seqüências foram ampliados, essa visão foi modificada (Schmidt e Heslop-Harrison, 1998). Atualmente, é sabido que os DNAs satélite têm um importante papel na evolução do genoma de muitas espécies. Essas seqüências têm também sido utilizadas para auxiliar no entendimento da taxonomia e da filogenia de vários grupos de plantas (ver por exemplo, Stevenson *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2006).

A subfamília Aurantioideae (família Rutaceae) tem sido caracterizada do ponto de vista citogenético por apresentar uma grande variabilidade no padrão de HC. A maioria dos blocos de HC é rico em GC e está localizada nas regiões terminais dos cromossomos (Guerra, 1993; Miranda *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 2007). O conteúdo de HC nos gêneros das espécies desse grupo varia de 3-32% (Guerra *et al.*, 2000). Esses autores observaram que as espécies que apresentam características basais possuem um menor conteúdo de HC em relação às espécies com características mais derivadas. Uma questão decisiva para entender a evolução dos diferentes padrões de bandas heterocromáticas observados nesse grupo é saber se os diferentes gêneros possuem distintos DNAs satélites. Isso permitiria verificar se a amplificação e evolução dessas seqüências teria ocorrido de forma independente e paralela, como proposto por Guerra *et al.* (2000). Se os padrões de bandas similares encontrados nesse grupo forem devidos à presença de DNAs satélites diferentes isso significaria que esses padrões, que parecem se repetir por toda subfamília, seriam características homoplásicas e que poderiam levar a interpretações enganosas da similaridade citogenética entre alguns gêneros.

Nos últimos 15 anos, algumas seqüências de DNAs satélites foram isoladas, de espécies do gênero *Citrus* e de *Poncirus trifoliata*, e posteriormente foram clonadas e seqüenciadas. Beridze *et al.* (1992) isolaram uma seqüência satélite de *C. ichangensis* com cerca de 181 pb e 63% de conteúdo de GC. Essa seqüência possui três motivos de um hexanucleotídeo CAAAAA, que é uma variante do pentanucleotídeo CAAAA. Similarmente, Fann *et al.* (2001) isolaram uma família de DNA satélite de cerca de 181 pb, presente em três espécies de *Citrus* (*C. ichangensis*, *C. limon* e *C. sinensis*) e em *P. trifoliata*, com grau de similaridade de 74 a 100%, em relação ao DNA satélite isolado por Beridze *et al.* (1992) e conteúdo de GC variando entre 60 e 68%.

O fato da seqüência isolada por Beridze *et al.* (1992) ser rica em GC e estar presente em algumas espécies de *Citrus* e em *P. trifoliata* a torna uma forte candidata para ser um dos componentes da HC desse grupo. Neste trabalho, foi analisado o padrão de distribuição cromossômica dessa seqüência satélite em três espécies de *Citrus* e em três espécies de gêneros relacionados, visando compreender a evolução da HC dentro desse grupo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Foram investigadas três espécies de *Citrus* (*C. sinensis* cv. Pêra, *C. medica* cv. Etrog e *C. aurantium* cv. Sem espinho), duas espécies proximamente relacionadas a *Citrus* (*P. trifoliata* e *Fortunella crassifolia*) e uma espécie mais distantemente relacionada, *Murraya paniculata*. Todos os acessos analisados foram provenientes do banco de germoplasma da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, Brasil. Meristemas radiculares, obtidos a partir de sementes germinadas em placas de Petri ou de plantas cultivadas no jardim experimental do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, foram

pré-tratados com 0,002 M 8-hidroxiquinoleína a 18 °C por 5h, fixados em etanol:ácido acético (3:1) à temperatura ambiente por 5-24h e estocados a -20 °C para posterior análise.

Preparação das lâminas

Pontas de raízes, previamente fixadas, foram digeridas com uma solução enzimática (celulase 2%-pectinase 20%) a 37 °C por 120 min. Após esse tratamento, as lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento e a lamínula retirada em nitrogênio líquido. As melhores lâminas foram selecionadas com DAPI-glicerol (1:1). Em seguida, as lâminas selecionadas foram descoradas em etanol:ácido acético (3:1) por 30 min a temperatura ambiente, transferidas para etanol 100% a 10 °C de um dia para o outro, secas ao ar e deixadas envelhecer por três dias, à temperatura ambiente.

Coloração com CMA e DAPI

As lâminas envelhecidas foram coradas com CMA e DAPI, de acordo com Guerra (1993). As melhores células foram capturadas com uma câmara de vídeo Cohu, usando o programa da Q-FISH da Leica. Em seguida, as lâminas foram descoradas e estocadas a -20 °C, para posterior hibridização *in situ*.

Obtenção e marcação do DNA satélite

O DNA genômico de *C. sinensis* foi isolado a partir de folhas jovens, como descrito por Romano e Brasileiro (1999). Para amplificar e marcar a sequência de DNA satélite, foram desenhados dois iniciadores a partir da sequência satélite de 181 pb descrita por Beridze *et al.* (1992), originalmente isolada de *C. ichangensis* (número de acesso do banco de dados EMBL: X51946). Os iniciadores utilizados foram: 5'-CGCCCAAAAATACCCGCCGAAG-3' e 5'-CCTATTTTGGCACACGGAGG-3'. A sequência satélite foi amplificada por PCR

nas seguintes condições: desnaturação inicial (1 min a 94 °C), 38 ciclos de amplificação (30 seg a 94 °C, 30 seg a 61,4 °C e 30 seg a 72 °C) e uma extensão final (7 min a 72 °C). A sonda marcada foi obtida re-amplificando o produto de PCR gerado inicialmente na presença de biotina-dUTP(Roche).

Hibridização fluorescente in situ (FISH)

O processo de hibridização *in situ* foi realizado de acordo com Moscone *et al.* (1996), com pequenas modificações. A mistura de hibridização foi composta de formamida a 50%, 2x SSC, 10% de dextran sulfato, e sonda numa concentração final de 5-7 ng/μl. Os banhos pós-hibridização foram realizados com nível de estringência de 73%. A sonda do DNA satélite de *C. sinensis*, marcada com biotina, foi detectada com antibiotina (Roche) produzida em camundongo e o sinal amplificado com anticorpo contra-anticorpos de camundongo, produzido em coelho, conjugado com TRITC (Dako). As melhores células foram capturadas como descrito acima.

RESULTADOS

A análise do produto da reação de PCR por eletroforese em gel de agarose revelou a amplificação de três fragmentos com aproximadamente 160, 340 e 520 pb. Embora a sequência satélite descrita por Beridze *et al.* (1992) tenha uma unidade de repetição de 181 pb, os iniciadores utilizados na PCR foram desenhados para hibridizar nos nucleotídeos das posições 16-38 (direto) e 161-181 (reverso) e por isso o monômero obtido ficou com tamanho em torno de 160 pb. Como o DNA amplificado de *C. sinensis* não foi seqüenciado e comparado diretamente à sequência de *C. ichaengensis*, ele foi denominado provisoriamente de CsSat181.

Para permitir a localização da sequência satélite em relação à posição da HC de cada espécie, as lâminas utilizadas para FISH foram previamente coradas com os fluorocromos CMA e DAPI. Cada cromossomo revelou um padrão típico de distribuição de blocos CMA⁺, que pode ser classificado nos seguintes tipos cromossômicos (de acordo com Carvalho *et al.*, 2005): cromossomo A, com duas bandas terminais e uma proximal; cromossomo B, com uma banda terminal e uma proximal; cromossomo C, com uma banda em cada extremidade do cromossomo; cromossomo D, com uma só banda terminal; cromossomo F, sem bandas. Todas as espécies analisadas apresentaram número cromossômico $2n = 18$ com as seguintes fórmulas cariotípicas: *C. sinensis*, $2B + 2C + 8D + 6F$ (Fig. 1A), *C. medica*, $2B + 8D + 8F$ (Fig. 1C), *C. aurantium*, $1A + 1B + 1C + 8D + 7F$ (Fig. 1E), *P. trifoliata*, $4B + 8D + 6F$ (Fig. 1G), *F. crassifolia*, $2A + 2C + 14D$ (Fig. 1I), e *M. paniculata*, $2C + 14D + 2F$.

Em *C. sinensis*, a sequência CsSat181 hibridizou em todas as bandas terminais CMA⁺, exceto em um cromossomo do tipo D (Fig. 1A-B). Em um dos pares de cromossomos do tipo D e na banda terminal de um cromossomo do tipo B a intensidade do sinal da hibridização foi menor que a intensidade das bandas CMA⁺. Em *C. medica* todas as bandas terminais hibridizaram com a CsSat181 (Fig. 1C-D). *Citrus aurantium* apresentou sinais de hibridização nas bandas terminais CMA⁺ dos cromossomos dos tipos A, B e C e em seis cromossomos do tipo D (Fig. 1E-F). Em uma região terminal do cromossomo do tipo A e em um cromossomo do tipo D a intensidade do sinal foi menor em relação à coloração com CMA e em algumas células o sinal de hibridização não foi perceptível nesses cromossomos.

Poncirus trifoliata apresentou sinal de hibridização na região terminal de três cromossomos do tipo B e em seis cromossomos do tipo D (Fig. 1G-H). A intensidade do sinal foi mais fraca em relação ao CMA em um cromossomo do tipo B e em dois cromossomos do tipo D. Em *F. crassifolia* a sequência satélite CsSat181 hibridizou apenas na região terminal

do par de cromossomos do tipo A e em cinco pares de cromossomos do tipo D (Fig. 1I-J). Em *M. paniculata* não foi observado nenhum sinal de hibridização.

DISCUSSÃO

O padrão de bandas CMA observado para cada espécie coincidiu com o descrito por Guerra *et al.* (2000) para *F. crassifolia* e *M. paniculata*, Pedrosa *et al.* (2000) para *C. sinensis*, Carvalho *et al.* (2005) para *C. medica*, Brasileiro-Vidal *et al.* (2007) para *P. trifoliata* e Guerra (2007) para *C. aurantium*.

De uma forma geral, os sítios de DNAr 45S são regiões cromossômicas que formam blocos CMA⁺. Em algumas células esses sítios podem aparecer neutros para CMA, mas são sempre negativos para DAPI, provavelmente por modificações nessa região durante a descondensação da região organizadora do nucléolo (Guerra, 2007). Dentro da tribo Citrae, todos os blocos CMA⁺ que estão localizados na região proximal dos cromossomos estão relacionados com os sítios de DNAr (Miranda *et al.*, 1997; Carvalho *et al.*, 2005; Brasileiro-Vidal *et al.*, 2007; Moraes *et al.*, 2007). Nas espécies analisadas, além das regiões proximais dos cromossomos do tipo A e B, os sítios de DNAr estão presentes na HC CMA⁺ terminal de um cromossomo do tipo D de *C. sinensis* e de *C. aurantium* (Pedrosa *et al.*, 2000; Guerra, 2007), em um par cromossômico D de *P. trifoliata* (Brasileiro-Vidal *et al.*, 2007) e em uma das bandas terminais dos cromossomos do tipo C de *F. crassifolia* (Miranda *et al.*, 1997). Em *M. paniculata* os sítios de DNAr estão localizados no bloco CMA⁺ em um par de cromossomos do tipo D (Barros e Silva *et al.*, em preparação). Em nenhuma das espécies analisadas a sequência CsSat181 hibridizou nos blocos CMA⁺ relacionados com os sítios de DNAr, mostrando que a sequência CsSat181 e o DNAr 45S formam sempre blocos distintos.

A sequência CsSat181 hibridizou fortemente em cromossomos de *Citrus*, *Poncirus trifoliata* e *Fortunella crassifolia*, indicando ser essa sequência um dos principais

componentes da HC nesse grupo. Esses dados sugerem que essa sequência DNA satélite se originou em um ancestral comum a esses gêneros. Por outro lado, devem existir também outros DNAs satélite que formam os blocos de HC, visto que nas espécies analisadas alguns blocos heterocromáticos não hibridizaram ou tiveram um sinal de hibridização relativamente menos intenso quando comparados à intensidade de coloração com o CMA.

Felice *et al.* (2004, 2006, 2007) sugeriram que outras três sequências satélites, duas isoladas de *C. limom*, uma com 600 pb (CL600) e outra com 300 pb (CL300), e uma isolada de *P. trifoliata* com 400 pb (PN400), possam fazer parte da HC de *Citrus* e de gêneros próximos. Esses autores observaram que essas sequências hibridizaram em membrana com o DNA genômico de espécies de *Citrus*, *Fortunella* e *P. trifoliata*. A CL600 e a CL300 possuem um conteúdo de 56% e 58% de AT, respectivamente, sendo pouco provável que sejam uns dos DNAs satélites principais da HC rica em GC desses gêneros. Por outro lado, elas podem estar relacionadas com a HC pericentromérica visualizada em alguns cromossomos com bandamento C (Guerra, 1985) e não detectada com a técnica de CMA/DAPI. Ito *et al.* (1993) localizaram uma HC proximal em quase todos os cromossomos de *C. sinensis* que não foi identificada com as técnicas de bandamento C e CMA/DAPI usuais. Felice *et al.*, (2006) estimaram que a sequência PN400, com 53% de conteúdo GC, representa 25% do genoma de *P. trifoliata*. Portanto, é possível que algumas dessas sequências, e/ou outras ainda não identificadas, participem juntamente com a CsSat181 da formação dos blocos de HC das espécies de Aurantioideae.

A ocorrência de duas ou mais sequências satélites em um mesmo bloco heterocromático tem sido também observada em várias espécies. Em *Vicia narbonensis*, por exemplo, duas sequências satélite distintas, VicTR-A e VicTR-B foram co-localizadas na região terminal de vários cromossomos (Navrátilová *et al.*, 2003). No caso dos blocos heterocromáticos dos cromossomos do tipo C e D de *F. crassifolia*, e do tipo D de *C.*

aurantium, que não hibridizaram com a sequência CsSat181, provavelmente devem ser formados por uma outra sequência satélite espécie-específica que tenha surgido após a separação desses dois gêneros. Novas sequências satélites podem surgir como resultados de mutações sofridas pela unidade de repetição de um DNA satélite pré-existente seguidas de eventos de amplificação e homogeneização de sequência (Ugarković e Plohl, 2002)

A presença da sequência CsSat181 em *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* e sua ausência em *M. paniculata* pode ser utilizada também como um caracter adicional para a taxonomia do grupo. *Murraya paniculata*, segundo Swingle, pertence à tribo Clausenae (revisado por Swingle e Reece, 1967). Contudo, análises de dados bioquímicos e moleculares têm sugerido que essa espécie deveria ser transferida da tribo Clausenae para a tribo Citreae, porém para um clado bem distinto de *Citrus* e gêneros afins (Samuel *et al.*, 2001). Por outro lado, *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella*, onde o CsSat181 hibridizou extensamente, são considerados gêneros proximamente relacionados em todas as análises (Swingle e Reece, 1967; Samuel *et al.*, 2001, Morton *et al.*, 2003). Em alguns outros grupos de plantas, o mapeamento citológico de sequências de DNA satélite tem também contribuído para uma melhor compreensão das relações filogenéticas. Em *Allium*, por exemplo, a análise do DNA satélite com uma sequência de 375 pb em diferentes espécies do gênero forneceu suporte para a transferência de *A. roylei* da sessão *Rhizirideum* para a sessão *Cepa*, além de reforçar a idéia de que a sessão *Cepa* é filogeneticamente distante das outras sessões do gênero, visto que esse DNA só foi encontrado nas espécies de *Cepa* e em *A. roylei* (Stevenson *et al.*, 1999).

Os DNAs satélites presentes nas bandas CMA⁺ de *Citrus* e *Murraya* parecem derivar de sequências independentes ou ter divergido a partir de uma sequência ancestral comum durante a separação desses gêneros, resultando em uma similaridade menor que a detectada com o nível de estringência utilizado aqui. É necessário, portanto, que as unidades repetição do DNA satélite desses e de outros gêneros sejam isoladas, sequenciadas e comparadas com a

CsSat181. Os resultados obtidos aqui corroboram com a hipótese de que dentro das Aurantioideae ocorreu amplificação e acúmulo da HC independentemente em diversos táxons da subfamília (Guerra *et al.*, 2000).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), órgãos financiadores dessa pesquisa, ao Dr. Walter dos Santos Soares Filho pelos materiais fornecidos, e a Luiz Gustavo Rodrigues de Souza pelo auxílio na confecção da prancha.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beridze T, Tsirekidze N, Roytberg MA.** 1992. On the tertiary structure of satellite DNA. *Biochimie* **74**: 187-194.
- 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. *Cytogenetic and Genome Research* **109**: 276-282.
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W.** 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* **371**: 215–220.
- Fann JY, Kovarik A, Hemleben V, Tsirekidze NI, Beridze TG.** 2001. Molecular and structural evolution of *Citrus* satellite DNA. *Theoretical and Applied Genetics* **103**: 1068-1073.

- Felice B, Wilson RR, Ciarmiello L, Conicella C. 2004.** A novel repetitive DNA sequence in lemon [*Citrus limon* (L.) Burm.] and related species. *Journal of Applied Genetics* **35**: 315-320.
- 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.
- Felice B, Ciarmiello L, Wilson RR, Conicella C. 2007.** Molecular analysis of a novel tandemly organized repetitive DNA sequence in *Citrus limon* (L.). Burm. *Journal of Applied Genetics* **48**: 233–239.
- Guerra M. 1985.** Cytogenetics of Rutaceae. III. Heterochromatin patterns. *Caryologia* **38**: 335-346.
- Guerra M. 1993.** Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity* **71**: 234-241.
- Guerra M, Santos KGB, Barros e Silva AE, Ehrendorfer F. 2000.** Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae - A case of parallel chromosomal evolution. *American Journal of Botany* **87**: 735-747.
- Guerra SG. 2007.** *Origem e variabilidade cariotípica da laranja-azeda*. Monografia do curso graduação em Ciência Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Ito Y, Omura M, Nesumi H. 1993.** Improvement of chromosome observation methods for *Citrus*. In: Hayashi T, Omura M, Scott NS, eds. *Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit Trees*. Tsukuba: FTRS, 31-38.
- Kamm A, Schmidt T, Heslop-Harrison JS. 1994.** Molecular and physical organization of highly repetitive, undermethylated dna from *Pennisetum-glaucum*. *Molecular & General Genetics* **244**: 420-425.

- Lim KY, Kovarik A, Matyasek R, Chase MW, Knapp S, McCarthy E, Clarkson JJ, Leitch AR 2006.** Comparative genomics and repetitive sequence divergence in the species of diploid *Nicotiana* section *Alatae*. *The Plant Journal* **48**: 907–919.
- Macas J, Meszaros T, Nouzova M. 2002.** Plant Sat: a specialized database for plant satellite repeats. *Bioinformatics* **18**: 28–35.
- Moraes AP, Soares Filho WS, Guerra M. 2007.** Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Research* **15**:115-121.
- Moscone EA, Matzke MA, Matzke AJM. 1996.** The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco. *Chromosoma* **105**: 231-236.
- Miranda M, Ikeda F, Endo T, Moriguchi T, Omura M. 1997.** Comparative analysis on the distribution of heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* chromosomes. *Chromosome Research* **5**: 86-92.
- Morton CM, Grant M, Blackmore S. 2003.** Phylogenetic relationships of the Aurantioideae inferred from chloroplast DNA sequence data. *American Journal of Botany* **90**: 1463-1469.
- Nagaki K, Kishii M, Tsujimoto H, Sasakuma T. 1999b.** Tandem repetitive Afa-family sequences from *Leymus racemosus* and *Psathyrostachys juncea* (Poaceae). *Genome* **42**: 1258–1260.
- Nagaki K, Tsujimoto H, Sasakuma T. 1999a.** A novel repetitive sequence, termed the JNK repeat family, located on an extra heterochromatic region of chromosome 2R of Japanese rye. *Chromosome Research* **6**: 95-101.
- Navrátilová A, Neumann P, Macas J. 2003.** Karyotype analysis of four *Vicia* species using *in situ* hybridization with repetitive sequences. *Annals of Botany* **91**: 921-926.

-
- Pedrosa A, Schweizer D, Guerra M. 2000.** Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Obeck *Theoretical and Applied Genetics* **100**: 361-367.
- Romano E, Brasileiro, AC M. 1999.** Extração de DNA de plantas. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* **9**: 40-43.
- Schmidt T, Heslop-Harrison JS. 1998.** Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. *Trends in Plant Science* **3**: 195-199.
- Sharma S, Raina SN. 2005.** Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* **109**: 15-26.
- Samuel R, Ehrendorfer F, Chase MW, Greger H. 2001.** Phylogenetic analyses of Aurantioidea (Rutaceae) based on Non – Coding plastid DNA sequences and phytochemical features. *Plant Biology* **3**: 77-87.
- Stevenson M, Armstrong SJ, Jones GH, Ford-Lloyd V. 1999.** Distribution of a 375 bp repeat sequence in *Allium* (Alliaceae) as revealed by FISH. *Plant Systematics and Evolution* **217**: 31-42.
- Sumner, AT. 2003.** *Chromosomes organization and function*. Oxford: Blackwell Publishing company
- 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. Berkeley: University of California Press, 190-430.
- Ugarković D, Plohl M. 2002.** Variation in satellite DNA profiles - causes and effects. *The EMBO Journal* **22**: 5955-5959.
- Uozu S, Ikehashi H, Ohmido N, Ohtsubo H, Ohtsubo E, Fukui K. 1997.** Repetitive sequences: cause for variation in genome size and chromosome morphology in the genus *Oryza*. *Plant Molecular Biology* **35**: 791–799.

-
- Walsh JB. 1987.** Persistence of tandem arrays: implications for satellite and simple-sequence DNAs. *Genetics* **115**: 553-567.
- Winterfeld G, Roser M. 2007.** Chromosomal localization and evolution of satellite DNAs and heterochromatin in grasses (Poaceae), especially tribe Aveneae. *Plant Systematics and Evolution* **264**: 75–100.
- Yamamoto M, Abkenar AA, Matsumoto M, Nesumi H, Yoshida T, Kuniga T, Kubo T, Tominaga S. 2007.** CMA banding patterns of chromosomes in major citrus species. *Journal Japan Society of Horticultural Science* **76**: 36-40.

LEGENDA

Figura 1 - Células metafásicas coradas com CMA (A, C, E, G, I) e hbridizadas com a sequencia CsSat181 (B, D, F, H, J). *C. sinensis* (A-B); *C. aurantium* (C-D); *C. medica* (E-F); *P. trifoliata* (G-H), *F. crassifolia* (I-J). Setas indicam a localização dos sítios de DNAr 45S. Barra corresponde a 5 μ m.

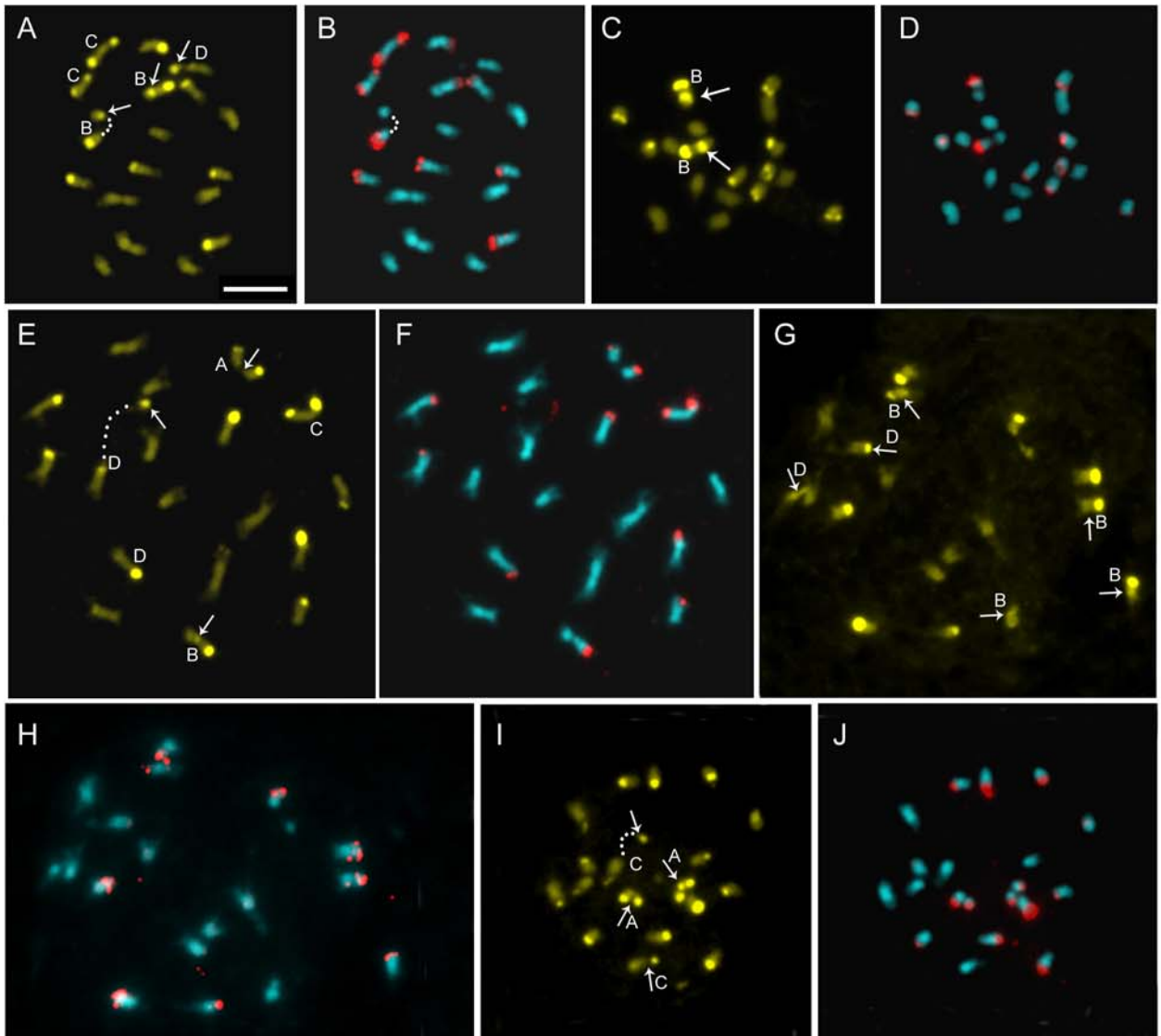


Figura 1

Conclusões Gerais

Conclusões gerais

A análise da distribuição cromossômica dos sítios de DNAr na subfamília Aurantioideae e da localização cromossômica de uma sequência satélite presente em *Citrus* e em dois gêneros proximamente relacionados, permitiu as seguintes conclusões:

1 - Na subfamília Aurantioideae existe uma ampla variação no padrão de distribuição cromossômica da heterocromatina visualizada com cromomicina A₃ (CMA). Bandas ricas em AT não foram observadas com a coloração CMA/DAPI, sugerindo que a heterocromatina do grupo é formada por seqüências de DNA satélite ricas em GC.

2 - Uma fração dessa heterocromatina, visualizada com o CMA, é constituída por seqüências de DNAr 45S, enquanto os demais blocos de heterocromatina parecem ser formados por uma ou mais seqüências satélites.

3 - Dentro da subfamília os sítios de DNAr 5S e 45S ocorrem ligados em pelo menos um par cromossômico dentro de todas as espécies analisadas da subfamília, uma condição que não tem sido conservada em nenhum outro táxon de plantas de tamanho semelhante.

4 - A ligação dos sítios de DNAr 5S e 45S parece ser uma condição plesiomórfica da tribo Citreae e talvez de toda a subfamília. Contudo, essa ligação foi desfeita parcialmente em algumas espécies, sugerindo que a ligação não é necessária para a funcionalidade desses sítios nesse grupo de espécies.

5 - A mudança simultânea de posição dos sítios de DNAr é difícil de ser explicada pelos mecanismos de variação cromossômica conhecidos, mas, provavelmente, teria sido causada por transposição e amplificação de extensas seqüências satélites.

6 - Uma seqüência satélite isolada de *C. sinensis* está presente de forma significativa na heterocromatina das três espécies *Citrus* analisadas e nos gêneros proximamente relacionados a estas, *Fortunella* e *Poncirus*, indicando que esta seqüência é um dos principais componentes da heterocromatina desse grupo.

7 - A sequência satélite isolada de *C. sinensis* não foi localizada em *Murraya paniculata*, uma espécie com padrões de bandas semelhantes aos das espécies de *Citrus*, sugerindo que distintas sequências satélites podem ter sido amplificadas e evoluído independente e paralelamente em diversos taxa da subfamília.

Normas para Publicação: EMBRAPA-CNPMF**INSTRUÇÕES AOS AUTORES****1. INTRODUÇÃO**

O mundo citrícola circunscreve-se aos paralelos 40 dos hemisférios Norte e Sul. A maioria das espécies cítricas originou-se nas regiões tropicais e subtropicais do Sudeste Asiático e arquipélago Malaio. Daí, conduzidos pelos árabes, italianos e portugueses, os citros percorreram os cinco continentes até atingir as Américas nos séculos XIV e XV, adaptando-se a diferentes condições climáticas. As plantas cítricas estão sendo cultivadas principalmente nas regiões subtropicais, entre os paralelos 20 e 40 em ambos os hemisférios. Como consequência, os estudos sobre o comportamento das espécies cítricas concentram-se nessas áreas. A *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical* é uma das poucas bases de pesquisa localizadas em condições tipicamente tropicais, coincidentemente onde se verificam as maiores taxas de crescimento da citricultura no mundo.

No presente livro, pretende-se transferir a experiência acumulada em algumas décadas com citros, especialmente nos Estados da Bahia e Sergipe, ajustada à evolução da ciência e tecnologia. São informações que provêm de resultados experimentais de campo e laboratório em todos os segmentos que compõem a citricultura, em condições tropicais. O público-alvo são os profissionais de pesquisa, ensino e extensão e, acima de tudo, o citricultor, considerando-se a crescente demanda de informações das regiões Norte e

Nordeste.

2. NORMAS PARA ELABORAÇÃO DO TEXTO

2. 1. Citações no texto

Mencionar os autores em letras minúsculas (vide artigos da Pesquisa Agropecuária Brasileira - PAB), seguido do ano, mantendo a ordem cronológica no caso de duas ou mais citações .

Usar o símbolo & (e comercial) para dois autores .

Usar et al. para mais de dois autores.

Usar numeração arábica para as tabelas e figuras .

Escrever no texto as palavras 'tabela' e 'figura' com as iniciais maiúsculas (Tabela), sendo a palavra 'figura' abreviada (Fig.). Nas legendas todas as letras devem ser maiúsculas (TABELA, FIGURA).

2.2. Referências bibliográficas

Seguir as 'Normas de Referência e Descrição Bibliográfica para o Sistema de Informação Técnico-Científica da Embrapa.

Ex.: Livro

LEAL, I.O.P. Agricultura: uma opção de investimen-. Tos. Rio de Janeiro: Bloch, 1985. 113p.

Ex.: Capítulo de livro

BEADLE, C.I. Plant growth analysis. In: COOMBS, J.; HALL, D.O.; LONG, S.P.; SCURLOCK, J.M.O. (Ed). Techniques in bioproductivity and

photosynthesis. 2. ed. Oxford: Pergamon Press, 1985. p. 20-25.

Ex.: Periódico

ARAÚJO FILHO, J.B. de; GHEYI, H.R.; AZEVEDO, N.C. de. Tolerância da bananeira à salinidade em fase inicial de desenvolvimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília,DF, v. 30, n. 7, p. 989-997, 1995.

Ex.: Resumos, Anais, Proceedings

CARDOSO, E.M.R. Situação atual da mandioca na Amazônia. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1., 1984, Belém, Anais... Belém: EMBRAPA-CPATU, 1986. v. 3, p. 85-96.

Ex.: Teses

PAUINO, S.R. **A indústria de pesticidas agrícolas no Brasil:** dinâmica inovativa e demandas ambientais. 1993. 171 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia). UNICAMP, 1993.

2.3. Pontos relevantes

Digitar o texto obedecendo-se aos itens e sub-itens, conforme sumário, na sequência em que serão inseridos (publicados) no livro. Nas tabelas as legendas devem ficar na parte superior, enquanto que nas figuras as legendas deverão ser inseridas na parte inferior .

Definir no texto o local onde ficarão os desenhos / fotos / mapas, usando as palavras 'desenho / foto / mapa' com o número correspondente .

As fotos deverão ser apresentadas preferencial- mente em cores.

2.4. Digitação no texto

Tamanho do texto

O texto deve ter aproximadamente 50 páginas .

Software

Word for Windows 6.0 ou 7.0 .

Hardware

Em CD.

Texto

Original em CD e três copias impressas.

Corpo do texto: Fonte Arial, tamanho 12.

Títulos e subtítulos em negrito, fonte Arial, tamanho 14, em caixa alta, centralizados .

Autores

Fonte Arial, tamanho 12, negrito, alinhado à direita; somente as iniciais devem ser maiúsculas .

Instituição, endereço, e-mail

Inserir no rodapé da primeira página, incluindo qualificação profissional e endereço postal completo.

Formatação da página

Folha A4, 210 mm x 297mm Margens:

Superior inferior = 3 cm

Direita e esquerda = 2 cm .

Espaçamento entre linhas: 2 .

Texto justificado .

Não usar tabulação e sim parágrafo recuado 2 cm .

Não paginar arquivo (numeração manual na cópia impressa) .

Não alterar fontes dentro do texto; exceção somente para nomes científicos que devem ser apresentados em itálico .

Gráficos: Word for Windows 6.0 ou 7.0, somente no Microsoft Graph ou Excel.

Fluxogramas e diagramas - usar barra de 'desenho' do Word for Windows 6.0 ou 7.0.

3. PRAZO DE ENTREGA

Até... (Os trabalhos deverão ser submetidos à Comissão Editorial, que se encarregará de enviá-los ao Comitê de Publicações do CNPMF - CPL) .

COMISSÃO EDITORIAL

Normas para Publicação – Sociedade Brasileira de Botânica**Normas gerais para publicação do conteúdo das palestras e simpósios no formato de livro a ser editado pela Sociedade de Botânica do Brasil referente ao 58º Congresso Nacional de Botânica**

1. Os textos devem ser concisos, contendo até 5 laudas sequencialmente numeradas, incluindo ilustrações e tabelas, quando houver. Usar fonte Times New Roman, tamanho 12, espaço entre linhas 1,5 cm, tamanho do papel A4, margens ajustadas em 1,5 cm e parágrafo de 1,25 cm.
2. Nomenclatura científica e palavras em latim, no título ou no texto (exemplo: *in vivo*, *in vitro*, *in loco*, *et al.*), devem estar em itálico.
3. O título deve ser escrito em negrito, caixa alta e baixa e estar centralizado. Se no título houver nome científico, este deve vir acompanhado dos nomes dos autores do táxon, assim como do grupo taxonômico do material tratado (ex.: Gesneriaceae, Hepaticae, etc.).
4. O nome do autor deve ser escrito em caixa alta e baixa, com número sobrescrito que indicará, em rodapé, a filiação institucional e/ou fonte financiadora do trabalho (bolsas, auxílios etc.). Créditos de financiamentos devem vir no item Agradecimentos. O autor deve fornecer o endereço completo e, se desejar, pode ser fornecido o e-mail.
5. As figuras devem ser numeradas sequencialmente, com algarismos arábicos, colocados no lado inferior direito; as escalas, sempre que necessário, devem se situar-se à esquerda da figura. Serão aceitas somente figuras em branco e preto, com resolução de pelo menos 300 dpi. Todas as figuras e tabelas devem estar referidas no texto em caixa alta e baixa, de forma abreviada e sem plural (Fig. e Tab.).
6. As citações dos autores, ao longo do texto, devem estar acompanhadas pela data. Exemplos: Silva (1997) / Silva & Santos (1997) / Silva *et al.* (1997) ou Silva (1993; 1995), Santos (1995; 1997) / (Silva 1975; Santos 1996; Oliveira 1997).
7. Referências bibliográficas devem estar em caixa alta e baixa, deslocadas para a esquerda. Seguir ordem alfabética e cronológica de autor (es). Nomes de periódicos e títulos de livros devem ser grafados por extenso e em negrito.

Normas para Publicação – Annals of Botany

Information for Authors

Instructions to Authors for submissions after 23 January 2006

[INTRODUCTION](#)

[PREPARING THE ARTICLE FILE](#)

[PREPARING TABLE FILES, FIGURE FILES, SUPPLEMENTARY INFORMATION FILES and VIDEO FILES](#)

[PREPARING A COVERING LETTER FILE](#)

[THE REVIEW PROCESS](#)

[FORMATTING AND SUBMITTING A REVISED PAPER](#)

[ACCEPTANCE, PROOFS, PRODUCTION AND PUBLICATION](#)

[FORMAL STATEMENT](#)

INTRODUCTION

Scope of the Journal

Annals of Botany is published for the Annals of Botany Company by Oxford University Press. Experimental, theoretical and applied papers on all aspects of plant science are welcome. The submitted manuscript or its essential content must not have been published previously or be under consideration for publication elsewhere. To merit publication in *Annals of Botany*, contributions should be substantial, written in clear English and combine originality of content with potential general interest. Submission of manuscripts that report small incremental advances or are of geographically local interest only is discouraged unless the implications of the findings are wide-reaching. In general, a paper is unlikely to be accepted unless referees and editors involved in its evaluation are enthusiastic about the science. The Covering Letter is an essential part of all submissions. It should include an ~60 word summary of the scientific strengths of the paper that the author(s) believe qualify it for consideration by *Annals of Botany*.

Charges

Authors pay no fees or page charges unless electing for our Open Access scheme (see below for details). The corresponding author receives a free copy of the issue of the Journal in which their paper appears and a unique URL that gives access to a PDF (Portable Document Format) file of their article. In addition, 25 offprints of the article will be supplied without charge provided that the offprint order form is completed and returned to OUP. Colour photographs and graphics are also printed without charge where their use enhances scientific content or clarity.

Open Access

Starting in January 2006, *Annals of Botany* authors have the **option** to make their accepted paper freely available online immediately upon publication, under the ‘[Oxford Open](#)’ initiative. Authors can choose this open access option when completing the customary Licence to Publish form sent to the corresponding author of all accepted papers. Here, authors

are asked to indicate whether or not they wish to have their paper made freely available immediately online. There is a charge, which varies depending on circumstances (see <http://www.oxfordjournals.org/oxfordopen>) but it is considerably cheaper for authors whose university or institution subscribes to the Journal, and for authors in developing countries. If you do not select the Open Access option, your paper will be published with standard subscription-based access and you will not be charged.

Types of article

Standard research papers ('ORIGINAL ARTICLES') and 'TECHNICAL ARTICLES' should not normally exceed ten printed pages (each printed page in the journal holds approximately 1000 words or 40–50 references). A 'REVIEW' submitted speculatively should have fewer than 24 printed pages. 'SHORT COMMUNICATIONS' should not exceed six printed pages. Short opinion papers ('VIEWPOINT') up to 6 pages long will also be considered. 'INVITED REVIEWS' (up to 24 pages) and 'BOTANICAL BRIEFINGS' (up to 6 pages) are published by invitation only. The journal also publishes book reviews ([Publishers' Books for Review](#)).

Summary of submission processes

Submission management and evaluation of submitted manuscripts will involve the Journal's online manuscript submission system. The manuscript text should be prepared in English (see **PREPARING THE ARTICLE FILE** below for details) and submitted online starting from our [login page](#). Figures, tables and other types of content should be organized into *separate files* for submission (see **PREPARING TABLE and FIGURE FILES, SUPPLEMENTARY INFORMATION FILES and VIDEO FILES** below for details). If you are using the online submission system for the first time please go to the login page and generate a login name and password after clicking on the "**First time authors only should register here**" link. If you are already registered but need to be reminded of your login name or password please go to the login page and click on "**Unknown/Forgotten password?**". There is extensive guidance available throughout the submission process. To make use of this guidance please click on the "Author Instructions" link or the "Tips" link situated at the top of every screen. In addition, there are frequent context-sensitive help points throughout the site that can be opened by clicking on the following symbol ?.

If you are unable to access our web-based submission system, please contact the Editorial Office (e-mail: annals-botany@bristol.ac.uk) for alternative methods of submitting your paper. The postal address is Annals of Botany Editorial Office, School of Biological Sciences, University of Bristol, Woodland Road, Bristol BS8 1UG, UK.

[Back to Start](#)

Preparing a covering letter

Each submission should be accompanied by a **Covering Letter** formatted in MS Word (file type DOC) or in Rich Text Format (file type RTF). The letter should include contact details of the corresponding author, the title and authorship of the paper, and should state if the paper is a first submission, revision or a resubmission. It must also include an ~60 word summary of the scientific strengths of the paper that the author(s) believe qualify it for consideration by **Annals of Botany**. The manuscript reference number must be given if the paper is a revision or resubmission. If the paper is a revised or resubmitted manuscript, the letter should explain

what changes have been made to the manuscript and where changes requested by the Handling Editor and referees have not been carried out. Any other information to which authors wish to draw the Chief Editor's attention should also be included in this letter.

PREPARING THE ARTICLE FILE

(Always consult a recent issue of *Annals of Botany* for layout and style)

Text should be typed using size 12 Times New Roman or Courier, double-spaced throughout and with an approx. 25 mm margin. All pages should be numbered sequentially. Each line of the text should also be numbered, with the top line of each page being line 1. The article file should be in PC-compatible Microsoft Word - file type DOC [please make sure the "Language" is "English (U.K)" via Tools → Language → Set Language]. RTF formats are also acceptable. Please do *not* submit PDFs, desktop publishing files or LaTeX files. The article file should *include* a list of any figure legends but *exclude* tables and any figures themselves – these should be submitted separately. Please do *not* embed tables and images in the article file. Instead, tables and figures should each be allocated separate electronic files on your computer for later uploading as explained below under **PREPARING TABLE and FIGURE FILES**, **SUPPLEMENTARY INFORMATION FILES AND VIDEO FILES**.

The first page should provide a concise and informative full title followed by the names of all authors. Where necessary, each name should be followed by an identifying superscript number (^{1, 2, 3} etc.) associated with the appropriate institutional address to be entered further down the page. For papers with more than one author, the corresponding author's name should be followed by a superscript asterisk*. The institutional address(es) of each author should be listed next, each address being preceded by the relevant superscript number where appropriate. A running title of not more than 75 characters, including spaces, should also be provided, followed by the e-mail address of the corresponding author. Please follow the layout used for the first page of papers published in *Annals of Botany*.

The second page should contain a structured Abstract not exceeding 300 words made up of bulleted headings. For 'ORIGINAL ARTICLES' these heading will normally be as follows: *Background and Aims* *Methods* *Key Results* • *Conclusions*. Alternative bulleted headings, such as 'Background', 'Scope' and 'Conclusions', are also acceptable for 'REVIEWS', 'INVITED REVIEWS', 'BOTANICAL BRIEFINGS', 'TECHNICAL ARTICLES' papers and 'VIEWPOINT' papers. The Abstract should be followed by between three and 12 Key words that include the complete botanical name(s) of any relevant plant material. If many species are involved, species groups should be listed instead. Note that essential words in the title should be repeated in the key words since these, rather than the title, are used in some electronic searches. Title, Abstract and Key words should be self-explanatory without reference to the remainder of the paper.

The third and subsequent pages should comprise the remaining contents of the article text. 'ORIGINAL ARTICLES' and 'SHORT COMMUNICATIONS' will usually have the structure INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGEMENTS and LITERATURE CITED followed by a list of captions to any figures. The RESULTS section should not include extensive discussion and data should not be repeated in both graphical and tabular form. The DISCUSSION section should avoid extensive repetition of the RESULTS and *must* finish with some conclusions. Abbreviations

are discouraged *except* for units of measurement, standard chemical symbols (e.g. S, Na), names of chemicals (e.g. ATP, Mes, Hepes, NaCl, O₂), procedures (e.g. PCR, PAGE, RFLP), molecular terminology (e.g. bp, SDS) or statistical terms (e.g. ANOVA, s.d., s.e., *n*, *F*, *t*-test and *r*²) where *these are in general use*. Other abbreviations should be spelled out at first mention and all terms must be written out in full when used to start a sentence. Abbreviations of scientific terms should not be followed by a full stop. Use the minus index to indicate 'per' (e.g. m⁻³, L⁻¹, h⁻¹) except in such cases as 'per plant' or 'per pot'. If you decide that a list of abbreviations would help the reader, this should be included as an Appendix.

Units of Measurement. Use the *Système international d'unités* (SI) wherever possible. If non-SI units have to be used, the SI equivalent should be added in parentheses at first mention. For units of volume, expressions based on the cubic metre (e.g. 5 × 10⁻⁹ m³, 5 × 10⁻⁶ m³ or 5 × 10⁻³ m³) or the litre (e.g. 5 µL, 5 mL, 5 L) are acceptable, but one or other system should be used consistently throughout the manuscript. Typical expressions of concentrations might be 5 mmol m⁻³, 5 µM (for 5 µmol L⁻¹), or 25 mg L⁻¹. The Dalton (Da), or more conveniently the kDa, is a permitted non-S

Names of plants must be written out in full (*Genus, species*) in the abstract and again in the main text for every organism. The authority (e.g. L., Mill., Benth.) is *not* required unless it is controversial. Guidance for naming plants correctly is given in [The International Plant Names Index](#) and in *The Plant Book: a Portable Dictionary of the Vascular Plants* (1997) by D.J. Mabberley (Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 0521-414210-0). After first mention, the generic name may be abbreviated to its initial (e.g. *A. thaliana*) except where its use causes confusion.

Any cultivar or variety should be added to the full scientific name e.g. *Lycopersicon esculentum* 'Moneymaker' following the appropriate international code of practice. For guidance, refer to the ISHS [International Code of Nomenclature for Cultivated Plants](#) (2004) edited by C.D. Brickell, B. R. Baum, W. L. A. Hetterscheid, A. C. Leslie, J. McNeill, P. Trehane, F. Vrugtman, J. H. Wiersema (ISBN 3-906166-16-3). Once defined in full, plants may also be referred to using vernacular or quasi-scientific names without italics or uppercase letters (e.g. arabidopsis, dahlia, chrysanthemum, rumex, soybean, tomato). This is often more convenient.

Items of Specialized Equipment mentioned in MATERIALS AND METHODS should be accompanied by details of the model, manufacturer, and city and country of origin.

Numbers up to and including ten should be written out unless they are measurements. All numbers above ten should be in numerals except at the start of sentences. Dates should be in the form of 10 Jan. 1999, and Clock Time in the form of 1600 h.

Mathematical equations must be in proper symbolic form; word equations are not acceptable. Each quantity should be defined with a unique *single character* or symbol together with a descriptive subscript if necessary. Each subscript should also be a *single character* if possible, but a short word is permissible. For example, a relationship between plant dry mass and fresh mass should appear as $M_d = 0.006M_f^{1.461}$, where M_d is plant dry mass and M_f is plant fresh mass; and not as $DM = 0.006FM^{1.461}$.

The meaning of terms used in equations should be explained when they first appear. Standard conventions for use of *italics* only for variables should be followed: normal (Roman) font

should be used for letters that are identifiers. Thus in the above example, *M* is the *variable quantity* of mass, the subscripts d and f are identifiers for dry and fresh respectively.

Special note regarding 'Equation Editor' and other software for presentation of mathematics. Symbols and equations that are imported into Word documents as embedded objects from other software packages are generally incompatible with typesetting software and have to be re-keyed as part of the proof-making process. It is therefore strongly advisable to type symbols and equations directly into MS Word wherever possible. Importing from other software should ideally be confined to situations where it is essential, such as two-line equations (i.e. where numerators and denominators cannot be set clearly on a single line using '/') and to symbols that are not available in Word fonts. This will minimize the risk of errors associated with rekeying by copyeditors.

Summary statistics should be accompanied by the number of replicates and a measure of variation such as standard error or least significance difference. Analysis of variance is often appropriate where several treatments are involved. Presentation of an abridged ANOVA table is permissible when its use illustrates critical features of the experiment.

Chemical, biochemical and molecular biological nomenclature should be based on rules of the [International Union of Pure and Applied Chemistry \(IUPAC\)](#) and the [International Union of Biochemistry and Molecular Biology \(IUBMB\)](#). Chapter 16 of *Scientific Style and Format. The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers 6th edn.*, by Edward J. Huth (Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 0-521-47154-0) gives guidelines.

Sequence information. Before novel sequences for proteins or nucleotides can be published, authors are required to deposit their data with one of the principal databases comprising the International Nucleotide Sequence Database Collaboration: [EMBL Nucleotide Sequence Database](#), [GenBank](#), or the [DNA Data Bank of Japan](#) and to include an accession number in the paper. Sequence matrices should only be included if alignment information is critical to the message of the paper. Such matrices can be in colour but should not occupy more than one printed page. Larger matrices will only be printed by special agreement but may more readily be published electronically as Supplementary Information (see below).

Gene nomenclature. Species-specific rules on plant gene nomenclature are available for:

[maize](#);

[rice](#);

[wheat](#)

[arabidopsis](#).

and

Otherwise, *Annals of Botany* adopts the following conventions for abbreviations: each gene abbreviation is preceded by letters identifying the species of origin. Lower-case italics should be used for mutant genes (e.g. *Rp-etr1*); upper-case italics (e.g. *Le-ACOI*) for wild-type genes; upright lower-case for proteins of mutated genes (e.g. Le-adh1); and upright upper-case for proteins of wild-type genes (e.g. At-MYB2). It may often be helpful to readers if the names of genes or gene families are spelled out in full at first mention.

Citations in the text. These should take the form of Felle (2005) or Jacobsen and Forbes (1999) or (Williamson and Watanabe, 1987; Rodrigues, 2002a, b) and be ordered chronologically. Papers by three or more authors, even on first mention, should be

abbreviated to the name of the first author followed by et al. (e.g. Zhang *et al.*, 2005). If two different authors have the same last name, give their initials (e.g. NH Kawano, 2003) to avoid confusion. Only refer to papers as 'in press' if they have been accepted for publication in a named journal, otherwise use the terms 'unpubl. res.', giving the initials and location of the person concerned. (e.g. H Gautier, INRA, Lusignan, France, unpubl. res.) or 'pers. comm.' (e.g. WT Jones, University of Oxford, UK, 'pers. comm.')

The LITERATURE CITED should be arranged alphabetically based on the surname of the first or sole author. Where the same sole author or same first author has two or more papers listed, these papers should be grouped in year order. Where such an author has more than one paper *in the same year*, these should be ordered with single authored papers first followed by two-author papers (ordered first alphabetically based on the second author's surname, then by year), and then any three-or-more-author papers (in year order only). Italicized letters 'a', 'b', 'c', etc., should be added to the date of papers with the same first authorship and year.

Each entry must conform to one of the following styles according to the type of publication.

Books

Öpik H, Rolfe S. 2005. *The physiology of flowering plants. Physicochemical and environmental plant physiology*, 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press.

Chapters in books

Scandalios JG. 2001. Molecular responses to oxidative stress. In: Hawkesford MJ, Buchner P, eds. *Molecular analysis of plant adaptation to the environment*. Dordrecht: Kluwer, 181-208.

Research papers

Popper ZA, Fry SC. 2003. Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. *Annals of Botany* 91: 1–12.

Theses

Tholen D. 2005. *Growth and photosynthesis in ethylene-insensitive plants*. PhD Thesis, University of Utrecht, The Netherlands.

Anonymous sources

Anonymous. Year. *Title of booklet, leaflet, report, etc.* City: Publisher or other source, Country.

Online references should be structured as: Author(s) name, author(s) initial(s). year. *Full title of article*. Full URL. Date of last successful access (e.g. 12 Jan. 2003)

Acknowledgements. In the ACKNOWLEDGEMENTS, please be brief. 'We thank . . .' (not 'The present authors would like to express their thanks to . . .').

Funding. Details of all funding sources for the work in question should be given in a separate section entitled 'Funding'. This should appear before the 'Acknowledgements' section. The

following rules should be followed: the full official funding agency name should be given, i.e. 'National Institutes of Health', not 'NIH'; grant numbers should be given in brackets; multiple grant numbers should be separated by a comma; agencies should be separated by a semi-colon; no extra wording like 'Funding for this work was provided by ...' should be used; where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number 'to [author initials]'. An example is given here: 'National Institutes of Health (CB5453961 to C.S., DB645473 to M.H.); Funding Agency (hfygr667789).'

Appendix.

If elaborate use is made of units, symbols and abbreviations, or a detailed explanation of one facet of the paper seems in order, further details may be included in a separate APPENDIX placed after the LITERATURE CITED. For more detail and information on types of files required for text, graphics and tables etc., please see the next section.

[Back to Start](#)

PREPARING TABLE FILES, FIGURE FILES, SUPPLEMENTARY INFORMATION FILES AND VIDEO FILES

Each table, figure, video and set of supplementary information should be prepared as a separate file on your computer in preparation for online submission. Towards the bottom of the first submission screen of the online submission system, you should enter the appropriate number of files you have in each category. This creates the spaces (boxes) that will accommodate the files when they are uploaded later. The files are categorized as 'Colour Figures', 'Black and White Figures', 'Tables', 'Supplemental Material' and 'Video'.

Tables. The best guide for laying out tables and diagrams are papers in a recent issue of *Annals of Botany*. Each table should have a separate file, a complete caption at the top and be numbered Table 1, Table 2 etc. according to the order in which they are first mentioned in the text. When preparing tables, adopt the 'Tables' set-up in MS Word, using one cell for each datum cluster (e.g. 12.2 ± 1.65) and avoid the use of the 'return' key. Please do not use MS Excel for submitting tables. These can easily be copied into MS Word files prior to submission.

Figures. All images (e.g. line diagrams, drawings, graphs, photographs, plates) are considered to be 'Figures'. Each figure should be in a separate file and be numbered (Fig. 1, Fig. 2 etc.) according to the order in which they are first mentioned in the text. Electron and light photomicrographs should have internal scale markers. Colour images are encouraged and printed without charge where they enhance significantly the clarity of the scientific information. Line diagrams will normally be black on white and boxed with inward scale markings. Use of colour in line diagrams may sometimes be agreed where this enhances clarity significantly. Use open and/or closed circles, squares and triangles for symbols in line graphs. Height and width should be chosen for either single (8.4 cm wide) or double (up to 17.3 cm wide) column reproduction. Grouping of related graphics into a single figure is strongly encouraged. When a block of illustrative material consists of several parts, each part should be labelled A, B, C, etc. and not treated as separate figures. Note that graphs and diagrams of finally accepted papers are normally redrawn by the publisher to ensure a consistent house style and should be inspected carefully by authors at the proof stage.

Simple black and white line drawings and graphs should be supplied as approx. 300 dpi JPG files or MS PowerPoint files. The publisher will almost always redraw all such material if the paper is accepted. More complicated drawings, such as detailed botanical illustrations will not be redrawn and should be supplied as 600 dpi JPG files. For continuous tone images (e.g. photographs), please supply JPG files at 300 dpi (or 600 dpi if the image is a mix of pictures and text and/or has thin lines). Keeping total files sizes down will lessen up- and downloading times. To help achieve this *all images should be submitted at approximately the physical size they would appear in the Journal*. Scaling, sizing and cropping are best carried out within image handling programs such as Adobe PhotoShop or Corel PhotoPaint. Please do not supply photographic images as PowerPoint files as these are generally of poor resolution. Note that PDF files are not acceptable. Also, please ensure that images that do NOT contain colour are saved as 'grayscale' and that any layers have been flattened – taking these steps can make the file size up to 10 times smaller. Note that a JPG file should not be repeatedly saved as this reduces quality.

Large amounts of additional information can be submitted for publication electronically as Supplementary Information provided that it is not essential for a basic understanding of the main paper. Supplementary material will be refereed along with the core paper. At appropriate positions in the main text authors should indicate what details are being made available, followed by the words [Supplementary Information] in bold and between square brackets. The online submission system provides space for supplementary information to be uploaded in "Supplemental Material" files. The appropriate number of these types of file can be selected towards the bottom of the first submission screen. Similarly, if you are including a video you should enter [Supplementary Information - Video] in bold and between square brackets at the appropriate place(s) in the text. A video can be uploaded after selecting a "Video" file on the first submission screen. The movie should be created in a widely available program such as Windows MediaPlayer. A short paragraph describing the contents of any Supplementary Information or Video should also be inserted in the main text immediately before ACKNOWLEDGEMENTS.

[Back to Start](#)

PREPARING A COVERING LETTER FILE

Each submission should be accompanied by a Covering Letter formatted in MS Word (file type DOC) or in Rich Text Format (file type RTF). The letter should include contact details of the corresponding author, the title and authorship of the paper, and should state if the paper is a first submission, revision or a resubmission. The manuscript reference number must be given if the paper is a revision or resubmission. If the paper is a revised or resubmitted manuscript, the letter should explain what changes have been made to the manuscript and where changes requested by the Handling Editor and referees have not been carried out. Any other information to which authors wish to draw the Chief Editor's attention should also be included in this letter.

[Back to Start](#)

THE REVIEW PROCESS

The corresponding author and all co-authors receive an acknowledgment of receipt of the manuscript and a manuscript reference number by e-mail. The corresponding author is

informed when a Handling Editor has been assigned to the paper. Manuscripts considered suitable for peer review are sent to at least two outside referees. We give referees a target of two weeks for the return of their reports. Currently (2006) less than 25 % of submitted papers are accepted. Authors are asked to revise provisionally accepted articles within four weeks. To view the make-up of the Editorial Board click on [View full editorial board](#).

[Back to Start](#)

FORMATTING AND SUBMITTING A REVISED PAPER

The technical requirements for the Article, Table and Figure Files etc. are as described above for the first submission. If the technical requirements are not met, the paper will be sent back to the author until satisfactory files are provided. Revised papers are checked by a member of the Editorial Board and may be subject to a further round of refereeing.

[Back to Start](#)

ACCEPTANCE, PROOFS, PRODUCTION AND PUBLICATION

When a paper is finally accepted you will be asked to supply some additional material for our ContentSnapshot feature. Each ContentSnapshot comprises a thumbnail image relevant to the paper and a short summary of its principal findings. For this, you will be asked to prepare a suitable Snapshot Image file (in colour) for the thumbnail illustration and also a short summary title and text (up to 60 words) to associate with the image. Examples of ContentSnapshots can be found at <http://aob.oxfordjournals.org/cgi/contentsnapshot/93/1.pdf>.

You will also be invited to submit an eye-catching front cover picture and about 60 words of text for possible printing on the inside cover of the issue in which your article would appear. The technical requirements are similar to those for manuscript photographs. The picture should be sharp, of good contrast and be related to the content of the submitted paper; however, it need not be duplicated in the paper itself. The image should be sent as a TIFF, JPG or GIF file at 300 dpi, size approx. 10 × 10 cm. Authors of selected material will receive a copy of the cover illustration and a complimentary copy of the relevant issue of the Journal.

At the time of acceptance you will also be asked to return a Licence to Publish form to the publisher Oxford University Press ([Licence to Publish](#)). This form also offers the opportunity to choose to have the full text and PDF versions of the paper made available to non-subscribers online from the time of first publication (Open Access). There is a charge for this, which varies depending on circumstances (see <http://www.oxfordjournals.org/oxfordopen>) but it is considerably cheaper for authors whose university or institution subscribes to the Journal, and for authors in developing countries. If you do not select the Open Access option, your paper will be published with standard subscription-based access and no charge will be made.

Information about the New Creative Commons licence can be found [here](#).

Once a satisfactorily revised version has been received and accepted, the title of the paper, authorship and hyperlinked e-mail address of the corresponding author will be posted on the *Annals of Botany* website under AOBFirstAlert. This feature is accessible by subscribers and non-subscribers from the [Journal's home page](#). Corresponding authors will receive PDF

proofs by e-mail attachment approximately 4–6 weeks after acceptance. Corrected proofs should be returned within 24 h. Adobe Acrobat Reader will be needed to read the PDF proof and is downloadable without charge from: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Authors should pay special attention to diagrams, figures and to equations since these items are usually re-keyed or redrawn by the publisher. At this stage, authors will also be invited to order offprints and extra single copies of the issue in which the article will appear.

Publication and printing process

Once corrected proofs have been received and checked, the paper is posted on the website approximately six weeks ahead of print under *AOBPreview*. Each article is identified by a unique DOI (Digital Object Identifier), a code that can be used in bibliographic referencing and searching. The DOI and date of electronic publication in *AOBPreview* are also printed in the normal fully paginated monthly issue that is published about six weeks later. The paper will appear online and in print during the week preceding the start of the month of issue. The dates of submission, first return for revision, final acceptance and date of electronic publication of each article are printed on each paper. The corresponding author will receive a free copy of the printed issue in which their paper appears and a free URL that gives access to the article online and to a downloadable PDF. In addition, 25 free printed copies of the article will be supplied provided that the offprint order form is completed and returned to OUP. These items are normally dispatched within seven days of publication of the printed journal. The corresponding author is responsible for distributing this URL to any co-authors.

Post-publication services

After publication any author or reader is given the opportunity to comment on your paper (and any other paper) electronically using the ‘E-Letters’ feature. For more information click on this [E-Letters](#) link. Monthly alerts that supply the Journal’s current Table of Contents can be requested by clicking on [Email table of contents](#) or by using an RSS feed. For more details on the latter click on [XML RSS feed](#). Readers can also be alerted to related papers in *Annals of Botany* and a wide range of other journals using the High Wire ‘CiteTrack’ alerting system. To access this click on [CiteTrack](#).

[Back to Start](#)

FORMAL STATEMENT

Authors or their employers retain copyright on articles published in *Annals of Botany*. However, it is a condition of publication in the Journal that authors or their employers grant an exclusive licence to the Annals of Botany Company by completing and signing the [Licence to Publish](#). This ensures that requests from third parties to reproduce articles are handled efficiently and consistently and allows the article to be disseminated as widely as possible. The Licence permits authors to use their own material in other publications provided that the Journal is acknowledged as the original place of publication and that the Annals of Botany Company is notified in writing

Papers are published on the understanding that the work is free of plagiarism, that all authors have agreed to publication in *Annals of Botany* and that those contributing substantially to the

work have been appropriately acknowledged or given co-authorship. The official publication date is the date on which the paper is first posted electronically on the website. This date will normally be when the paper appears in *AOBPreview*. If a paper is not posted in *AOBPreview*, the date of publication is the date of first appearance in a fully paginated print or electronic monthly issue. For more about rights and permissions click on this link [Rights](#)

Normas para Publicação – Chromosome Research**Manuscript Submission**

There are no page charges or charges for the publication of colour illustrations or administration charges for papers published in Chromosome Research. Manuscripts may be sent by e-mail to any of the Associate Editors or to the Editor-in-Chief (Please see addresses below). When submitting an article to one of the Associate Editors a copy of the covering letter, the title page and the abstract must be sent at the same time to the Editor-in-Chief, Professor Herbert Macgregor (herbert.macgregor@exeter.ac.uk and herbert.macgregor@btinternet.com) The decision with regard to acceptance for publication is made by the Associate Editor/Editor to whom the manuscript is sent. North American authors are encouraged, but under no obligation, to send their manuscripts to one of our Associate Editors in that region. This often helps to speed up editorial processing and can lead to better communication and a faster decision on acceptance for publication. For the same reasons, Japanese authors are encouraged to submit their papers through our Associate Editor in Japan. 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.

Editor-in-Chief:

Professor Herbert Macgregor
School of Biosciences
Geoffrey Pope Building
University of Exeter
Stocker Road
Exeter EX4 4QD
England, UK
Tel.+fax: (+44) (0)1392 879701
Email: herbert.macgregor@exeter.ac.uk
Email: herbert.macgregor@btinternet.com

Associate Editors:

Wendy Bickmore
MRC Human Genetics Unit
Western General Hospital NHS Trust
Edinburgh EH4 2XU
Scotland, UK
Tel: (+44) (0) 131 332 2471
Fax: (+44) (0) 131 343 2620
Email: wendy.bickmore@hgu.mrc.ac.uk
Website: <http://www.hgu.mrc.ac.uk/Users/Wendy.Bickmore/>
Mary E. Delany
2131D Meyer Hall
Department of Animal Science
University of California
Davis, CA 95616
USA
Tel: +1-530-754-9343 office
Tel: +1- 530-754-9404 lab
Fax: +1-530-752-0175

E-mail: medelany@ucdavis.edu

<http://animalscience.ucdavis.edu/AvianResources/>

<http://animalscience.ucdavis.edu/faculty/Delany>

J.S. (Pat) Heslop-Harrison

Department of Biology

University of Leicester

Leicester LE1 7RH

UK

Tel: (+44) 116 2523381

Fax: + 44 116 2522791

Email: phh@genome.waitrose.com

Email: phh4@leicester.ac.uk

Website: <http://www.le.ac.uk/biology/staff/blphh4.htm>

Dr Jiming Jiang

Department of Horticulture

University of Wisconsin-Madison

Madison, WI 53706

USA

Fax: (+1) 608 262 4743

Email: jjjiang1@wisc.edu

Professor Dr. Hans J. Lipps

Institut für Zellbiologie

Universität Witten/Herdecke

Stockumer Str. 10

58448 Witten

Germany

Tel.: (49) 2302 669144

Fax.: (49) 2302 669220

Email: lipps@uni-wh.de

Adrian Summer

7 Smileyknowes Court

North Berwick

East Lothian EH39 4RG

Scotland

Tel/Fax: (+44) (0) 1620 894 640

Email: atsummer@clara.net

Nobuo Takagi

Hokusei Gakuen University

Atsubetsu-ku

Sapporo, 004-8631

Japan

Email: ntakagi@u01.gate01.com

Fengtang Yang

The Wellcome Trust Sanger Institute

Wellcome Trust Genome Campus

Hinxton, Cambridge

CB10 1SA

UK

Tel: (+44) (0)1223 494842

Fax: (+44) (0)1223 494919

Email: fyl@sanger.ac.uk

How to Submit your Manuscript

There are no page or administration charges for papers published in *Chromosome Research*. Manuscripts should be submitted by e-mail as PDF files with the illustrations integrated into the text or as Word files for the text and compressed JPEG files for the illustrations. Do not send very large files as email attachments by e-mail as they may not be accepted by the editors' and reviewers' Web servers or they may take a very long time to download. Receipt of your manuscript by the receiving editor will be acknowledged immediately.

Style and Presentation

The manuscript should be typed with double spacing throughout, allowing for ample margins. The first 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 second page should present a summary of less than 200 words, along with 3–5 key words, and should be followed by the text of the paper, 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 should be kept to a minimum and must be defined at their first occurrence.

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>

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. Photographs may be submitted either as electronic files or as glossy prints. One complete set of high quality glossy prints of all illustrations must be provided with the final revised and accepted manuscript. These should be supplied exactly as the author wishes to see them published with regard to layout, colour, resolution and contrast. Magnifications must be shown by scale bars and any lettering should be in lower case Helvetica bold type, approximately 3mm in height (12 or 14 point size type). Photographs should be cropped as close as possible to the area of interest. Where two or more photographs are mounted together on one page, they should be separated by 2 – 3mm of white space. If you send us your manuscript in electronic form and it is accepted for publication, we will invite you to send us high quality glossy prints of all your colour illustrations. This is not a requirement for publication in the journal but it does assist our production team in reproducing your pictures exactly as you would wish them to appear with regard to colour and definition.

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
- accepted after peer review

ESM may consist of:

- information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings (use QuickTime, .avi, .mpeg, animated GIFs, or any other common file format)

- 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.

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

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.

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 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.

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

Fifty free off-prints of each paper are provided. Authors may order additional off-prints on the form which accompanies the proofs.

Additional Information

Peter Butler

Editorial Director, Chromosome Research

Springer

P.O. Box 17

3300 AA Dordrecht

The Netherlands

E-mail: peter.butler@springer.com

www.springer.com/10577/

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